



**Università
degli Studi
di Ferrara**

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Paolo Pinton

Valutazione dell'accuratezza della determinazione di VOC quali
biomarker di neoplasia del colon-retto nei soggetti FIT positivi dello
Screening di Prevenzione

BIO/09

Dottoranda

Dott. Palmonari Caterina

Tutore

Prof. Rispoli Giorgio

Prof. Malagù Cesare

Anni 2016/2019

Al mio fantabimbo Emanuele è per te ogni cosa che c'è.

INDICE

Abbreviazioni	pag.5
1. Capitolo 1 – Introduzione	pag.6
1.1- Epidemiologia dei tumori del colon-retto	pag.6
1.2 - Fattori di rischio	pag.10
1.3 - Gradi di rischio	pag.15
1.4 - Presentazione clinica e diagnosi	pag.16
1.5 - Istopatologia	pag.18
1.6 - Stadiazione e classificazione del carcinoma del colon-retto	pag.21
1.7 - Prognosi e cenni di terapia	pag.27
1.8 - La prevenzione del cancro del colon-retto	pag.29
1.9 - Definizione di screening, sorveglianza, case finding e razionale	pag.30
1.10 - Il programma di screening di prevenzione del carcinoma del colon-retto in E-R e a Ferrara	pag.32
1.11 - Protocollo operativo per la provincia di Ferrara	pag.41
1.12 - Il Follow up nello screening	pag.43
1.13 Scenari futuri per lo screening del CCR	pag.45
- Videocapsula	pag.45
- Ricerca del DNA nelle feci (Gene Based screening)	pag.46
- La "metabolomica"	pag.47
- VOC (Volatile Organic Compounds)	pag.47
- Riconoscimento olfattivo can addestrati	pag.48
- Naso elettronico	pag.49
1.14 - SCENT A1	pag.49
- Principi di funzionamento dei sensori chemoresistivi	pag.60
- I semiconduttori e il modello a bande	pag.61
- Semiconduttori per i sensori di gas	pag.64
- La superficie	pag.65
- L'interazione con la superficie	pag.67
- Conducibilità di un film	pag.68
2. Capitolo 2 - Obiettivi	pag.71

3. Capitolo 3 - Materiali e metodi	pag.74
- Analisi dei dati	pag.78
- PCA Principal Component Analysis	pag.79
- SVM Support Vector Machines	pag.81
4. Capitolo 4 – Risultati	pag.82
5. Capitolo 5 – Discussione e conclusioni	pag.90
Allegati	pag.93
Bibliografia	pag.107

ABBREVIAZIONI

ACG	American College of Gastroenterology
AFAP	Attenuated FAP
CCR	Cancro Colon-retto
CDC	Clisma doppio contrasto
CEA	Antigene Carcino Embrionario
CO	Colonscopia Ottica
CSGE	Confirmational Sensitive Gel Electrophoresis
CT	Colon Tac
EAPC	European Association for Palliative Care
FAP	Poliposi Familiare Adenomatosa
FIT	Feacal immunochemical test
FOBT	Fecal occult blood test
GCO	Global Cancer Observatory
GISCoR	Gruppo Italiano Screening COloRettale
HPNCC	Cancro colon-retto ereditario non su polipo
HO	Hemoccult II
HOS	Hemoccult II Senza
Hsel	Hemeselect
IBD	Malattie Infiammatorie Intestinali
ITACAN	Associazione italiana registro tumori
IVPS	Test di sintesi proteica “in vitro”
LG	Linea Guida
MDC	Mezzo di Contrasto
MMG	Medico Medicina Generale
MMRS	Mismatch-repair system
MSI	Microsatellite instability
MSI-H	Tumori ad alta instabilità
MSI-L	Tumori a bassa instabilità
MSS	Tumori Stabili
NAS	Non Altrimenti Specificato
NHS	National Health Service
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDT	Photo Dynamic Therapy
PTT	Protein Truncation Test
RCT	Trials Clinico Randomizzato
RCU	Rettocolite Ulcerosa
RM	Risonanza Magnetica
SDO	Scheda Dimissione Ospedaliera
SI	Sistema Informativo
SOF	Sangue Occulto Feci
SS	Sigmoidoscopia
SSCP	Single-stranded conformation polymorphism
SSN	Sistema sanitaria nazionale
SSR	Sistema sanitaria regionale
SVM	Support Vector Machines

1. CAPITOLO 1 – Introduzione

1.1 - Epidemiologia dei tumori del colon-retto

Il carcinoma coloretale è “una neoplasia maligna epiteliale ad abito ghiandolare, infiltrante il colon-retto, con possibilità di estensione oltre l’organo”¹ e comprende i tumori del colon, del retto, della giunzione retto-sigmoidea e dell'ano.

Il CCR si classifica terzo tra i tumori più comunemente diagnosticati in tutto il mondo, colpendo circa 1.23 milioni di persone ogni anno², nel 2018 sono stati diagnosticati 1.849.158 nuovi casi e sono stati stimati 880 792 decessi.

Il cancro del colo-retto (CCR) rappresenta la seconda cause di morte per tumore nei paesi occidentali sia per gli uomini che per le donne; in Europa costituisce il secondo tumore maligno nella donna per incidenza, dopo quello della mammella, e il terzo, dopo quello del polmone e della prostata, nell'uomo. I paesi con più alto tasso di mortalità risultano essere Germania, Francia e il Regno Unito.³

I dati epidemiologici europei relativi al 2018 forniti da IARC dimostrano 530.611 nuovi casi e l’American Cancer Society lo ha classificato come il terzo più comune tipo di cancro diagnosticato negli USA, con diagnosticati oltre 51.000 nuovi casi.

In Italia nel 2018 sono stati diagnosticati oltre 51.000 nuovi casi di carcinoma del colon-retto, nel 2017 circa 53000 nuovi casi (30000 nei maschi e 23000 nelle femmine), posizionandosi al secondo posto sia nella popolazione femminile (13%, dopo i tumori della mammella) che in quella maschile (16%, dopo i tumori della prostata).⁴

Il grosso incremento di incidenza della malattia, che nel 1950 era definita come rara, deriva da diverse cause: invecchiamento della popolazione, fumo di tabacco, scarsa attività fisica, obesità e preponderanza di errate abitudini alimentari. Anche in alcune sindromi neoplastiche familiari è evidente l’incremento del tasso di incidenza della malattia, infatti è oggi la manifestazione predominante della sindrome di Lynch (una tipologia ereditaria di neoplasia del colon di tipo non polipoide), mentre nel passato i portatori di questa sindrome erano prevalentemente colpiti da neoplasia gastrica.^{5,6,7}

I tassi d’incidenza di CCR sono simili negli uomini e nelle donne fino a circa 45 anni, successivamente per i maschi raggiungono valori più elevati rispetto a quelli delle femmine. Secondo le stime del GCO (Global Cancer Observatory)³, il CCR inizia ad assumere un ruolo rilevante intorno ai 49 anni.

L'incidenza del CCR aumenta progressivamente all'aumentare dell'età: il 6-8% dei casi viene diagnosticato in persone con meno di 40 anni, mentre il 90% dei casi viene diagnosticato in individui con età superiore ai 55 anni, nei quali il carcinoma è localizzata soprattutto a livello del sigma e del retto.

In età compresa tra i 30 ed i 50 anni vengono diagnosticati 50 casi di CCR ogni 100.000 abitanti/anno, dato che aumenta fra 50 e 70 anni a 100 ed arriva nelle età più avanzate a circa 250. Al momento della diagnosi il 10% dei soggetti ammalati ha un tumore in situ, il 30% ha diffusione locale, il 30% regionale e un altro 30% ha una localizzazione metastatica.⁸

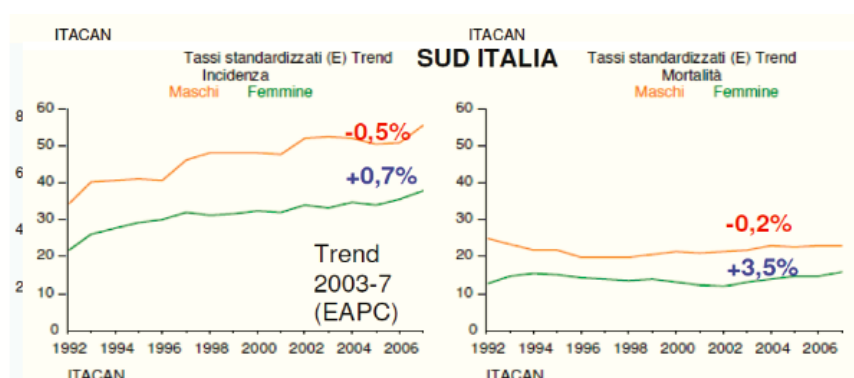
In Italia la stima della sopravvivenza relativa (corretta per la quota di mortalità dovuta ad altre cause) ad uno, tre e cinque anni dalla diagnosi risulta essere del 66%, 52% e 47% per il colon e del 72%, 51% e 43% per il retto, senza particolari differenze tra uomini e donne.

Le informazioni sull'incidenza e sulla mortalità per CCR in Italia sono disponibili grazie ai registri di popolazione dei tumori, variamente dislocati sul territorio.

Un confronto geografico indica tassi d'incidenza più elevati nelle aree del centro-nord rispetto a quelle meridionali sia per i maschi che per le femmine.

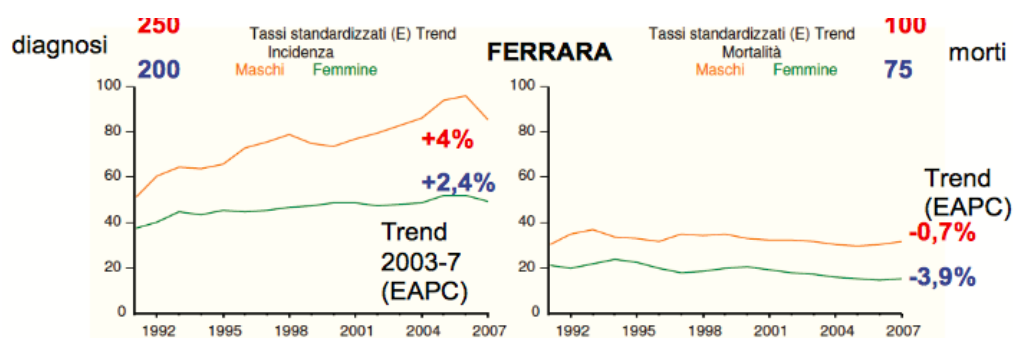
Si evincono anche tassi di incidenza e mortalità lievemente superiori nel sesso femminile (Figura 1), in cui il CCR, sia primitivo che recidivo, può assumere particolare gravità nei casi d'invasione degli organi genitali che comportano la necessità d'interventi chirurgici impegnativi e con sopravvivenza a 5 anni stimata non superiore al 50%.

FIGURA 1. Tassi di incidenza e mortalità per CCR nel Sud Italia Fonte ITACAN: associazione italiana registro tumori (*European Association for Palliative Care, EAPC*)



In Emilia-Romagna, nel 2016, sono stati stimati 4130 nuovi casi di adenocarcinoma coloretale, 2253 diagnosticati nella popolazione maschile e 1877 nella femminile. Il dato è in linea con i valori nazionali. Il quadro della mortalità per CCR presenta all'interno della Regione una discreta variabilità: si passa da 25 decessi ogni 100.000 abitanti a Reggio Emilia ai 46 decessi di Ferrara (Figura 2).⁹

FIGURA 2. Tassi di incidenza e mortalità per CCR nel Sud Italia Fonte ITACAN: associazione italiana registro tumori (*European Association for Palliative Care, EAPC*)



Anche in Emilia-Romagna l'incidenza della neoplasia è strettamente correlata l'età e prima dei 40 anni non risulta avere alti tassi di incidenza ed è abbastanza raro.¹⁰

Dalla (Tabella 1) si rileva un sostanziale aumento del CCR in entrambi i sessi a partire dai 50 ai 69 anni.

Tabella 1: Prime cinque cause di morte oncologica e proporzione sul totale dei decessi per tumore per sesso e fascia d'età

Rango	Maschi			Femmine		
	Età			Età		
	0-49	50-69	70+	0-49	50-69	70+
1°	Testicolo (12%)	Prostata (22%)	Prostata (19%)	Mammella (41%)	Mammella (35%)	Mammella (22%)
2°	Melanomi (9%)	Polmone (14%)	Polmone (17%)	Tiroide (15%)	Colon-retto (11%)	Colon-retto (16%)
3°	Tiroide (8%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (14%)	Melanoma (7%)	Polmone (7%)	Polmone (8%)
4°	LNH (7%)	Vescica* (11%)	Vescica* (12%)	Colon-retto (4%)	Utero corpo (7%)	Pancreas (6%)
5°	Colon-retto (7%)	Vie areodigestive superiori** (5%)	Stomaco (5%)	Utero cervice (4%)	Tiroide (5%)	Stomaco (5%)

* Comprende sia tumori infiltranti sia non infiltranti.

** Comprende bocca, lingua, orofaringe, rinofaringe, ipofaringe, faringe NAS, laringe.

Per quanto riguarda l'epidemiologia gli adenomi ad alto rischio (Tabella 2), che sono ormai riconosciuti come i precursori tumorali del CCR, i dati sono molto più incerti in quanto la loro

presenza è normalmente asintomatica e si rileva soltanto in occasione di esami endoscopici e, fino ad oggi, sono state poche le popolazioni asintomatiche sottoposte ad esame endoscopico.

Tabella 2. Definizione di adenoma ad “alto rischio”.

1. diametro > 10 mm
2. almeno il 25% di componente villosa
3. displasia di grado elevato (comprendente anche le dizioni di carcinoma intramucoso o “in situ”)
4. cancro invasivo (che ha superato la muscolaris mucosae)

Poiché la storia naturale del CCR è caratterizzata nel 90% dei casi da una lenta progressione dalla forma pre-maligna di polipo a quella di tumore (Figura 3), quando la diagnosi di CCR viene effettuata precocemente, la neoplasia del carcinoma del colon-retto si associa ad un tasso di curabilità di circa il 90%,

È stata pertanto decretata la necessità di sviluppare strategie volte soprattutto a prevenire la formazione del tumore.

Poiché la prevenzione primaria, basata prevalentemente su misure di igiene alimentare, è di difficile attuazione, quella di tipo farmacologico non rientra ancora nella pratica clinica, le ricerche di carattere genetico per individuare i soggetti a rischio sono ancora in fase di studio, la miglior prevenzione possibile, attualmente, risulta essere quella che viene definita secondaria.

Quindi un efficiente programma di Screening di popolazione, definita come prevenzione secondaria, è fortemente auspicabile per prevenire e diminuire le morti ad esso correlate^{11,12,13}

Figura 3. Progressione dalla forma pre-maligna di polipo a quella di CCR.

A adenoma sessile

B adenoma avanzato

C carcinoma ulcerato

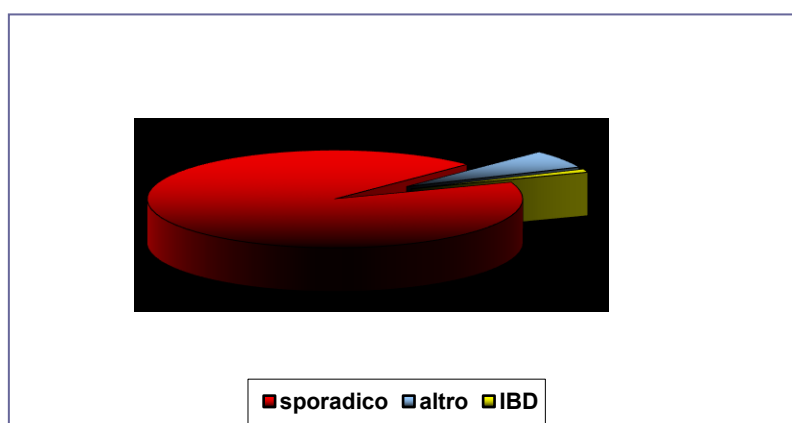


1.2- Fattori di rischio

Ancora oggi, nonostante l'avvicinarsi di numerosi studi, l'etiologia del carcinoma del colon-retto risulta essere un'incognita. Circa il 75% dei casi di CCR si manifesta per cause definite sporadiche, mentre il restante 25% circa è legato a specifici fattori di rischio che caratterizzano tale patologia (Figura 4). Sono stati individuati diversi fattori di rischio che possono essere correlati alla sua insorgenza:

1. fattori ambientali;
2. fattori genetici;
3. malattie infiammatorie croniche intestinali;
4. familiarità.

Figura 4. Insorgenza CCR: sporadico 93-95 %; ereditario 5-6% (FAP, HPNCC), IBD (RCU>MC).



1 Fattori ambientali

I fattori ambientali a volte possono esser associati ad un aumentato rischio di CCR, altre volte sono valutati protettivi nei confronti della neoplasia coloretale.

A- Fattori ambientali associati ad un aumento del rischio di CCR:

Questi fattori sono per la maggior parte di natura alimentare, associati per lo più alla dieta occidentale.

Per dieta occidentale si intende una dieta ricca di grassi animali e la dieta ipercalorica che, secondo alcune ipotesi, stimolerebbero la carcinogenesi in vario modo:

1. una dieta ricca di grassi stimola la produzione di acido colico, di acidi biliari e chenodesossicolico che, per opera del microbiota intestinale, diventano rispettivamente desossicolico e litocolico, che risultano correlati con la carcinogenesi del CCR;¹⁴
2. gli acidi grassi in combinazione con gli acidi biliari sono in grado di stimolare la divisione delle cellule epiteliali della mucosa del colon¹⁴;
3. l'esposizione delle proteine animali alle alte temperature della cottura induce la ciclizzazione degli amminoacidi con la formazione di composti ad alto potere mutageno¹⁵;
4. alcuni acidi grassi risultano essere in grado di attivare il protooncogene RAS attraverso la via di sintesi del colesterolo.¹⁵

Tra i fattori ambientali non alimentari associati ad un aumentato rischio di CCR si includono l'utilizzo abituale di alcool e il fumo di sigaretta, che sembrerebbe favorire lo sviluppo del cancro in entrambi i sessi.

Per quanto riguarda l'utilizzo di alcool il meccanismo di cancerogenesi è legato alla degradazione dell'alcol in acetaldeide, a sua volta correlata alla degradazione di folati. I folati sono fondamentali nella sintesi e nella riparazione del DNA, pertanto un loro deficit determina una ridotta capacità ripartiva e un aumento dei danni del DNA, con conseguente incremento del rischio di carcinogenesi.¹⁶

Per quanto riguarda l'assunzione di fumo di sigaretta il meccanismo di cancerogenesi è imputabile al fatto che il sistema circolatorio diffonde anche a livello colico i cancerogeni contenuti nel fumo di sigaretta inducendo infiammazione, mutagenesi e per l'appunto carcinogenesi.¹⁷

B- Fattori ambientali protettivi per lo sviluppo di CCR

Tra le ipotesi di un ruolo positivo nella prevenzione del CCR vi sono le fibre, l'olio di pesce, la vitamina D ed il calcio.

1. Le fibre permetterebbero di aumentare la massa fecale e di diluire le sostanze cancerogene in un maggior quantitativo di acqua e quindi accelerare il loro transito intestinale. Le fibre possono anche agire come substrato per la fermentazione batterica con conseguente incremento della massa batterica e produzione di acidi grassi a catena corta, come il butirato. Quest'ultimo ha dimostrato, in vitro, di avere un effetto anticarcinogenetico e di stimolare l'epitelio colico.

2. L'olio di pesce risulterebbe efficace nel bloccare la progressione del tumore del colon, riducendone altresì l'incidenza.¹⁸
3. L'assunzione giornaliera di 1000 UI di vitamina D sembrerebbe ridurre il rischio di tumore del colon del 50%¹⁹ e l'assunzione di 1250 mg/die di calcio sembrerebbe essere in grado di ridurre significativamente il rischio di CCR poiché capace di rallentare la proliferazione dell'epitelio colico e di neutralizzare gli acidi biliari.¹⁹
4. L'assunzione di acido acetilsalicilico sembrerebbe avere un ruolo protettivo nei confronti dell'insorgenza del CCR: alcuni studi hanno dimostrato che chi assume aspirina almeno 2 volte a settimana ha un minor tasso d'incidenza di CCR rispetto a chi ne fa un uso inferiore. Si ipotizza che il meccanismo alla base di tale risultato, riguardi l'inibizione della cicloossigenasi-2 e quindi di quei meccanismi di carcinogenesi, basati su flogosi e proliferazione cellulare.²⁰

2 Fattori genetici

I tumori colon-rettali di sicura origine genetica, di tipo autosomico dominante, sono:

A. poliposi Adenomatosa familiare (FAP);

B. cancro colo-rettale ereditario non su poliposi (Sindrome di Lynch, HNPCC).

Queste due patologie costituiscono il 5-6% dei casi di cancro del colon-retto.

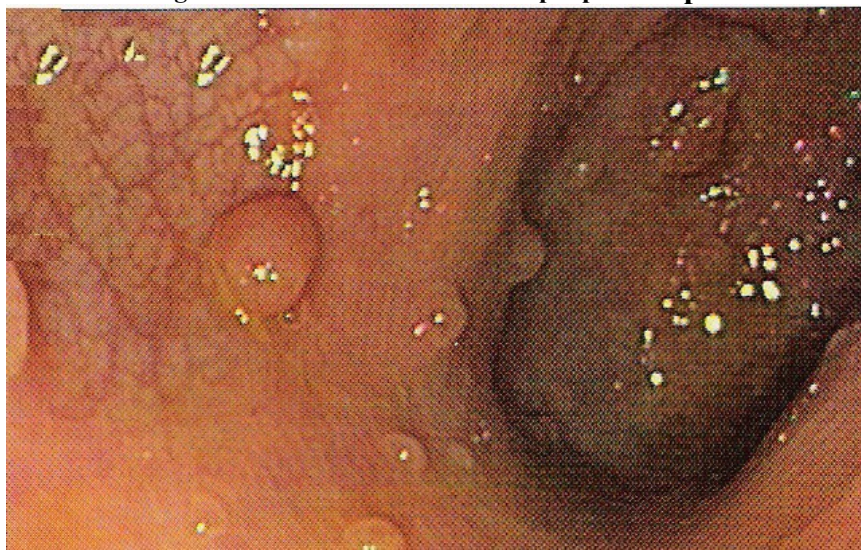
A. La FAP

La Poliposi Adenomatosa familiare è caratterizzata dallo sviluppo di numerosi polipi adenomatosi, almeno 100, in alcuni casi migliaia, (Figura 5) che tappezzano l'intero intestino. La FAP si manifesta anche con manifestazioni extracoliche quali adenomi duodenali, iperpigmentazione retinica, tumori dermoidi, osteomi del cranio e della mandibola. Il tratto fenotipico si manifesta tra i 10 e 15 anni e se non viene trattata la Poliposi Adenomatosa familiare evolve in cancro del colon-retto nel 100% dei casi. Nella maggioranza dei casi, il difetto genetico è rappresentato da una mutazione del gene APC su braccio lungo del cromosoma 5.

APC: è un gene presente nell'85% dei tumori e la sua mutazione determina l'inattivazione del gene, con conseguente inibizione della degradazione dell'oncoproteina β -catenina.¹³

Altre patologie associate a diverse mutazioni dello stesso gene, oltre alla FAP, sono la *sindrome di Gardner* e la *sindrome di Turcot* (associata anche al gene MLH1); entrambe sono associate a lesioni neoplastiche extraintestinali, rispettivamente tumori desmoidi e osteomi mandibolari per la prima, e tumori cerebrali (medulloblastoma e glioblastoma) per la seconda. Esiste inoltre, la *poliposi adenomatosa familiare attenuata*, caratterizzata da meno di 100 polipi e legata alla mutazione dell'estremità 5' del gene.²¹

Figura 5. FAP: mucosa colica con polipi multipli.



B. L'HNPCC o Sindrome di Lynch

L'HNPCC si può manifestare in due forme:

tipo 1: assenza di storia familiare di cancro;

tipo 2: associazione di storia familiare di altri tipi di cancro.

In particolare, il tipo 2 deve essere sospettato se:

- CCR è presente in più di una generazione, senza apparente salto di generazione;
- insorgenza del carcinoma in uno o più familiari prima dei 50 anni;
- localizzazione prevalente nel colon destro e sviluppo di più di un tumore colo-rettale;
- insorgenza anche di carcinomi cerebrali, gastrici, epatobiliari, dell'endometrio o dell'apparato urogenitale nello stesso soggetto o in altri membri della famiglia.^{6, 13}

L'HNPCC origina, in circa il 95% dei casi, da mutazioni localizzate nel sito hMLH1 e hMSH2 dei geni MMR (mismatch repair).

MMR: geni del mismatch repair (MLH1, MSH2, MSH6), risultano mutati nel 100% dei tumori associati al *cancro colon-rettale ereditario non poliposico* (HNPCC) e nel 15% dei tumori sporadici.

Questa mutazione, ereditaria o acquisita, inattiva i geni responsabili della riparazione del DNA, con conseguente accumulo di mutazione oncogenetiche ed inattivazione di geni oncosoppressori.

Le mutazioni che possono essere correlate alla comparsa della patologia neoplastica del colon-retto, i principali geni mutati oltre a APC e MMR sono molteplici:

1. PTEN: mutazione che determina una perdita dell'inibizione del segnale proliferativo mediato dalla PI3K.¹² È la mutazione responsabile della comparsa della *sindrome di Cowden*, caratterizzata da amartomi multipli che interessano oltre al tratto gastrointestinale, la mammella, la tiroide, la cute, il cervello. La mutazione è presente nel 10-15% dei tumori.¹³
2. BRAF: produce un'attivazione costitutiva della proteina con attivazione della stessa via di segnale di KRAS. La mutazione è presente nel 8-10% dei casi.¹³
3. P53: determina la perdita dei meccanismi di regolazione del ciclo cellulare.¹³ La mutazione o la delezione sono presenti nel 35-55% dei tumori.
4. SMAD4: causa l'inattivazione con inibizione del segnale soppressivo sulla crescita cellulare mediato da TGF- β 4. Il gene risulta alterato nel 10-35% dei tumori.
5. TGFRB2: determina l'inattivazione del recettore per il TGF- β 4. La mutazione è presente nel 25-30% dei carcinomi.
6. Complesso RAS: rende il gene funzionalmente attivo, con conseguente attivazione dei segnali di proliferazione e sopravvivenza cellulare e inibizione dell'apoptosi.¹² Circa il 40% delle mutazioni interessa i codoni 12 e 13 dell'esone 2 di KRAS, mentre circa il 10% è costituito da quelle che sono definite le nuove mutazioni di RAS (esoni 3 e 4 di KRAS, esoni 2 3 e 4 di NRAS). La mutazione è presente nel 40-50% dei carcinomi.²²

3 Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali

Alcune malattie infiammatorie intestinali, come retto-colite ulcerosa (RCU) e morbo di Crohn, sono associate ad un rischio circa 10 volte superiore di neoplasie del colon-retto rispetto alla popolazione generale.²³ Queste patologie contribuiscono allo sviluppo di nuovi casi per l'1%

circa. Il grado di rischio è legato soprattutto alla presenza di aree di displasia, moderata o severa e all'estensione della malattia. Il grado di rischio aumenta del 10-20% ogni 10 anni e di ben il 50% a partire dalla quarta decade.

4 Familiarità

Anche una familiarità neoplastica per CCR ha un ruolo importante, il rischio di sviluppare il tumore risulta, infatti, raddoppiato rispetto alla popolazione generale nel caso in cui sia presente un consanguineo di I grado (padre, madre, figli, fratelli e sorelle) e triplicato qualora in quest'ultimo il tumore sia insorto prima dei 50 anni²⁴ in assenza di alterazioni genetiche.

1.3 - Gradi di rischio

Considerando i fattori di rischio sopraelencati, è possibile suddividere in 3 gradi il rischio di sviluppo di CCR:

Basso: soggetti di ambedue i sessi, al di sopra di 50 anni di età, asintomatici, che non presentano fattori di rischio personali o familiari.

Moderato: soggetti con una storia personale o familiare di polipi adenomatosi o di CCR.

Alto: soggetti con storia familiare di FAP, HNPCC e con storia personale di IBD in particolare la RCU di lunga durata.

La Tabella 3 riporta il rischio cumulativo in relazione all'età, in assenza di altri fattori di rischio ed in assenza di sintomi.

Tabella 3. Rischio cumulativo in relazione all'età.

Età	Rischio di ammalare di CCR entro i prossimi			
	5 anni	10 anni	15 anni	20 anni
30 anni	1 /7000	1/2000	1/700	1/350
40 anni	1/1200	1/400	1/200	1/90
50 anni	1/300	1/100	1/50	1/30
60 anni	1/100	1/50	1/30	1/20
70 anni	1/65	1/30	1/20	1/15
80 anni	1/50		1/25	

1.4 - Presentazione clinica e diagnosi

Prima di descrivere i possibili quadri clinici, che si possono riscontrare in caso di tumore del colon-retto, è necessario precisare che il 70% dei tumori insorge a livello del sigma-retto poi, in ordine decrescente di frequenza, si localizza nel colon destro (cieco e ascendente) (15% dei casi), nel colon trasverso (10% dei casi) e nel colon discendente (5% dei casi).¹⁴

Il CCR risulta essere nella maggior parte dei casi asintomatico e i pazienti tendono a sottostimare la gravità delle loro condizioni. Quando è presente la sintomatologia è varia e dipende da diversi fattori quali la *sede d'insorgenza*, l'*estensione* della lesione e da eventuali *complicanze* (emorragia, occlusione o perforazione intestinale). Quando le lesioni si localizzano nei tratti di destra sono prevalentemente di tipo vegetante e danno più frequentemente sintomi aspecifici come stanchezza, anemia, anoressia e dolore ai quadranti inferiori dell'addome e difficilmente danno luogo ad occlusione intestinale. Quando le lesioni si localizzano nei tratti di sinistra sono, invece, prevalentemente stenosanti e danno origine a presenza di sangue nelle feci e a manifestazioni occlusive o subocclusive.²⁵

Un altro fattore fondamentale nel determinare la sintomatologia è la *diffusione* della malattia: strutture vicine come le anse intestinali del tenue, l'uretere e la vescica, lo stomaco o la prostata possono essere interessate.

Se si sospetta la presenza di CCR, oltre a raccogliere un'approfondita anamnesi personale e familiare del paziente, l'esame da prescrivere è senza ombra di dubbio la colonscopia ottica che è l'esame diagnostico più accurato.

La colonscopia consente di esplorare tutto il colon-retto, di individuare e localizzare la massa neoplastica e di effettuare la biopsia per la conferma istologica.

La colonscopia risulta essere allo stesso tempo diagnostica ed, in un discreto numero di casi, terapeutica, poiché consente di rimuovere i polipi adenomatosi, precursori del CCR.

Molti studi hanno documentato che specificità e sensibilità che sono nettamente superiori a tutte le altre metodiche attualmente disponibili (Tabella 4).

Tabella 4. Specificità e sensibilità nelle diverse metodiche di analisi per il CCR.

	Sensibilità	Specificità
Sangue Occulto per polipi	10%	90%
Sangue Occulto per cancro	40%	90%
Clisma Opaco per polipi/cancro	70%	98%
Sigmoidoscopia per polipi/cancro nel tratto esplorato	90%	98%
Colonscopia per polipi/cancro	90 – 98%	100%

Oggi in alternativa alla colonscopia per fare la diagnosi di CCR si può impiegare colonscopia virtuale ²⁶.

La colonscopia virtuale è una metodica radiologica non invasiva, descritta per la prima volta nel 1994 e di uso ormai consolidato nella pratica clinica, che consente di studiare la parete del colon simulando la colonscopia tradizionale. Essendo una simulazione computerizzata, a differenza della colonscopia tradizionale, la colonscopia virtuale viene condotta senza l'introduzione di sonde nel colon. La metodica non è pertanto invasiva, la superficie mucosa del colon viene evidenziata come in una animazione grafica, per questo motivo non è possibile eseguire procedure diagnostiche/terapeutiche quali la polipectomia. Si possono però evidenziare le irregolarità della superficie (come nel caso di polipi o tumori), buchi di parete (come nel caso di diverticoli), stenosi e ostruzioni del lume. La preparazione che deve eseguire il paziente prima di sottoporsi all'esame prevede l'assunzione per via orale, 3 ore prima di entrare in sala TAC, di un mezzo di contrasto iodato diluito in acqua (in casi selezionati è possibile somministrare il mezzo di contrasto iodato per via rettale). Con questa metodica si ottengono immagini tridimensionali molto simili all'immagine coloscopica convenzionale.

Quando, in caso di lesioni rettali, vengono richieste informazioni aggiuntive al fine di programmare correttamente l'iter terapeutico (distanza del CCR dal margine anale, coinvolgimento luminale, estensione longitudinale e circonferenziale), può esser utile sottoporre il paziente ad una rettoscopia.²⁶

In caso di rettorragia il primo esame eseguito dovrebbe essere l'esplorazione rettale importante soprattutto in caso di tumori del retto, poiché questa tecnica consente di mettere in evidenza in tempo reale lesioni situate entro i 6-7 cm dal margine anale.²⁶

In assenza di sintomi, ma in termini preventivi dopo i 50 anni d'età è utile effettuare la ricerca del sangue occulto nelle feci.

La tempestività della diagnosi, intesa sia come capacità di effettuare una diagnosi precoce che di “riduzione dei tempi di accesso” alla diagnosi clinica definitiva di neoplasia, rappresenta la premessa indispensabile per il raggiungere buoni risultati terapeutici sulla sopravvivenza e sulla qualità di vita. Il NHS (National Health Service) inglese declama come obiettivo “che tutti i pazienti che presentano sintomatologia di sospetta natura neoplastica possano poter accedere alla visita specialistica entro e non oltre le due settimane dal primo contatto con i servizi ed avere una diagnosi definitiva entro e non oltre un mese”.

1.5 - Istopatologia

In oltre il 90% dei casi il CCR origina da un precursore focale, displastico, polipoide: l'adenoma o polipo adenomatoso²⁷; solo in una piccola percentuale di casi (5-10%), soprattutto a livello del colon destro, il carcinoma sembra non essere preceduto da lesioni polipoidi (c.d. "carcinoma de novo").²⁸

I polipi si distinguono in neoplastici o non-neoplastici.

I neoplastici possono essere benigni o maligni, nella categoria dei neoplastici vi sono i polipi adenomatosi del colon-retto che interessano circa il 30% degli adulti nei paesi occidentali.

I polipi non neoplastici (polipi infiammatori, iperplastici e amartomatosi) si sviluppano a partire dal tessuto muscolare liscio della muscolaris mucosae e sembrano non avere potenziale maligno.

Il meccanismo attraverso il quale un adenoma del colon-retto può trasformarsi in carcinoma nel tempo è rappresentato dalla cosiddetta “sequenza adenoma-carcinoma”.

Le evidenze indirette che supportano tale ipotesi sono numerose:

1. raramente il CCR si sviluppa in assenza di un polipo adenomatoso;
2. la comparsa di un adenoma precede di molti anni (circa 10 anni) lo sviluppo del carcinoma nella stessa sede;
3. vi è la stessa distribuzione anatomica di polipi adenomatosi e cancri;
4. i soggetti con 1 o più polipi di dimensioni > 1 cm presentano un rischio maggiore di sviluppare un CCR;
5. la maggior parte dei CCR origina da grossi polipi situati nel colon sinistro;
6. i pazienti affetti da poliposi adenomatosi familiare (FAP) presentano un elevato rischio (fino al 100%) di sviluppare un CCR;

7. l'individuazione e l'asportazione dei polipi adenomatosi riduce in maniera significativa l'incidenza di CCR.

Gli adenomi vengono ritrovati in un circa ¼ della popolazione oltre i 50 anni di età: circa 2/3 delle lesioni sono localizzate nel retto-sigma e nel colon sinistro, 1/3 è localizzato oltre la flessura splenica. Un percentuale variabile dal 5 al 40% di pazienti con polipi adenomatosi sviluppa il cancro in un periodo di 10-15 anni, mentre il numero di adenomi che progredisce verso il tumore si aggira intorno al 2,5% l'anno.

Considerando questi dati è fondamentale avere un atteggiamento aggressivo nei confronti degli adenomi, per evitare la loro progressione. Le cause che esprimono la potenzialità maligna degli adenomi sono: tipo istologico, grado di displasia, dimensioni e numero di polipi.

Tipo istologico: la frequenza di trasformazione della forma villosa è di circa il 40%, della forma tubulo-villosa il 22%, della tubulare il 5% (Tabella 5).

I villi presentano diversi aspetti morfologici e si distinguono in:

1. villi classici: lunghi, sottili, con scarso delicato stroma e scarse ramificazioni. Solitamente si trovano disposti parallelamente tra loro, con la base che giunge fino alla muscolaris mucosae;
2. villi palmati: più ampi, fogliacei, ramificati, frequentemente presentano strutture tubulari alla base od anche nello stroma;
3. villi "foreshortened": non ramificati, sottili, che protrudono nettamente dal contorno di una lesione tubulare.

Tabella 5. Tipo istologico e localizzazione dei diversi tipi di adenomi

Variante istologica	Localizzazione	Rischio di degenerazione maligna
Adenomi tubulari (75%)	Tutto il colon	5%
Adenomi villosi (10%)	Prevalentemente nel retto	40%
Adenomi tubulo-villosi (15%)	Distribuiti in tutto l'intestino	15%

Grado di displasia: la definizione alto/basso grado si riferisce alle caratteristiche citologiche e al rischio evolutivo.

Basso grado: perdita del gradiente di differenziazione cellulare dalla base della cripta alla superficie; nuclei allungati, ingranditi, polarizzati e stratificati che occupano fino ai 2/3 dello spessore dell'epitelio.

Alto grado: perdita di polarità o stratificazione nucleare, nuclei distribuiti in tutto lo spessore dell'epitelio; nuclei marcatamente ingranditi, spesso con cromatina dispersa e prominente nucleolo; mitosi atipiche; assenza di secrezione mucipara; prominente apoptosi.

Dimensioni: i polipi di diametro > 1 cm hanno una potenzialità di trasformazione maligna superiore rispetto a quelli di dimensioni inferiori. Alcuni studi hanno mostrato la trasformazione in cancro in oltre il 10% dei polipi > 1 cm e meno dell'1% in polipi < 1 cm.²⁹

Numero dei polipi: il rischio di CCR aumenta se sono presenti polipi colici multipli.³⁰

Classificazione istologica WHO 2010 delle lesioni preneoplastiche neoplastiche del CCR

- 1 Lesioni premaligne Adenoma:
 - 1.1 Tubulare
 - 1.2 Villosa
 - 1.3 Tubulo-villosa
 - 1.4 Displasia (neoplasia intraepiteliale, basso grado)
 - 1.5 Displasia (neoplasia intraepiteliale, alto grado)
- 2 Lesioni serrate
 - 2.1 Polipi iperplastici
 - 2.2 Adenoma/polipo sessile serrato
 - 2.3 Adenoma serrato tradizionale
- 3 Amartomi
 - 3.1 Polipo associato a Sindrome di Cowden
 - 3.2 Polipi giovanili
 - 3.3 Polipi di Peutz-Jagher
- 4 Carcinomi
 - 4.1 Adenocarcinomi
 - 4.2 Adenocarcinoma cribriforme comedonico
 - 4.3 Carcinoma midollare
 - 4.4 Carcinoma micropapillare

- 4.5 Adenocarcinoma mucinoso
- 4.6 Adenocarcinoma serrato
- 4.7 Carcinoma a cellule ad anello con castone
- 5 Carcinoma adenosquamoso
 - 5.1 Spindle cell carcinoma
 - 5.2 Carcinoma a cellule squamose
 - 5.3 Carcinoma indifferenziato
- 6 Tumori Neuroendocrini
 - 6.1 Tumori neuroendocrini NET
 - 6.2 NET G1 (carcinoide)
 - 6.3 NETG2
 - 6.4 Carcinomi neuroendocrini NEC
 - NEC a grandi cellule
 - NEC a piccole cellule
 - 6.5 Carcinoma adenoneuroendocrino misto
 - 6.6 NET produttore serotonina
 - 6.7 NET produttore peptide glucagone-like e PP/PYY
- 7 Tumori mesenchimali
 - 7.1 Leiomioma
 - 7.2 Lipoma
 - 7.3 Angiosarcoma
 - 7.4 Gastrointestinal stromal tumor GIST o Sarcoma di Kaposi
 - 7.5 Leiomiosarcoma
- 8 Linfomi
- 9 Tumori secondari

1.6 - Stadiazione e classificazione del carcinoma del colon-retto

La formulazione della stadiazione è un momento molto importante nella diagnosi di un tumore, poiché in base ad essa è possibile formulare una prognosi e scegliere il tipo di trattamento più adatto al paziente.

Nel caso del carcinoma del colon-retto sono considerati criteri diagnostici minimi: l'istotipo, il grado di differenziazione, il budding tumorale, la profondità di invasione, la presenza di invasione venosa extramurale, la presenza di invasione linfo-vascolare intramurale e di invasione perineurale, i margini di resezione (distale, prossimale, circonferenziale e

mesocolico), il numero di linfonodi esaminati (almeno 12, tranne nei pazienti trattati con CRTT neoadiuvante) e il numero di linfonodi metastatici. Altri parametri che dovrebbero essere compresi nel referto sono: la dimensioni (diametro maggiore), la presenza di perforazione macroscopica, la distanza dal margine, resezione prossimale o distale più vicino, la distanza dal margine di resezione radiale (nel retto) e la stadiazione patologica (TNM o altro specificato). Oggi per la stadiazione delle neoplasie del colon-retto le linee guida AIOM consigliano di utilizzare la stadiazione TNM.

Nel tempo si sono succeduti diversi sistemi di stadiazione per il CCR, il primo fu introdotto da Dukes nel 1932 e fu successivamente modificato sia da Astler-Coller nel 1954 sia da Tumball nel 1967 fino ad arrivare a quello attualmente adottato attualmente negli Stati Uniti e in Europa, il TNM-UICC 2009 ³¹ riportato in Tabella 6.

Questo tipo di stadiazione include 3 parametri diversi per categorizzare la lesione neoplastica: la dimensioni del tumore ed entità dell'invasione locale *T* (tumore), il coinvolgimento dei linfonodi regionali (*N*) e la presenza di metastasi a distanza (*M*). I 3 parametri si combinano diversamente per ottenere lo *stadio* della neoplasia.

Il TNM è un sistema che consente contemporaneamente una classificazione clinica (pretrattamento) e una patologica (istopatologica postoperatoria). Le classificazioni si basano su tipi diversi di esami e perseguono scopi differenti. La classificazione clinica è detta cTNM, quella patologica pTNM. Quando TNM è indicata senza suffisso, ci si riferisce alla classificazione clinica. In generale, la classificazione cTNM costituisce la base per la scelta del trattamento, mentre la pTNM rappresenta la valutazione prognostica.

È stato inoltre, introdotto il prefisso “y” (yTNM) per indicare la stadiazione patologica dopo terapia neoadiuvante.

Tabella 6. Classificazione TNM-UICC 2009. Fonte: Linee Guida AIOM 2018.

Classe	Descrizione
Tx	Tumore primitivo non definibile
T0	Tumore primitivo non evidenziabile
Tis	Carcinoma in situ: intraepiteliale o invasione della lamina propria [comprende cellule tumorali confinate all'interno della membrana basale ghiandolare (intraepiteliale) o della lamina propria (intramucosa) che non raggiungono la sottomucosa]
T1	Tumore che invade la sottomucosa
T2	Tumore che invade la muscolare propria
T3	Tumore con invasione attraverso la muscolare propria nella sottosierosa o nei tessuti pericolici e perirettali non ricoperti da peritoneo
T4	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture e/o perfora il peritoneo viscerale
T4a	Tumore che perfora il peritoneo viscerale
T4b	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture
NX	Linfonodi regionali non valutabili
N0	Non metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in 1-3 linfonodi regionali
N1a	Metastasi in 1 linfonodo
N1b	Metastasi in 2-3 linfonodi
N1c	Depositi tumorali satelliti nella sottosierosa o nei tessuti non peritonealizzati pericolici e perirettali senza evidenza di metastasi linfonodali regionali
N2	Metastasi in 4 o più linfonodi regionali
N2a	Metastasi in 4-6 linfonodi
N2b	Metastasi in 7 o più linfonodi
MX	Metastasi a distanza non accertabili
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza
M1a	Metastasi confinate ad un organo (fegato, polmone, ovaio, linfonodi extraregionali)
M1b	Metastasi in più di un organo o nel peritoneo

Nota 1 Tis carcinoma in situ: intraepiteliale o invasione della lamina propria: le cellule tumorali sono confinate all'interno della membrana basale ghiandolare (intraepiteliale) o della lamina propria (intramucosa) e non raggiungono, attraverso la muscolaris mucosae, la sottomucosa. Sarebbe più corretto utilizzare il termine di (adeno)carcinoma in situ quando si parla di neoplasie intraepiteliali (che non superano la membrana basale) e di adenocarcinoma intramucoso quando invece è presente un'infiltrazione della tonaca propria (senza estensione oltre la muscolaris mucosae). Entrambi i tipi di neoplasia sono privi di potenziale metastatico: per questo motivo sarebbe preferibile utilizzare anche in questi casi il termine di displasia grave.

Nota 2 T4 tumore che invade direttamente altri organi o strutture e/o perfora il peritoneo viscerale: l'invasione diretta T4 comprende l'invasione di altri segmenti del colon-retto attraverso la sierosa. Se il tumore risulta aderente ad altri organi o strutture, macroscopicamente, viene classificato come T4; tuttavia, se in corrispondenza della zona di adesione non si riscontra

la presenza di neoplasia, deve essere classificato pT3. La sottostadiazione V e L si usa per identificare la presenza o l'assenza di invasione vascolare linfatica.

Suddivisione in stadi

Gli stadi I, II e III della classificazione TNM corrispondono rispettivamente agli stadi A, B e C della classificazione di Dukes (Figura 6 e Tabella 8). Nella classificazione TNM-UICC 2009 è stata introdotta negli stadi II, III e IV una suddivisione in sottogruppi ad indicare categorie di pazienti con prognosi progressivamente peggiore. In Tabella 7 è illustrata la Suddivisione in stadi in base ai criteri classificativi del sistema TNM-UICC 2009³¹ e a fianco la sopravvivenza a 5 anni in base allo stadio TNM VII.¹⁴

Tabella 7. Suddivisione in Stadi e sopravvivenza.

STADIO	DESCRIZIONE	SOPRAVVIVENZA A 5 ANNI (%)
Stadio 0	TisN0M0	
Stadio I	T1N0M0	92,5
	T2N0M0	
Stadio IIa	T3N0M0	83,6
Stadio IIb	T4aN0M0	76,3
Stadio IIc	T4bN0M0	58,8
Stadio IIIa	T1-2, N1a-c, M0	83,1
	T1, N2a, M0	
Stadio IIIb	T3, T4a, N1a-c, M0	63,8
	T2-3, N2a, M0	
	T1-2, N2b, M0	
Stadio IIIc	T4a, N2a-b, M0	35,2
	T3, N2b, M0	
	T4b, N1-2, M0	
Stadio IVa	Ogni T, ogniN, M1b	10,4
Stadio IVb	OgniT, ogniN, M1b	

Figura 6. Stadi e sopravvivenza.

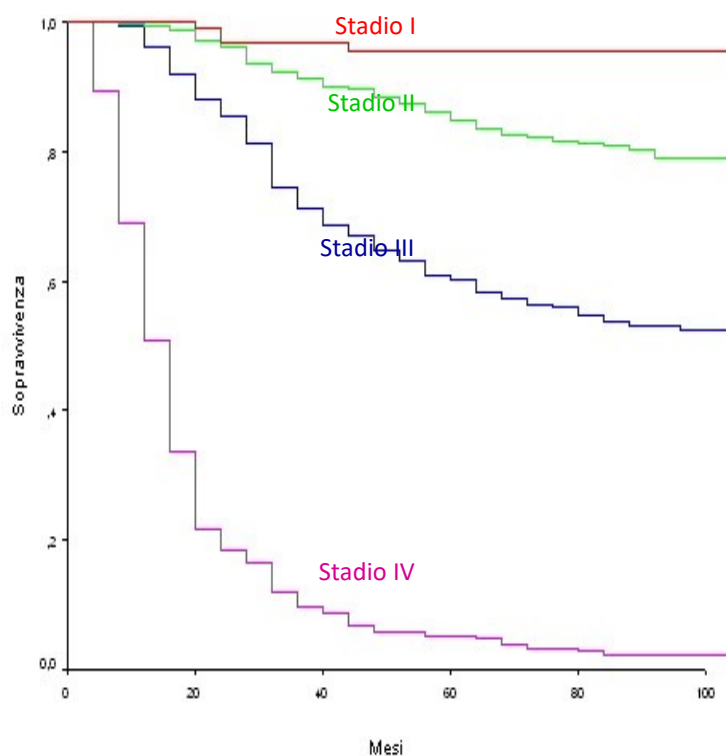


Tabella 8. Classificazione di Dukes e sopravvivenza a 5 anni.

STADIO	CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	SOPRAVVIVENZA A 5 ANNI
A	tumore limitato alla mucosa	100%
B1	il tumore si estende attraverso la muscolaris mucosae ma non attraverso la muscolaris propria	67%
B2	il tumore si estende oltre la muscolaris propria	54%
C1	stadio B1 con linfonodi regionali positivi	43%
C2	stadio B2 con linfonodi regionali positivi	22%
D	metastasi a distanza	-

Le Classificazione di Dukes, di Astler-Coller, il TNM, e la classificazione a stadi sono correlate e paragonate come mostrato in Tabella 9.

Tabella 9. Classificazioni a confronto.

STADIO	TNM			DUKES	ASTLER-COLLER
0	T is	N0	M0		
I	T1 o T2	N0	M0	A	A, B1
II A	T3	N0	M0	B	B2
II B	T4	N0	M0	B	B3
III A	T1 o T2	N1	M0	C	C1
III B	T3 o T4	N1	M0	C	C2, C3
III C	Ogni T	N2	M0	C	C1, C2, C3
IV	Ogni T	Ogni N	M1		D

Invasione vascolare

È importante individuare e segnalare l'eventuale invasione delle vene extramurali perché significativa per la prognosi.

La crescita del CCR può essere di tipo:

- espansiva, quando il margine di infiltrazione tumorale è regolare, ben demarcato o solo lievemente irregolare;
- infiltrativa, quando i margini di infiltrazione sono marcatamente irregolari e non ben identificabili. La crescita infiltrativa si associa a prognosi peggiore.

È caratteristica la presenza di elementi ghiandolari, o aggregati di cellule tumorali isolati nel tessuto adiposo periviscerale, localizzati in sede perivascolare o perineurale.

Per la stadiazione del CCR è richiesto l'impiego di diverse metodiche di indagine clinica; oltre a quelle descritte precedentemente (*colonscopia ottica, colonscopia virtuale, rettoscopia, esplorazione rettale ecc.*) ed all'esame istologico.

Le metodiche impiegate nella stadiazione del tumore colon-rettale sono¹⁴:

Ecografia: che verifica l'eventuale presenza di metastasi epatiche (più tipiche dei tumori del colon destro) e pertanto trova utilità anche in fase intra-operatoria (o la sonda transrettale per verificare l'invasione della parete del retto, informazione che permette di pianificare opportunamente la terapia).

Tomografia computerizzata (TAC): la TAC con mezzo di contrasto dell'addome e della pelvi è fondamentale nella stadiazione, perché consente di determinare l'eventuale invasione locale (grasso pericolico o strutture adiacenti), la presenza di metastasi epatiche, linfonodali e peritoneali.

Può essere utilizzata anche nella determinazione delle metastasi polmonari.

Radiografia standard del torace (RX): è molto meno sensibile della TAC nella determinazione di metastasi polmonari di piccole dimensioni, è però sufficiente per valutare l'eventuale presenza di un interessamento polmonare parenchimale e sieroso.

Risonanza magnetica (RM): risulta essere è più accurata della TAC nella determinazione dell'estensione del tumore primitivo e dell'invasione linfonodale nel tumore del retto (da preferire in caso di tumori cT3-4).

Dosaggio del CEA sierico: a causa della sua bassa sensibilità e specificità non è utile ai fini diagnostici, ma può essere utile nel follow-up come parametro di riferimento, poiché consente di confrontare il livello basale con quello riscontrato durante il decorso della patologia e durante la terapia, un suo aumento può segnalare la ripresa della malattia.

1.7 - Prognosi e cenni di terapia

L'atto chirurgico costituisce la terapia curativa nel trattamento di tutti i tumori primitivi del grosso intestino. L'obiettivo è l'eradicazione di tutta la malattia macroscopicamente individuabile e circa l'80% dei pazienti può essere trattato con un intervento chirurgico, che può essere conservativo, demolitivo parziale o condurre all'asportazione totale del tratto del colon o del retto. L'intervento chirurgico deve portare alla rimozione, più ampia possibile, della regione intestinale interessata dal tumore e delle relative stazioni linfonodali, e può essere effettuato con diverse modalità, in base alla sede della lesione: emicolectomia destra, sinistra, del colon trasverso e colectomia totale (asportazioni maggiori vengono eseguite in caso di interessamento delle flessure).¹⁴

In seguito all'intervento sono fondamentali altre modalità terapeutiche, come i trattamenti radioterapici e chemioterapici, attuate per ridurre il rischio di recidive.

L'integrazione di queste tre modalità terapeutiche (intervento chirurgico, chemioterapia e radioterapia) avviene tuttavia in modo diverso per i tumori del colon fino al retto superiore rispetto a quanto avviene per i tumori del retto extraperitoneale, perché caratterizzati da una diversa storia naturale e da una incidenza molto maggiore di recidive locali rispetto ai tumori dei distretti intestinali più a monte.

Considerando la maggiore incidenza di recidive locali e il rischio di sacrificio dello sfintere anale (che rappresenta la peggior prognosi) è generalmente necessario sottoporre il paziente ad un trattamento radiante o chemioradiante complementare che può seguire e/o precedere (trattamento neoadiuvante) l'intervento chirurgico. Il 60% dei tumori del retto si presenta localmente avanzato (interessamento a tutto spessore della parete o interessamento linfonodale, cT3-4, N+). La TME (Total Mesorectal Excision) prevede la laparotomia, la mobilizzazione di tutto il colon sinistro e del retto, l'asportazione del tumore rettale insieme al tratto sigmoideo del colon e la successiva ricostruzione.³¹

In generale, nonostante l'intento radicale, dopo l'intervento chirurgico per CCR circa il 35% dei pazienti sviluppa una recidiva, l'80% entro i primi 2 o 3 anni, comunque entro i 5 anni dall'intervento, mentre recidive successive compaiono in meno dello 0.5% dei casi. Le sedi più frequenti di ripresa di malattia sono fegato, linfonodi addominali, peritoneo e polmone.³²

Per questo motivo, oltre alla terapia chirurgica, deve essere considerata l'applicazione di uno schema chemioterapico adiuvante. Le recidive locali sono rare nel cancro del colon.

La scelta delle modalità terapeutiche (chemioterapia e radioterapia) da impiegare in caso di CCR e del timing per la loro integrazione dipende dallo stadio.

I stadio (T₁₋₂N₀M₀): in questo stadio la terapia adiuvante non viene somministrata, poiché non vi sono evidenze di beneficio circa il suo impiego. Dopo un'exeresi radicale di una lesione allo stadio I ci si può aspettare una sopravvivenza a 5 anni superiore al 95%.

II stadio (T₃₋₄N₀M₀): in questo stadio il suo impiego è controverso; il trattamento potrebbe trovare impiego nei pazienti con fattori prognostici negativi (grado G3, infiltrazione degli organi vicini-T4b, perforazione, occlusione, meno di 12 linfonodi analizzati, infiltrazione vascolare, linfatica e perineurale, significato controverso del livello di CEA preoperatorio). La 5-FU (fluoruracile), chemioterapico appartenente alla famiglia degli antimetaboliti, apporta un beneficio assoluto del 3-4%, anche se sembra che il valore sia in aumento, per una migliore selezione dei pazienti. Per questi pazienti la sopravvivenza a 5 anni è del 70-80%.

III stadio (T₁₋₂N₁M₀, T₃₋₄N₁M₀, T₁₋₄N₂M₀): in questo stadio la terapia adiuvante è indicata in modo univoco e porta ad una diminuzione del rischio relativo di morte del 33%, con un

beneficio complessivo sulla sopravvivenza del 10%-15%. Essa si basa sulla somministrazione, entro 6 settimane dall'intervento, per 6 mesi di 5-fluorouracile e acido folinico con eventuale aggiunta di oxaliplatino. Per questi pazienti la sopravvivenza a 5 anni è del 40-50%.³³

Stadio IV (avanzato): I pazienti con tumori allo stadio IV sono candidati ad un trattamento chemioterapico finalizzato a palliare i sintomi, a migliorare la qualità della vita e a prolungare la sopravvivenza. In alcuni casi selezionati non è del tutto esclusa la possibilità di ottenere una guarigione. La chemioterapia ha dimostrato di essere efficace nell'aumentare la sopravvivenza dei pazienti con malattia avanzata o metastatica.³³

1.8 - La prevenzione del cancro del colon-retto

Studi genetici ed epidemiologici suggeriscono che lo sviluppo del CCR rappresenta il risultato di complesse interazioni tra fattori ereditari e ambientali.

Secondo una relazione della Commissione europea del 2008 sulla diffusione dei programmi di screening per il cancro del colon-retto nell'UE, solo 12 degli allora 22 Stati membri avevano programmi di screening di popolazione.³⁴

Grazie al lavoro delle Società di Gastroenterologia e di Endoscopia digestiva che hanno fortemente stimolato le Istituzioni, locali e Nazionali, ad impegnarsi nel progettare specifiche campagne di informazione e di educazione sugli stili di vita e sulla promozione della salute anche in Italia, tra le molteplici strategie messe in atto per il controllo del CCR, la prevenzione ha acquistato sempre maggiore rilevanza.

Possiamo considerare 3 forme di prevenzione del CCR:

Prevenzione Primaria: si riferisce ad interventi applicati alla popolazione generale “sana”, a basso rischio di malattia. Numerosi studi sostengono che almeno 2/3 dei casi di CCR potrebbero essere prevenuti con cambiamenti della dieta e dello stile di vita. Nella prevenzione primaria rientra anche la “chemioprevenzione”, ovvero quei trattamenti farmacologici in grado di interferire con i processi di carcinogenesi, sia nella loro fase iniziale che in quella più avanzata.

Prevenzione Secondaria: si avvale di test di screening e di sorveglianza indirizzati rispettivamente alla popolazione asintomatica. I programmi di prevenzione secondaria hanno come obiettivo l'individuazione in fase precoce del CCR e il riconoscimento e l'asportazione delle lesioni adenomatose.

Prevenzione terziaria: è rivolta a prevenire le complicanze del cancro (ricidiva, invasione, metastasi) in soggetti con malattia sintomatica, attraverso l'utilizzo di presidi farmacologici.

1.9 - Definizione di screening, case finding, sorveglianza e razionale dello screening

I programmi di screening organizzati sono interventi di Salute Pubblica condotti su una popolazione, in specifiche fasce di età, che viene attivamente invitata (con scadenze regolari) ad effettuare un esame di comprovata efficacia nell'individuare la presenza di una lesione cancerosa o pre-cancerosa. L'obiettivo di uno screening oncologico è quello di identificare in tumore in fase precoce perché è noto che tanto più è precoce la diagnosi, tanto maggiore è la possibilità di cura.

Per *case finding* s'intende lo screening dei soggetti che afferiscono al Medico di Medicina Generale (MMG) o ad una qualsiasi struttura sanitaria per sintomi o condizioni non in rapporto con il cancro colo-rettale.

Per *sorveglianza* s'intende il monitoraggio attivo dei pazienti che hanno avuto in precedenza diagnosi di malattie neoplastiche o preneoplastiche del colon-retto o in cui è stata identificata una condizione di rischio aumentato.

Il *razionale* di uno screening oncologico di popolazione è basato sulle seguenti considerazioni:

- 1) la malattia è un problema di salute pubblica che coinvolge un elevato numero di persone;
- 2) vi è la possibilità di effettuare una diagnosi precoce, ovvero è possibile diagnosticare la presenza di lesioni precancerose e/o il tumore in stadi precoci;
- 3) vi sono dei vantaggi nel trattamento terapeutico effettuato durante lo stadio precoce della malattia (diminuzione della mortalità e/o dell'incidenza e dei costi) rispetto al trattamento in uno stadio tardivo;
- 4) è possibile avvalersi di un test ben accettabile dalla popolazione invitata allo screening. Il test deve essere innocuo, facile da eseguire, ripetibile ed economico;
- 5) sono presenti sul territorio strutture sanitarie qualificate in grado di effettuare la diagnosi e la terapia.

Il carcinoma colo-rettale risponde a tutti questi criteri perché:

- 1) è il secondo tumore in termini d'incidenza e la prima causa di morte nei non fumatori per entrambi i sessi. In E-R, ogni anno, sono circa 3.000 le persone che si ammalano di cancro al colon-retto, il più diagnosticato negli uomini dopo prostata e polmone, e il secondo più diagnosticato nelle donne dopo mammella. Tra i tumori è la seconda causa di morte, sia negli uomini che nelle donne.

2) circa il 95% dei carcinomi origina dagli adenomi, ovvero da una lesione precancerosa, la cui asportazione interrompe la sequenza adenoma-carcinoma e determina la diminuzione della mortalità e dell'incidenza;

3) un CCR, se individuato in stadio precoce, può essere trattato in modo radicale con l'intervento chirurgico. La sopravvivenza a 5 anni è strettamente correlata allo stadio (1.7 Prognosi e cenni di terapia) e risulta essere del 90% allo stadio A di Dukes, del 50-60% allo stadio B, circa del 35% allo stadio C1 e meno del 10-15% allo stadio C2.

Studi clinici randomizzati^{34,35} e caso controllo hanno dimostrato che un programma di screening di popolazione organizzato è in grado di ridurre l'incidenza ed in maggior misura la mortalità per cancro CCR: l'efficacia varia dal 15 al oltre il 30% in relazione alla metodica utilizzata.

I risultati ottenuti in questi anni dal programma di prevenzione hanno anche dimostrato che al progredire dei round di screening aumenta il numero di lesioni diagnosticate ad uno stadio precoce (pT1) rispetto a quelle avanzate.

Nello schema è evidenziato che vi è anche un notevole vantaggio economico, per il SSN e per il SSR, nel trattamento in fase precoce della malattia.

FIT + Colonscopia + polipectomia = € **500** per caso guarito.

FIT + Colonscopia + emicolectomia = € **5-8000** per caso guarito

Emicolectomia + chemioterapia adiuvante = € **12-14000** per caso guarito

Emicolectomia + chemioterapia palliativa = € **25-45000** per incremento sopravvivenza di 12-30 mesi

Chemioterapia palliativa + farmaci biologici = € **40-60000** per incremento sopravvivenza di 12-30 mesi

4) Il test per la ricerca di sangue occulto fecale (FIT) ha dimostrato caratteristiche d'impiego idonee allo screening di popolazione: economico, semplice, non invasivo.

5) In Italia, su tutto il territorio nazionale, sono presenti strutture di riferimento in grado di assicurare livelli ottimali di trattamento.

In sintesi: i benefici dello screening di prevenzione del carcinoma del colon-retto sono molto superiori agli eventuali danni (complicanze).



1.10 - Programma di screening per la prevenzione dei tumori del colon-retto in E-R e a Ferrara

Le Raccomandazioni del Consiglio d'Europa del 2003 e le Linee guida ministeriali indicano come popolazione target per il programma di screening colorettales la fascia di età compresa tra i 50 e i 69 anni che viene invitata ad eseguire il test di ricerca di sangue occulto nelle feci ogni 2 anni.

Lo screening di prevenzione del tumore del colon-retto oggi è presente in tutta Italia seppur con aderenze diverse tra le varie regioni (Figura 7).

Figura 7. Attivazione dei programmi di screening nelle diverse regioni italiane.



	programmi attivati
	progetti in fase di attivazione

L'estensione dello screening in Italia mostra una costante espansione: nel solo 2017 sono state invitate circa 6 milioni e 250 mila persone (300 mila in più rispetto al 2016)³⁶ raggiungendo il 78,3% della popolazione target. È necessario sottolineare che nonostante sia in espansione l'estensione dello screening di prevenzione del carcinoma del colon-retto risulta ancora sotto i limiti di accettabilità (80%) e desiderabilità (90%) richiesti dagli indicatori di qualità del GISCoR (Gruppo Italiano Screening COloRettale).

Lo screening per la prevenzione del tumore del colon-retto è stato introdotto nella Regione Emilia-Romagna il 21 Marzo 2005 e riguarda circa un milione di individui, residenti e domiciliati in Regione, compresi nella fascia di età 50-69 anni come mostrato in Tabella 10.

Tabella 10. Popolazione bersaglio, Test utilizzato, Frequenza di chiamata, Fasce d'età nello screening di prevenzione delle ASL della RER.

ASL	Pop.bersaglio	Test utilizzato	Frequenza	Fascia d'età
AUsl Piacenza	70,364	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Parma	101.709	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Reggio Emilia	110,722	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Modena	158.312	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Bologna	212.417	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Imola	30,488	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Ferrara	96.508	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Ravenna	96.220	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Forlì	45.074	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Cesena	47.292	FIT	Biennale	50 – 69
AUsl Rimini	69.315	FIT	Biennale	50 – 69
Totale	1.038.421			

In Emilia-Romagna nel 2017 gli inviti hanno raggiunto il 98,2% della popolazione target e nella provincia di Ferrara il 98.8%.³⁷

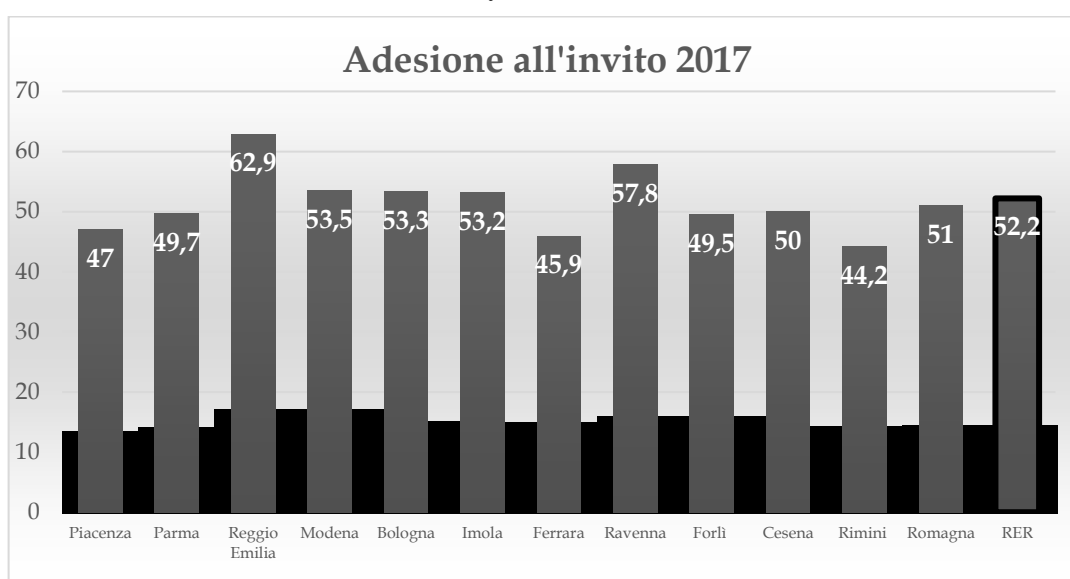
L'adesione all'invito a livello nazionale risulta di poco superiore al 40%, più precisamente 41,5%³⁶. Questo dato, che rappresenta il valore medio nazionale, risente in realtà in maniera limitante della scarsa adesione al programma delle regioni del Sud. Nelle regioni del Nord

infatti l'adesione all'invito è stata del 52%, in quelle del Centro del 35%, mentre in quelle del Sud del 24%.

In Emilia-Romagna l'adesione nell'anno 2017 è stata del 52,2 % e i valori più alti sono stati raggiunti dalla provincia di Reggio-Emilia con il 62,9% delle adesioni (Figura 8).

A Ferrara l'adesione nell'anno 2017 è stata del 45,9%.

Figura 8. Adesione corretta all'invito specifica per AUSL, totale inviti RER.
 [persone che eseguono il FIT (persone invitate – inviti inesitati – esclusione per test recente)]% Fonte:
 Survey GISCoR 2017.

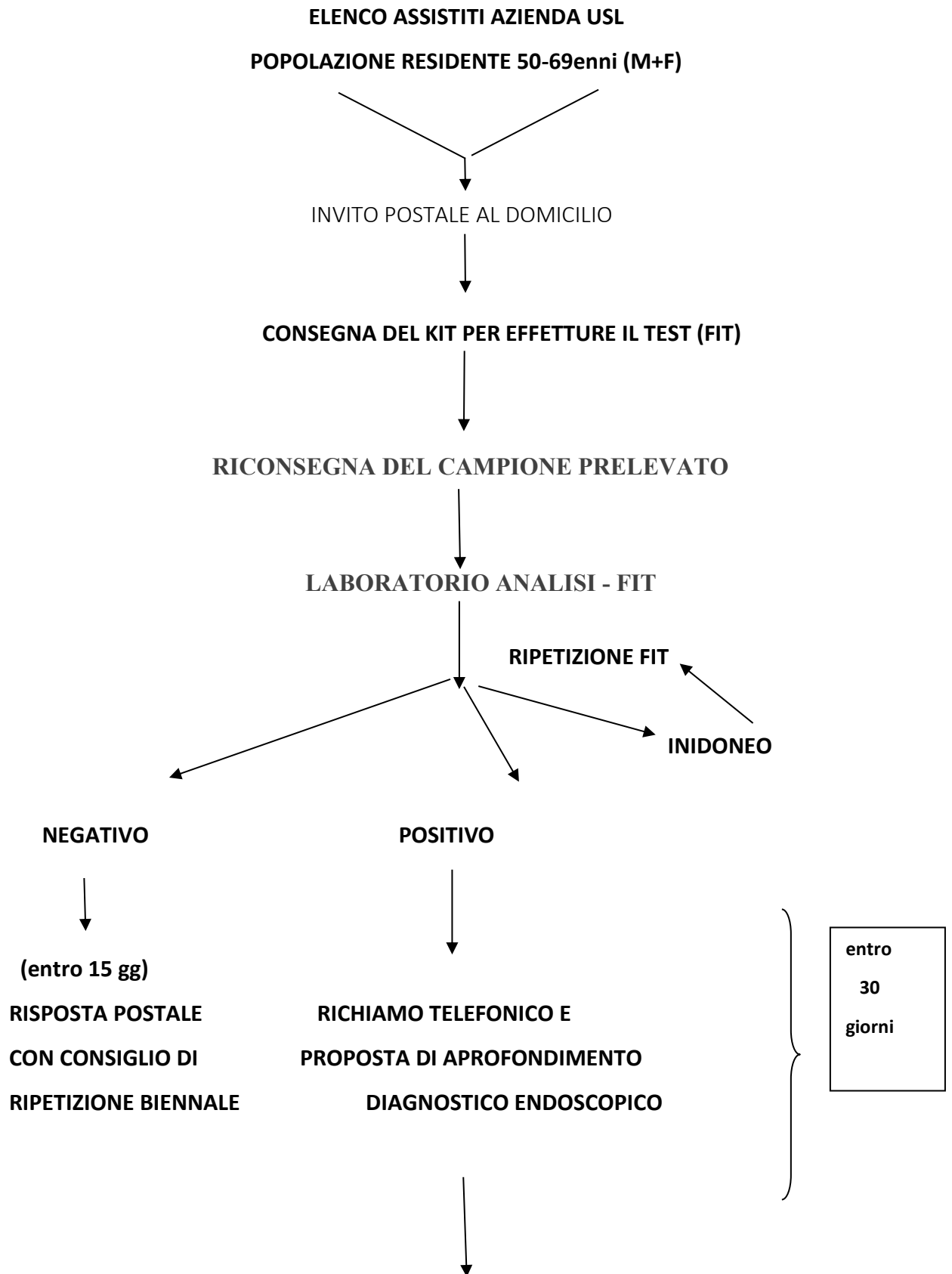


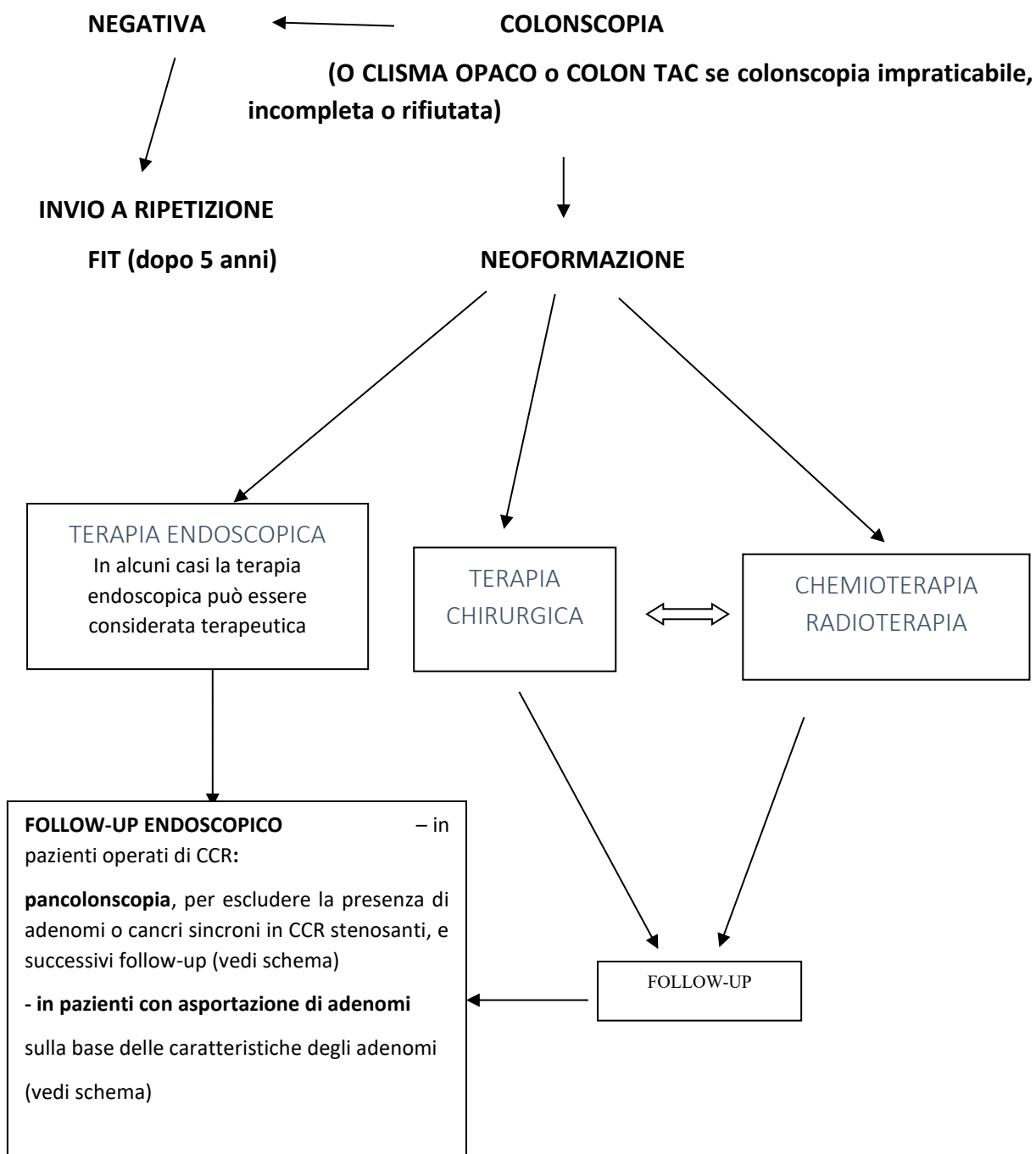
In Italia nel 2017 la percentuale di soggetti positivi al FIT che hanno aderito all'esame di approfondimento è stata del 75%.³⁶

In Emilia-Romagna, nello stesso anno, la percentuale di soggetti positivi al SOF che hanno aderito all'esame di approfondimento è stata del 85,4%: più precisamente l'82,1% ha aderito alla colonscopia, il 2,4% ha aderito ed eseguito la colonscopia altrove mentre lo 0,9 si è sottoposto a colonscopia virtuale o RX doppio contrasto.³⁷

A Ferrara, sempre nell'anno 2017, la percentuale di soggetti positivi al FIT che poi hanno aderito all'esame di approfondimento è stata del 86,1%: più precisamente il 76,6% dei pazienti che hanno eseguito la colonscopia, il 4,9% ha eseguito la colonscopia altrove, il 4,7% si è sottoposto a colonscopia virtuale.³⁷

L'organizzazione dello screening di prevenzione in E-R è suddivisa in tre livelli e segue il seguente algoritmo:





Il test di screening di I° livello in uso in E-R

La ricerca del sangue occulto nelle feci in Emilia-Romagna si esegue attraverso il FIT, ovvero quel test immunochimico, che tramite l'utilizzo di anticorpi specifici, è in grado di rilevare la porzione proteica dell'emoglobina e non l'emoglobina derivante da altre fonti che non siano sanguinamenti e che quindi non richiede alcuna preparazione né restrizione dietetica.

Il test della ricerca del sangue occulto nelle feci è un esame con alta sensibilità, ma bassa specificità, ovvero non discrimina tra le varie causa di sanguinamenti dell'apparato gastro-intestinale.

A Ferrara viene eseguito per tutta la popolazione invitata (residenti e domiciliati) nel Laboratorio Analisi Unico Provinciale.

L'esito del FIT si esprime in:

1. negativo 0-99 ng/ml;
2. positivo ≥ 100 ng/ml;
3. non idoneo, da ripetere.

La procedura di campionamento prevede che l'utente che aderisce al programma di prevenzione:

4. raccolga le feci in un contenitore asciutto e pulito;
5. eviti di contaminare le feci con urine, sangue mestruale o altri liquidi;
6. utilizzi l'apposito flacone di prelievo;
7. collochi il flacone nella apposita bustina di plastica e lo conservi in frigorifero fino al momento della consegna.³⁸

Screening di II° livello in E-R

I soggetti FIT positivi vengono contattati telefonicamente, dal personale sanitario del Centro Screening Oncologici, per fissare l'appuntamento per la colonscopia e per un colloquio preliminare durante il quale viene rilevata l'anamnesi del paziente e gli vengono consegnati sia le istruzioni per la dieta e che per la preparazione intestinale, da effettuare necessariamente prima di sottoporsi alla colonscopia.

La colonscopia è l'unica metodica che permette di osservare e ispezionare tutto il colon e allo stesso tempo consente di rimuovere agevolmente le lesioni polipoidi (polipectomia) precursori del cancro. Prima di eseguire la colonscopia e il soggetto deve essere dettagliatamente informato dei vantaggi, degli svantaggi e dei rischi dell'esame.

Dopo aver raccolto la firma del consenso informato si potrà effettuare l'esame.

L'efficacia della colonscopia nella prevenzione del CCR dipende da diversi fattori, fra cui l'adeguatezza della preparazione intestinale.

Per almeno i 3 giorni precedenti l'inizio della preparazione intestinale è necessario che il paziente effettui una dieta priva di scorie.

Un'inadeguata preparazione intestinale riduce infatti la percentuale di raggiungimento del cieco, aumenta sia il missing di lesioni coliche, che la percentuale di complicanze e il disagio del paziente, prolunga il tempo di esecuzione dell'esame e aumenta i costi del SSR, poiché impone necessariamente la ripetizione dell'esame.

Per quanto riguarda la pulizia intestinale è raccomandabile:

1. l'utilizzo di soluzioni a base di PEG ad alto volume o a basso volume, tenendo presente che le soluzioni a basso volume sono ugualmente efficaci e hanno una maggiore accettabilità da parte dei pazienti;
2. l'utilizzo dello schema di preparazione "split-dose" rispetto allo schema "single-dose";
3. eseguire la colonscopia tra le 4 e le 7 ore dalla fine della preparazione.

La colonscopia viene effettuata inserendo nel canale anale un tubo flessibile dal diametro di circa 1 cm e della lunghezza di circa 150cm, detto colonscopio, all'estremità del quale è inserita una telecamera che permette di visualizzare l'intestino su un monitor. È un esame che provoca un fastidio costante, ma in genere non è doloroso.

Se il paziente lamenta dolore possono essere somministrati farmaci per via endovenosa.

Durante l'esame il paziente viene sdraiato sul lettino in decubito sinistro e lo strumento viene lentamente introdotto fino a raggiungere il colon destro ed il cieco. La durata dell'esame risulta variabile a seconda della conformazione dell'intestino e della possibilità di effettuare manovre operative (biopsie, polipectomie ecc.).

Una volta terminato l'esame, è previsto un breve periodo di riposo in seguito al quale, se non è stata usata alcuna sedazione, il paziente potrà tornare al proprio domicilio. Se invece sono stati somministrati farmaci per il controllo del dolore o sono stati asportati polipi, il paziente potrà lasciare l'ambulatorio dopo 2-3 ore di osservazione.

Al termine dell'esame i pazienti riceveranno il referto con le indicazioni post-procedura, l'eventuale indicazione per il ritiro dell'esame istologico e le indicazioni per il follow-up.³⁸

Nel percorso di screening è necessario porre molta attenzione alla qualità delle prestazioni fornite in ogni loro aspetto.

I parametri di qualità richiesti, e monitorati dalla Regione tramite un tracciato record, impongono:

1. la completezza dell'indagine, ovvero il raggiungimento del ceco. In caso di mancato completamento l'esame colonscopico deve essere ripetuto o deve essere effettuato un esame alternativo, quale il clisma opaco o la colon-TC. Tale indicazione si estende anche ai casi di mancato completamento per stenosi neoplastica invalicabile;
2. la ripetizione nel più breve tempo possibile, e comunque entro 3 mesi, in caso di toilette inadeguata;
3. l'asportazione dei polipi, se tecnicamente possibile, deve essere effettuata durante l'indagine che li ha diagnosticati (accettabile la non asportazione contestuale per i polipi oltre i 2 cm);
4. la definizione della procedura di gestione del paziente portatore di pacemaker o defibrillatore, in accordo con gli specialisti cardiologi, come pure la definizione di indicazioni alla profilassi antibiotica, alla luce delle linee guida dell'America Heart Association del 2007, dell'American Society for Gastrointestinal Endoscopy (ASGE) 2008 e delle linee guida della European Society of Cardiology del 2009. Se il paziente è portatore di pacemaker è necessario concordare con il cardiologo il comportamento da seguire in caso di resezione endoscopica.³⁹

La necessità di condivisione dei referti con il Centro Screening comporta una particolare attenzione nella loro stesura che deve risultare informatizzata e quanto più completa e precisa possibile, evitando l'utilizzo di sigle e classificazioni non chiarite.

Il referto di ogni colonscopia deve necessariamente riportare le seguenti informazioni:

1. i dati anagrafici completi;
2. l'indicazione se è stata eseguita o meno la sedazione; se eseguita devono essere esplicitati i prodotti utilizzati e relativi dosaggi;
3. l'indicazione della bontà delle toilette anche in funzione della possibilità, nel caso risulti scarsa, di attribuire un follow-up o, in alternativa, di riprogrammare l'indagine nel più breve tempo possibile.

I criteri per la valutazione della qualità della toilette intestinale si riassumono così: buona/ottimale (mucosa visualizzabile al 100%), sufficiente/meno che ottimale (mucosa visualizzabile al 75% ma con feci aspirabili), insufficiente/inadeguata (con feci solide) e visione impossibile (tale da non consentire la progressione dello strumento);

4. raggiungimento del cieco, con documentazione fotografica: in caso di esame incompleto indicare il punto raggiunto ed il motivo dell'interruzione e la data in cui si effettuerà l'esame di completamento;
5. numero di lesioni individuate, asportate e recuperate, loro sede, forma e dimensione.
6. manovre eseguite, con indicazione degli accessori utilizzati;
7. complicanze procedurali immediate o tardive;
8. diagnosi endoscopica;
9. eventuali indicazioni motivate a ripetere l'indagine;
10. nome e cognome degli operatori presenti durante l'esame (medici e infermieri);
11. indicazioni post-procedura (FU).

È importante ricordare che non sono richieste indagini di laboratorio pre-colonscopia nemmeno nei pazienti in trattamento con anticoagulanti orali per i quali sono stati concordati protocolli di comportamento univoci.

È altresì importante ricordare che la colonscopia non è scevra da complicanze che possono essere classificate in endoscopiche e mediche.

Complicanze Endoscopiche:

1. emorragie in corso di esame: più frequenti in seguito a biopsie/polipectomie o nei pazienti affetti da malattie del fegato o in soggetti in trattamento anticoagulato o antiaggregante piastrinico;³⁹
2. perforazione del colon diretta, tramite lo strumento, o indiretta, tramite l'insufflazione inadeguata d'aria. È un evento raro ma grave che può richiedere l'intervento chirurgico. Si manifesta in 0,3 casi su 1000;³⁹
3. trauma splenico: è un evento raro ma grave che può richiedere l'intervento chirurgico.

Complicanze Mediche:

1. complicanze cardiache, respiratorie o neurologiche: solitamente legate al peggioramento di una malattia consistente;⁴⁰
2. reazioni allergiche a farmaci;
3. complicanze legate a procedure anestesilogiche;
4. batteriemie;
5. dislocazioni protesiche.³⁹

1.11 - Protocollo operativo per la provincia di Ferrara

Nell'ambito del Provincia di Ferrara l'organizzazione dello screening di prevenzione prevede l'invio di tutti i campioni ad un unico Laboratorio Analisi. I possibili risultati sono positivo, negativo e inadeguato.

FIT negativo: l'utente riceverà direttamente al domicilio, entro 15 giorni, la risposta con l'invito a ripetere il test dopo 2 anni.

TEST inidoneo: l'utente riceverà direttamente al domicilio l'invito a ripetere il test.

FIT positivo: l'utente sarà invitato ad eseguire una colonscopia presso il Servizio di Endoscopia Digestiva di riferimento.

I pazienti con FIT positivo vengono contattati telefonicamente dal Centro Screening per concordare un appuntamento per un colloquio con un operatore sanitario: in questa occasione viene consegnato al paziente il referto del FIT, fissato l'appuntamento per l'esame endoscopico (entro 30 giorni dalla risposta del test), comunicato il tipo di preparazione necessaria per la pulizia intestinale e ogni altra informazione utile all'esecuzione dell'esame.

Eventuali note informative relative alla esecuzione dell'esame endoscopico potranno essere ottenute telefonando direttamente al Servizio di Endoscopia Digestiva di riferimento.

A Ferrara sono 4 i Centri di Endoscopia Digestiva dell'AUSL e dell'Azienda Ospedaliera Universitaria S. Anna che si fanno carico delle indagini di secondo livello rispettando le modalità stabilite a livello regionale che prevedono, in particolare, l'esecuzione dell'esame endoscopico entro 30 giorni dall'esito positivo del test.

In caso di incompletezza o inattendibilità, per vari motivi, dell'esame endoscopico, i pazienti vengono invitati ad eseguire la colonscopia virtuale o colon Tac. La colonscopia può risultare negativa, positiva per polipi o suggestiva per neoplasia.

Colonscopia negativa: il paziente sarà invitato dal Centro Screening ad eseguire un FIT di controllo a distanza di 5 anni dalla colonscopia. In questo caso il Centro Screening provvederà a ricontattare con l'invio di una lettera al domicilio dell'utente a tempo debito.

Colonscopia positiva per polipi: il paziente sarà invitato a sottoporsi a follow-up endoscopico. Il follow-up sarà calibrato a seconda delle linee guida Regionali che valutano le caratteristiche (dimensioni, istologia) e il numero dei polipi riscontrati. L'appuntamento per il successivo controllo endoscopico sarà inviato al domicilio del paziente dal Centro Screening.

Colonscopia suggestiva per neoplasia: il paziente verrà invitato ad un ricovero presso il D.H. Gastroenterologico Azienda Ospedaliera Universitaria S. Anna e D.H. di riferimento dei presidi ospedalieri Azienda USL, per la opportuna stadiazione. Durante tale ricovero si procederà ad una valutazione collegiale.

Se operabile, il paziente verrà inviato al Reparto chirurgico per l'intervento. Prima della dimissione, un'ulteriore valutazione collegiale stabilirà il follow-up più adeguato con conseguente presa in carico dalla Unità Operativa di competenza.

Se inoperabile, verrà stabilito il percorso terapeutico e di sostegno più opportuno per il paziente. A Ferrara a coloro che rifiutano di sottoporsi alla colonscopia può essere proposta in alternativa la colonscopia virtuale, chi rifiuta (rifiuto firmato) anche quest'ultima verrà nuovamente invitato per il FIT dopo 2 anni.

Diversi studi hanno dimostrato che la colonscopia virtuale è una metodica accurata per la diagnosi del CCR che offre un'alternativa altrettanto sensibile e meno invasiva alla colonscopia⁴¹, questo esame però non rileva in modo altrettanto accurato polipi di piccole dimensioni (< 6 mm) che hanno comunque una probabilità, ancorché bassa, di trasformarsi in tumori maligni.⁴²

La colonscopia virtuale è una metodica radiologica non invasiva di uso ormai consolidato nella pratica clinica. La colonscopia virtuale è stata descritta per la prima volta nel 1994 e consente di studiare la parete del colon simulando la colonscopia tradizionale.

La colonscopia virtuale è eseguita con apparecchiatura di Tomografia Computerizzata Multistrato (TCMS) ed utilizza radiazioni ionizzanti (raggi x).

Essendo una simulazione computerizzata, a differenza della colonscopia tradizionale, la virtuale viene condotta senza introdurre nel colon sonde e pertanto non è invasiva.

Prima di eseguire l'esame viene somministrato, per via orale, un mezzo di contrasto iodato idrosolubile che aiuta a riconoscere le eventuali feci residue dopo la pulizia intestinale.

Quando la si propone ai pazienti è importante sottolineare che la superficie mucosa del colon viene evidenziata come in una animazione grafica, pertanto non è possibile eseguire procedure diagnostiche/terapeutiche quali la polipectomia, pertanto nel caso sia identificata una lesione polipoide, si rende necessaria l'esplorazione con la colonscopia tradizionale⁴³

Va sottolineata, tra i limiti della metodica, la difficoltà identificare le lesioni piatte (difficili comunque da identificare anche con altri esami), mentre si possono evidenziare le irregolarità della superficie (come nel caso di polipi o tumori), buchi di parete (come nel caso di diverticoli), stenosi e ostruzioni del lume.

La colonscopia virtuale consente di identificare più del 90% dei polipi di almeno 1 cm di diametro, di completare lo studio del colon nel caso di una colonscopia tradizionale incompleta, di identificare la presenza di diverticoli.

L'esame consiste nell'introduzione attraverso il retto di una sonda di piccole dimensioni e tramite meccanismo manuale, o mediante insufflatore automatico, viene insufflata aria o anidride carbonica. Utilizzando una bassa dose radiante vengono effettuate 2 scansioni, a respiro trattenuto, della durata media di 10 secondi ciascuna, una in posizione supina e una in posizione prona.

L'utilizzo di entrambi i decubiti permette di ottenere un differente posizionamento dell'aria nei vari segmenti intestinali, una redistribuzione nelle sedi declivi del contenuto fluido e la mobilizzazione di eventuali residui fecali solidi.

1.12 - Il Follow up nello screening

Un programma di screening non può limitarsi solamente all'identificazione e all'asportazione di lesioni neoplastiche ma deve occuparsi anche del monitoraggio, caratterizzato da controlli periodici, di follow up. Quest'ultimo mira al controllo dell'efficacia dei trattamenti medici e riduce la probabilità di recidive. Le linee guida europee⁴⁴ raccomandano:

1. per casi a basso rischio, caratterizzati da un adenoma o due adenomi entrambi di dimensioni inferiori ai 10 mm, di procedere con un controllo endoscopico dopo 5 anni e FOBT dopo altri 5;
2. per casi a rischio intermedio, che presentano dai tre ai quattro adenomi piccoli o uno con dimensioni maggiori ai 10 mm, di intervenire con controlli periodici ogni tre anni;

- per casi ad alto rischio con più di 5 adenomi o almeno uno con dimensioni maggiori di 20 mm, un follow-up con scadenza annuale.

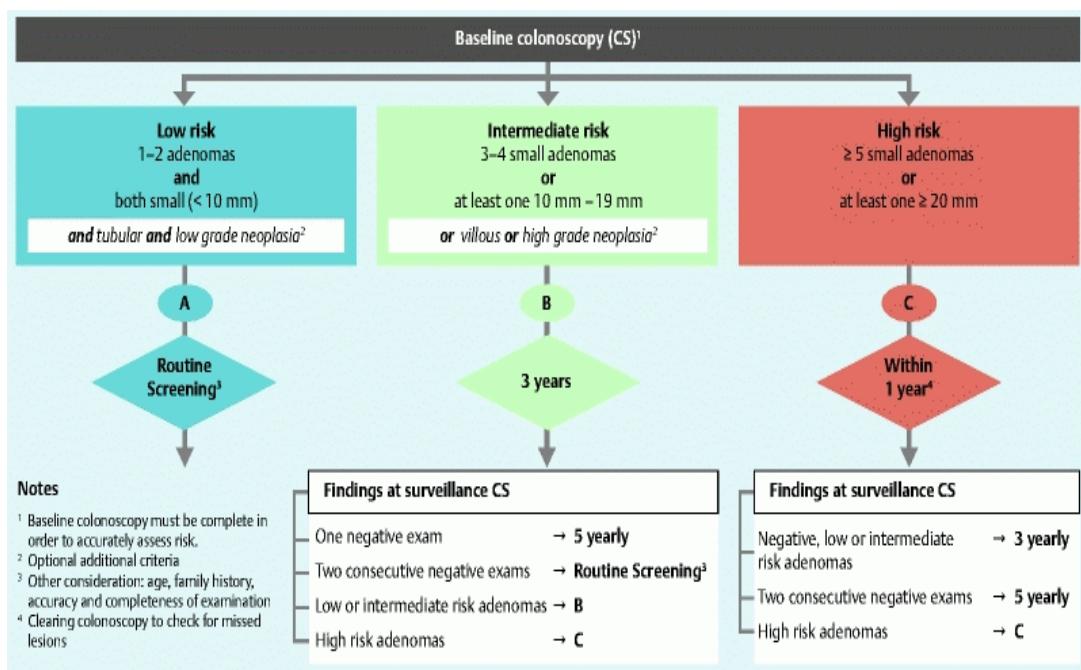
Il follow-up risulta essere un metodo con elevata potenzialità nel miglioramento del tasso di sopravvivenza, come dimostrato dalla meta-analisi condotta da S. Pita-Ferández⁴⁵ e colleghi e quella da Rosen.⁴⁶

Le indicazioni di FU adottate nel programma di SCR sono il frutto della integrazione fra le linee guida desunte dalla letteratura internazionale (e dalle Linee Guida Europee specifiche)⁴⁷ e le esperienze dei professionisti delle Aziende sanitarie della regione Emilia-Romagna e vengono periodicamente sottoposte a revisione e aggiornamento.

Viene considerato come esame di follow-up il primo che segue al raggiungimento di un “clean colon”.

Le indagini eseguite nel percorso di eradicazione di una lesione (es. un grosso polipo) e di lesioni multiple o per toilette insufficiente non vengono definite quali esami di follow-up. In Tabella 1 sono elencate le raccomandazioni per il primo follow-up e per quelli successivi in funzione delle caratteristiche delle lesioni rimosse alla luce delle recenti indicazioni delle Linee Guida Europee (Figura 9) nelle quali si modifica sostanzialmente il F-U delle lesioni a basso rischio.⁴⁷

Figura 9. FU secondo recenti indicazioni delle Linee Guida Europee



1.13 - Scenari futuri per lo screening del CCR

Lo sviluppo dei sistemi biologici ha rivoluzionato diversi aspetti della ricerca sul cancro e sulle strategie di screening colo-rettale per l'identificazione di nuovi biomarkers che nel futuro potrebbero dimostrare un miglior rapporto costo/beneficio rispetto alle metodiche di screening attualmente in uso.⁴⁸

Sulla base delle conoscenze attuali sono in sperimentazione:

- la videocapsula;
- la ricerca del DNA nelle feci (Gene Based screening);
- la "metabolomica";
- i VOC (Volatile Organic Compounds);
- il riconoscimento olfattivo con i cani addestrati;
- il naso elettronico.

- Videocapsula -

Un recente lavoro pubblicato su *Gastroenterology*⁴⁹ si è dimostrato che la capacità diagnostica della colonscopia con videocapsula è nettamente migliorata rispetto al passato.

In questo studio 884 pazienti asintomatici (idonei allo screening del cancro colon-rettale) sono stati indagati tramite colonscopia con videocapsula di seconda generazione (*Pillcam Colon 2*) e successivamente tramite colonscopia tradizionale (utilizzata come esame di controllo da un medico non a conoscenza del risultato dell'esame con videocapsula). Dal confronto è emerso che la nuova videocapsula ha una sensibilità del 100% per le neoplasie maligne e una sensibilità dell'88% e specificità dell'82% per gli adenomi di dimensioni ≥ 6 mm.

Questo lavoro ha messo però in evidenza due criticità che ad oggi ne limitano l'utilizzo: la adeguata pulizia del colon, che nella colonscopia con videocapsula deve essere molto più accurata ed energica rispetto alla colonscopia tradizionale, e la velocità del transito intestinale che non deve superare i 40 minuti.

Infatti, per una adeguata esplorazione del colon, un transito più veloce non consente un'adeguata esplorazione della regione anatomica. Proprio queste due criticità nel 9% dei pazienti sottoposti allo studio l'indagine non è stata attendibile.

Tra i fattori limitanti l'utilizzo di questa tecnica va aggiunta:

- a) L'impossibilità di eseguire prelievi di mucosa, pertanto non è possibile eseguire procedure diagnostiche/terapeutiche quali la polipectomia e la biopsia, se il paziente dovesse averne bisogno dovrebbe essere indirizzato ad una successiva colonscopia convenzionale;
- b) Il rischio di ritenzione (blocco) della capsula, che ne limita le indicazioni d'uso escludendo dal suo possibile utilizzo i pazienti con restringimenti intestinali, malattie infiammatorie, aderenze, subocclusione.
- c) L'elevato costo. La colonscopia con videocapsula nel nostro paese non è coperta dal SSN per cui il paziente risulta a carico del paziente stesso.

Pertanto, la colonscopia con videocapsula non può essere proposta come procedura per lo screening di popolazione del CCR e la colonscopia convenzionale rappresenta ancora oggi il mezzo migliore per la diagnosi delle neoplasie benigne e maligne del colon.⁵⁰

- Ricerca del DNA nelle feci (Gene Based screening) -

La neoplasia del colon tende a esfoliare continuamente cellule nel lume intestinale in quantità superiore rispetto alla mucosa normale, pertanto il DNA o RNA derivante dalle cellule tumorali può essere isolato e testato per verificare la presenza di mutazioni e cambiamenti epigenetici acquisiti durante la cancerogenesi.

Tali test mirano a individuare la presenza di DNA o RNA aberrante, derivante dalle cellule neoplastiche. Le mutazioni dell'oncogene K-ras sono quelle più studiate ed in molti studi la sensibilità di questo metodo sul gene è risultata non superiore al 50%. Altri marcatori genetici, oltre la mutazione del k-ras, (mutazione in APC, marcatori della repressione dell'apoptosi) sembrano aver una buona sensibilità per gli adenomi.

Uno studio condotto da un gruppo di ricercatori dell'Università di Indianapolis e pubblicato nel 2014 sul New England Journal of Medicine, ha indagato una coorte di 9.989 pazienti, con un'età compresa tra i 50 e gli 84 anni aderenti al programma di screening per CCR. La coorte è stata arricchita, nel tentativo di aumentare la prevalenza del cancro, con un gruppo di persone di età superiore ai 65.

Lo studio aveva come endpoint primario la valutazione dell'efficacia di un nuovo test multitarget basato sul DNA presente nelle feci che aveva come target le mutazioni del gene che codifica per la proteina KRAS (principale marcatore del CCR), oltre ad aberrazioni del gene NDRG4, stato di metilazione del gene BMP3 (altri marker tumorali) e β -actin.

La sensibilità del test è risultata del 92.3% per il CCR e del 93.3% per le lesioni polipoidi allo screening. I valori corrispondenti ottenuti con il test FIT sono stati del 73.8% per i tumori maligni e del 77.3% per gli adenomi. La specificità del test per CCR e per lesioni polipoidi del test del DNA è stata del 42.4%.

Il test del DNA ha mostrato quindi ridotta specificità rispetto al FIT nei pazienti con lesioni lievi (86,6% contro 94,9%) e in quelli con colonscopia negativa (89,8% versus 96,4%).

- La "metabolomica" -

La "metabolomica" è una branca di ricerca sviluppata di recente e consiste nell'analisi degli endpoints del metabolismo cellulare, eseguita utilizzando tecnologie ad elevata produttività in grado di compiere un'analisi simultanea di molti tipi di micromolecole, le quali riflettono lo stato del metabolismo cellulare. Tra questi ci sono la risonanza magnetica nucleare spettroscopica, la cromatografia liquida ad alta performance e la gas-cromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS).

Il metaboloma, che può essere definito come l'impronta digitale del fenotipo cellulare, è costituito da circa 2000-3000 piccole molecole o metaboliti⁵¹, che rappresentano il prodotto finale dei processi cellulari globali. Su questo sfondo, è stato postulato che diverse malattie siano caratterizzate da uno specifico profilo metabolomico⁵¹ e per queste analisi possono essere utilizzati diversi tipi di campioni biologici, incluse feci, urine, siero, saliva e respiro.

- VOC (Volatile Organic Compounds) -

I VOC (composti organici volatili) sono composti che hanno diversa natura chimica a seconda della tipologia di carcinoma e sono originati dalle cellule "malate" a causa della modificazione dalla perossidazione lipidica delle membrane cellulari, derivante da alterazioni genetiche e/o mutazioni della struttura proteica della membrana delle cellule tumorali e al relativo incremento della prevalenza di specie reattive dell'ossigeno.⁵²

I principali VOC sono rappresentati da idrocarburi come benzene, alcani e aldeidi (o loro derivati). I VOC, che presentano un'alta pressione di vapore a temperatura ambiente, possono essere identificati sia direttamente, ossia nell'ambiente che circonda la cellula, che indirettamente, tramite il respiro, dopo esser stati convogliati dal flusso sanguigno agli alveoli polmonari. I VOC presenti nell'aria espirata, furono isolati per la prima volta da Pauling e colleghi nel 1971.⁵³

Sono composti chimici gassosi, a base di carbonio, individuabili non solo nel respiro ma anche in diverse tipologie di secrezioni come sudore, feci e urine.⁵⁴

I VOC, ovunque siano essi prodotti nel corpo, possono raggiungere gli alveoli polmonari, dai quali vengono esalati, permettendo la loro quantificazione attraverso una metodica oggettiva.

VOC contenuti nelle feci o direttamente nell'intestino nei soggetti sani, derivano per la maggior parte dal microbiota intestinale del colon, in seguito ai processi di fermentazione e al susseguirsi delle varie fasi del metabolismo dei microorganismi stessi.^{55, 56, 57}

Diversi studi che hanno dimostrato che ciascun tipo di tumore, inclusi il carcinoma del polmone, quello della mammella, il melanoma, il mesotelioma e il carcinoma epatocellulare, si caratterizza per un profilo di VOC specifico, completamente differente dalla normalità.^{58,59,60,61,62}

È noto in letteratura e verificato da test di laboratorio, che i VOC generati dal CCR influenzano anche la composizione delle feci, alterandone l'odore.

Per identificare la presenza dei VOC i sensori nanostrutturati in ragione, della loro sensibilità, versatilità e rapidità nell'ottenimento dei risultati, appaiono come candidati ideali per implementare gli strumenti diagnostici attualmente utilizzati.⁶³

- Riconoscimento olfattivo con cani addestrati -

Nel 2004 un gruppo di ricercatori britannici ha pubblicato sul British Medical Journal il primo studio sistematico della capacità diagnostica dei cani. Successivamente diversi gruppi di ricerca hanno sfruttato le potenzialità dell'olfatto canino per riconoscere specifici VOC da campioni di urine, respiro, sangue e feci.^{64, 65}

I cani possiedono oltre 300 milioni di recettori olfattivi ed una regione cerebrale deputata al senso dell'olfatto con un'estensione pari a 40 volte quella dell'uomo. Questo porta l'olfatto canino ad esser altamente specializzato nel riconoscimento e nell'interpretazione dei segnali olfattivi.

I risultati degli studi pubblicati per la discriminazione delle neoplasie di prostata, polmone, vescica e mammella, hanno mostrato tassi di sensibilità tra il 64 e il 99% e di specificità tra il 29 e il 99%.⁶⁴

Nell'ipotesi di immaginare per lo screening l'utilizzo dei cani addestrati, vanno considerati i potenziali elementi confondenti, ad esempio la possibilità che i cani possano ricordare

determinati odori, ma non necessariamente quelli corrispondenti alle componenti volatili rilasciate dalle cellule tumorali e il fatto che l'addestramento ed il mantenimento di cani deputati a questo tipo di analisi è un processo estremamente dispendioso. Va tenuto conto anche della non omogeneità dei contesti analizzati e quindi il possibile impiego di cani con diversi livelli di addestramento. Oggi le nuove tecnologie sono quindi volte a individuare strumenti che emulino il sistema olfattivo animale e che siano maggiormente fruibili, economici, precisi, riproducibili e veloci.⁶⁵

- Naso elettronico -

Il primo “naso elettronico” è stato sviluppato negli anni Novanta e si trattava di un dispositivo basato su un'innovativa filosofia di funzionamento: non più deputato alla quantificazione dettagliata della di singoli elementi o molecole, ma in grado di quantificare diverse classi di composti contemporaneamente presenti, non mediante l'analisi diretta del campione, ma dell'headspace o “spazio di testa”. La tecnologia dello spazio di testa richiede l'utilizzo di contenitori che contengano, circondino e sigellino ermeticamente gli oggetti di interesse. Dei gas inerti vengono fatti passare nello spazio contenente l'oggetto, o nel vuoto, in modo tale da rimuovere i composti odorosi dallo spazio di testa. Il naso elettronico funziona con principi simili a quelli dei recettori olfattivi: capta i composti volatili tramite una serie di sensori che dopo averli rilevati inviano i segnali ad un software per l'elaborazione dei dati. La definizione di “naso elettronico” proposta da Gardner e Bartlett, attualmente accettata, è: “Un naso elettronico è uno strumento che comprende una serie di sensori chimici non specifici ed un sistema di pattern recognition in grado di riconoscere sia odori semplici che complessi”.⁶⁶

1.14 - SCENT A1

SCENT A1 è uno strumento incentrato sulla diagnosi preliminare specifica del CCR sin dallo stadio di adenoma attraverso analisi dei VOC specifici per il CCR. L'Università di Ferrara, nel laboratorio di Sensori (LS), ha brevettato il dispositivo SCENT A1, ora di proprietà della startup SCENT S.r.l. (brevetto n° IT RM20140595).⁶⁷

SCENT A1 si basa su un array di sensori nano-strutturati a base di polveri di semiconduttori, capaci di monitorare piccole variazioni di concentrazioni gassose dell'ordine delle decine di parti per miliardo (ppb), in linea con le variazioni dei VOC all'interno del corpo umano. Ogni sensore reagisce a diverse frazioni della miscela dei VOC producendo un cambiamento di resistenza specifico del sensore.

Sono molti gli studi sulla fisica delle nanostrutture che mostrano la capacità delle nano-polveri semiconduttrici di rivelare gas anche quando presenti in minime concentrazioni.

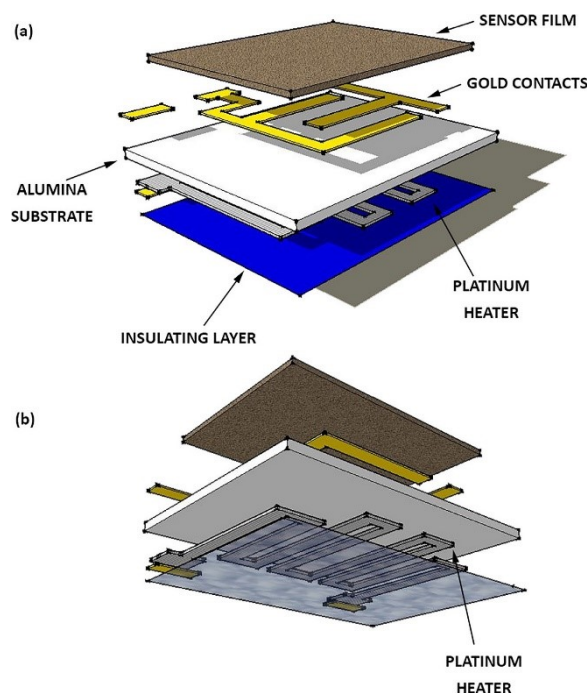
La combinazione delle singole misurazioni di diversi sensori crea una vera e propria "impronta digitale" olfattiva, che può essere poi analizzata tramite algoritmi di riconoscimento dei pattern.^{68,69}

SCENT A1, attualmente in forma prototipale, è un dispositivo portatile, di semplice utilizzo, con costo contenuto, che applica sensori a base di ossidi metallici nanostrutturati, estremamente versatili alla rivelazione di specifici gas marcatori presenti nelle esalazioni gassose fecali di pazienti che partecipano allo screening di prevenzione del CCR e che risultano avere il FIT positivo.

La tecnologia di SCENT A1

Il dispositivo SCENTA1 è dotato di un sistema pneumatico che permette di indirizzare un flusso d'aria proveniente dall'ambiente esterno all'interno del box che contiene il campione da analizzare; da qui, l'aria contaminata dai gas fecali, arriva all'unità sensibile del macchinario.

Figura 10. Struttura del sensore chemoresistivo: il materiale semiconduttore nanostrutturato viene collocato su un substrato di allumina, due elettrodi d'oro a forma di pettine e una bobina di platino (riscaldatore) per raggiungere la temperatura di lavoro desiderata.



L'interazione (interferenza) con l'ambiente esterno dell'array di sensori viene ridotta grazie all'utilizzo di filtri al carbone e di filtri antibatterici con dimensioni dei pori di $0,2 \mu$ L'aria

così filtrata, insufflata da un'apposita pompa, scorre lungo il circuito, trasportando l'aria contaminata dai gas fecali dal box fino all'unità dove sono contenuti i sensori che in tal modo vengono "stimolati". Infatti i sensori a contatto con i gas, variano la loro resistenza, ed è proprio questa variazione che consente di distinguere le differenti miscele di gas.

Ognuno dei 5 sensori (Figura 10) è formato da un sottile film di materiale semiconduttore nanostrutturato, e in base alla sua composizione e al gas target, presenta una specifica temperatura di lavoro.

Attualmente SCENT A1 è in forma di MVP (Minimum Viable Product) brevettato in Italia Germania e Regno Unito (brevetto n° IT RM20140595).⁶⁷ Nello sviluppo di un prodotto innovativo, il prodotto minimo funzionante (MVP) è il prodotto con il più alto ritorno sugli investimenti rispetto al rischio. Un semplice schema per spiegare il suo funzionamento e la descrizione del macchinario SCENT A 1 è mostrato in Figura 11, mentre l'immagine del prototipo è mostrata in Figura 12.

Figura 11. Schema del funzionamento del dispositivo [patent n° IT RM20140595]. Il deviatore di flusso permette di far passare l'aria sui sensori che generano la risposta (modalità measure) o di bloccare il flusso d'aria, e le esalazioni sono spurgate fuori (modalità exhaust).

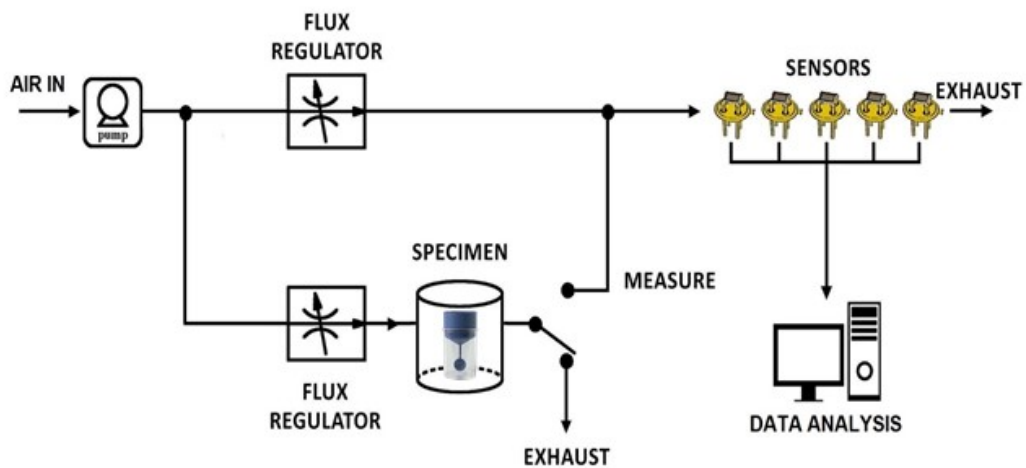


Figura 12. Immagine del dispositivo SCENT A1 [patent n° IT RM20140595].



In futuro saranno necessarie modifiche all'elettronica e al packaging per renderlo "user-friendly" e meno ingombrante.

Attualmente il laboratorio dove vengono effettuati i test sui sensori risulta composto da:

1. flussimetri per la miscelazione dei gas;
2. sensori e camera di misura;
3. sistema di acquisizione dei dati.

1. Flussimetri per la miscelazione dei gas

I gas che veicolano i VOC sono contenuti all'interno di bombole connesse, tramite tubi di teflon, al misuratore di portata o flussimetro. Il misuratore di portata permette di impostarne il flusso d'aria verso le camere di misura dove sono posizionati i sensori. Per capire quale flusso debba essere impostato, è necessario tener conto della seguente relazione:

$$F = \frac{F_{tot} \cdot C}{c_b}$$

F_{tot} : flusso totale che attraversa il flussimetro (in questo caso 500 cm³standard/minuto – sccm)

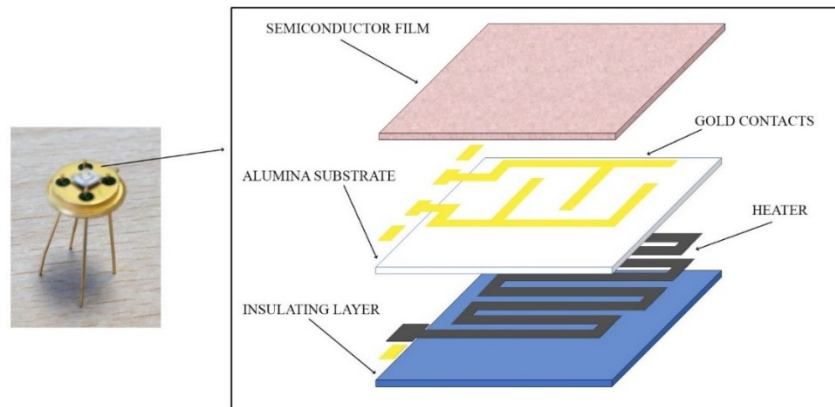
C : concentrazione di gas inviato alla camera di misura

c_b : concentrazione di gas nella bombola (certificata dal fornitore).

2. Sensori e camera di misura

Al centro della camera di misura si trova il diffusore attorno al quale sono posizionati i 5 sensori chemoresistivi (esempio di sensore schematizzato in Figura 13).

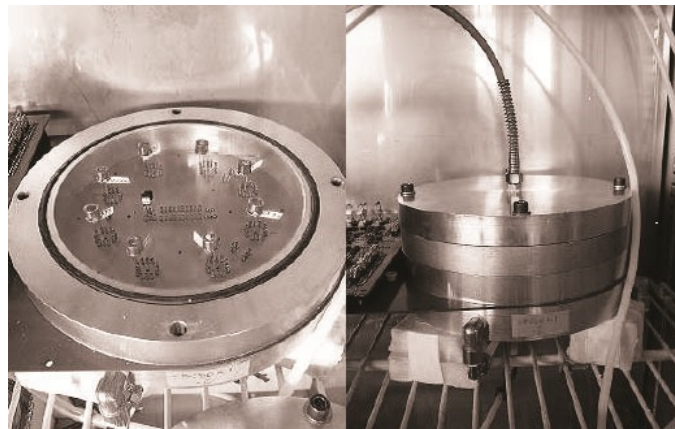
Figura 13. Sensore nanostrutturato per gas bondato con fili d'oro al suo supporto, e schematizzazione della sua struttura



In ogni camera di misura è possibile collocare fino ad otto sensori, insieme ai sensori di umidità e di temperatura.

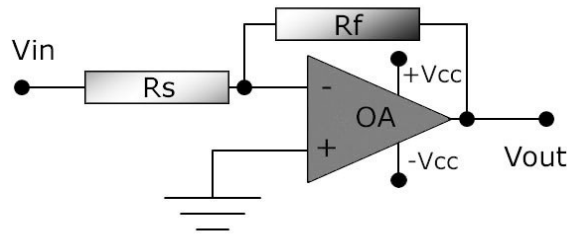
Il gas per poter sollecitare tutti i sensori nello stesso istante deve esser diffuso uniformemente all'interno della camera (Figura 14).

Figura 14. Sensori all'interno della camera (sinistra) e la camera ermeticamente sigillata (destra).



Per poter rilevare i cambiamenti di conduttanza dei sensori quando stimolati è necessario inserirli all'interno di un circuito elettrico. (Figura 15)

Figura 15. Schema del circuito elettrico ove è inserito il sensore.



Ogni singolo sensore è inserito in un circuito elettrico che è un amplificatore operazionale in configurazione invertente (OA): il segnale in entrata è connesso al polo negativo dell'amplificatore, mentre il polo positivo è messo a terra.

Alla fine dei resistori R_s e R_f abbiamo rispettivamente i valori di voltaggio V_{in} e V_{out} , quindi:

$$\frac{V_{out}}{R_f} = \frac{V_{in}}{R_s}$$

Il guadagno è dato da:

$$\frac{V_{out}}{V_{in}} = \frac{R_f}{R_s}$$

Ponendo $V_{in} = -5V$, in ragione del breve circuito virtuale agli input dell'amplificatore operazionale in configurazione invertente OA, l'entrata invertente si trova allo stesso potenziale dell'entrata non-invertente. Il sensore è così soggetto ad una costante differenza di potenziale di $5V$ fintanto che l'OA lavora a valori lontani dalla saturazione. Essendo i valori di V_{in} e R_f conosciuti e costanti, il voltaggio in uscita V_{out} , è proporzionale alla conduttanza:

$$V_{out} = -R_f \cdot V_{in} \cdot \frac{1}{R_s} = -const \cdot G$$

G : conduttanza in presenza del gas

G_{air} : conduttanza in assenza del gas.

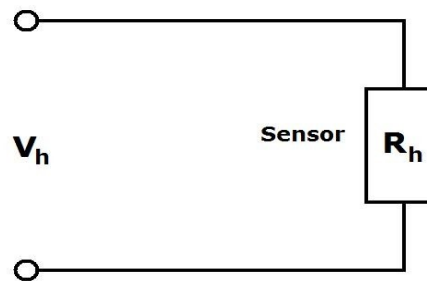
L'espressione della risposta assume una forma semplice, indipendentemente dai parametri del circuito:

$$\frac{G}{G_{air}} = \frac{V_{out}(gas)}{V_{air}}$$

dove le formulazioni del gas o dell'aria indicano la presenza o l'assenza del gas da misurare.

Ogni sensore ha un proprio riscaldatore che consiste in una bobina di platino nella quale la temperatura aumenta linearmente con la resistenza. Il circuito del riscaldatore è rappresentato in Figura 16.

Figura 16. Circuito del riscaldatore



La relazione tra temperatura e resistenza è la seguente:

$$R_h = R_0 \cdot (1 + \alpha T + \beta T^2)$$

R_h resistenza alla temperatura della camera;

R_0 resistenza a 0°C ;

T temperatura alla quale si vuole impostare il sensore;

α e β costanti caratteristiche del materiale.

Nel caso specifico del platino, esse sono: $\alpha = 0.003263 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$; (7) e $\beta = -6.6668 \cdot 10^{-7} \text{ }^\circ\text{C}^{-2}$; (8)

È possibile determinare R_0 misurando la resistenza alla temperatura della camera ed invertendo la relazione. Scegliendo poi la temperatura di lavoro, è possibile trovare la corrispondente R_h .

Applicando un voltaggio V_h al circuito, la corrente che circola, in accordo con la Legge di Ohm, sarà:

$$R_h = \frac{V_h}{i}$$

dove V_h è stabilita da chi opera sul circuito, mentre la corrente è misurata dall'alimentatore. È quindi possibile variando V_h controllare e modificare direttamente R_h e anche la temperatura dei sensori

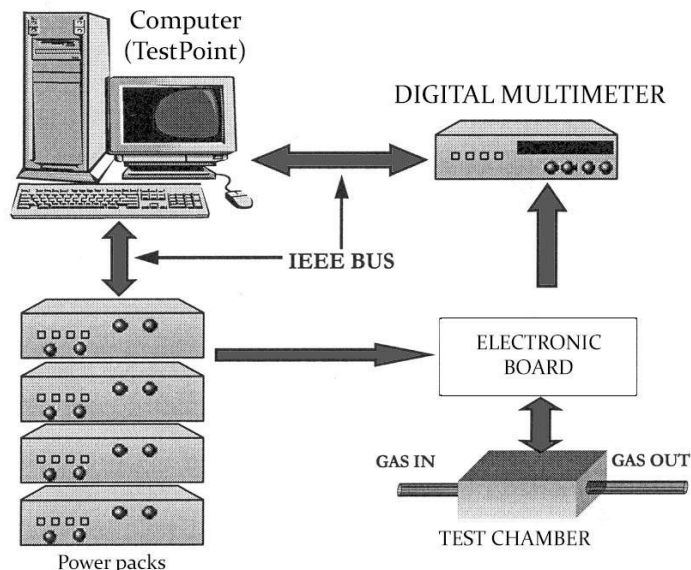
3. Sistema di acquisizione dei dati

La conversione dello stimolo registrato dai sensori in un segnale comprensibile e quantificabile per l'operatore (Figura 17) è realizzata del sistema di acquisizione dei dati.

Il sistema di acquisizione dei dati è costituito da:

1. Un Multimetro K2000 (Keithley) che converte tutti i voltaggi in uscita da segnali analogici a digitali. In questo modo i valori saranno inviati al computer (il multimetro possiede dieci canali di entrata e una sensibilità di dieci cifre decimali.);
2. Un Software di acquisizione e gestione: consiste in un programma, in TestPoint, in grado di acquisire tutti gli input dei canali del multimetro (5 sensori per i gas, un sensore di temperatura e un sensore di umidità), ad intervalli regolari (un'acquisizione ogni cinque secondi). L'utilizzo di questo software permette di visualizzare il grafico di risposta dei sensori e di controllare ed eventualmente modificare i valori della tensione di alimentazione per impostare i sensori alla temperatura desiderata.

Figura 17. Sistema di acquisizione dati: setup sperimentale



L'individuazione del miglior array possibile di sensori per rivelare i principali VOC legati al CCR era l'obiettivo iniziale di questo lavoro.

Tra i VOC da riuscire ad identificare ci sono lo 1-iodo-nonano ($C_9H_{19}I$) e il decanale ($C_{10}H_{20}O$) (ovvero quelli evidenziati negli studi di Peng⁷⁰ et al. e Altomare⁷¹ et al.) le cui strutture chimiche sono mostrate nelle Figure 18-19).

L'obiettivo era riuscire ad individuare i sensori in grado di rilevare la loro presenza nonostante la simultanea presenza di tutti gli interferenti generati dalla digestione umana e dall'attività batterica della flora intracolica.

Figura 18. Struttura chimica del 1-iodo-nonano

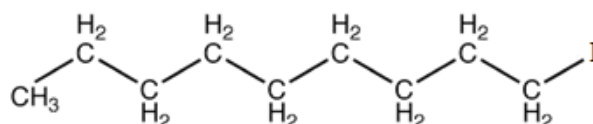
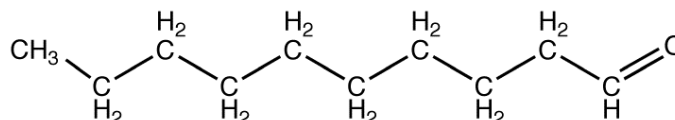


Figura 19. Struttura chimica del decanale



Una volta compiuti tutti i test di laboratorio e di interferenza tra i componenti di interesse, combinando H₂, CH₄, NO, NO₂, SO₂, H₂S, CO, N₂ aria sintetica secca e umida, C₆H₆, C₉H₁₉I, C₁₀H₂₀O sono stati scelti i sensori ed è stato sviluppato il dispositivo SCENT A1, (SCENT S.r.l.). Questo dispositivo è stato testato in uno studio in cui si sono analizzati i campioni di feci di soggetti sani e di soggetti colpiti da CCR ottenuti grazie alla collaborazione col team di Chirurgia Generale e Radiologia dell'ospedale Nuovo Sant'Anna di Cona.

Array di sensori utilizzati in laboratorio

Di seguito (Tabella 11) è riportata la combinazione di sensori che caratterizzano l'array utilizzato nello studio (i nomi utilizzati sono codici tecnici interni al laboratorio e non si riferiscono alla formulazione chimica del sensore stesso).

Tabella 11. La combinazione di sensori dell'array utilizzato

Codice	Temperatura di lavoro(°C)	Materiali	Dimensioni medie delle nanostrutture (nm)
SmFeO₃	350	Ossido di Samario e Ferro	63
TiTaV	450	Ossido di Titanio, Tantalio e Vanadio	52
ST20	450	Ossido di Stagno e Titanio (20%)	36
In₂O₃	350	Ossido di Indio	53
ST25 + Au	450	Ossido di Stagno e Titanio (25%) con aggiunta di nanoparticelle d'oro	30

Il dispositivo SCENT A1 è stato testato prima in laboratorio, su un intestino artificiale poi, per calibrare la combinazione di sensori da utilizzare nello studio sono stati testati 19 differenti materiali, ossidi di metalli e solfuri, per enfatizzare il più possibile le differenze tra le due tipologie di campioni: le feci di soggetti sani e feci di soggetti con CRC, raccolte durante l'intervento chirurgico.

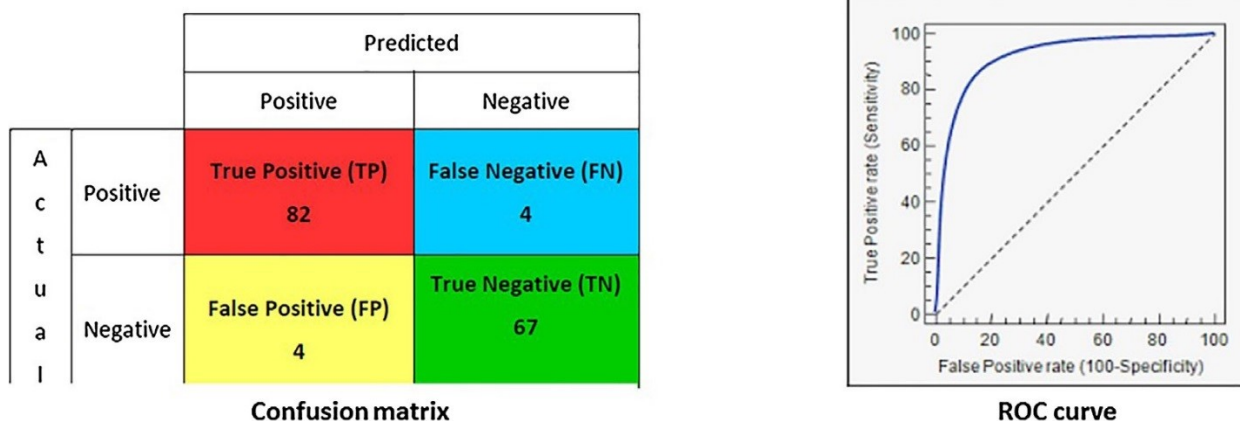
L'intestino artificiale si è ottenuto inserendo e combinando tra loro all'interno della camera di misura di SCENT A 1:

1. I gas che sono normalmente contenuti nell'intestino medio umano, generati dalla digestione umana e dall'attività batterica della flora intracolica, H₂, CH₄, NO, NO₂, SO₂, H₂S, CO, N₂ (che nel paragrafo "Sistema di acquisizione dei dati" sono stati definiti interferenti);
2. Aria sintetica secca e umida;
3. I VOC specifici per il cancro del colon-retto selezionati per l'array di sensori, C₆H₆, C₉H₁₉I, C₁₀H₂₀O^{70, 71,72}.

SCENT A1 è stato poi testato analizzando in cieco i 71 campioni di feci di persone sane e su 86 campioni di feci di pazienti con cancro, raccolte durante l'intervento chirurgico. I risultati dell'analisi dei 157 campioni sono stati inseriti nella matrice di confusione in Figura 20. La matrice di confusione confronta la "classe reale" (actual class) ottenuta attraverso la colonscopia con la "classe predetta" (predicted class) ottenuta tramite l'analisi con SCENT A

1. In ogni colonna sono inseriti i valori predetti, mentre in ogni riga sono inseriti i valori reali. Questa matrice è quindi una rappresentazione dell'accuratezza dell'analisi.

Figura 20. Matrice di confusione (a sinistra) e curva ROC (a destra) realizzata con 157 campioni esaminati usando differenti combinazioni di 5 sensori di 19 materiali diversi.



Il risultato di questo studio:

I veri positivi (TPR – True positive rate) sono stati individuati con una sensibilità del 95%, mentre i veri negativi (TNR – True negative rate) con una specificità del 95%.

TPR (True Positive Rate): proporzione di pazienti con test positivo tra tutti i veri ammalati;

TNR (True Negative Rate): proporzione di pazienti con test negativo tra tutti i sani.

Curva ROC

La curva ROC (Receiver Operating Characteristics) è una tecnica statistica per misurare l'accuratezza di un test diagnostico. Permette anche di identificare il valore soglia ottimale, ovvero il cosiddetto best cut-off, e pertanto di individuare quel valore che massimizza la differenza tra i veri positivi e i falsi positivi. Per ottenere dei risultati validi utilizzando le curve ROC è indispensabile che la presenza/assenza di una specifica malattia sia accertata tramite un esame gold standard (in questo caso l'intervento chirurgico). L'area sotto la curva ROC è una misura del potere discriminante del test.

La curva ROC si costruisce considerando tutti i possibili valori del test e, per ognuno di questi, si calcola la proporzione di veri positivi (la sensibilità) e la proporzione di falsi positivi. La proporzione di falsi positivi si calcola con la formula standard: 1 - specificità. Congiungendo i

punti che mettono in rapporto la proporzione di veri positivi e di falsi positivi (dette coordinate) si ottiene una curva chiamata appunto curva ROC. L'AUC (Area Under the Curve) ovvero l'area sottostante alla curva ROC è una misura di accuratezza diagnostica: se un nuovo test discriminasse perfettamente i malati dai sani, l'AUC avrebbe valore 1, cioè il 100% di accuratezza. Nel caso in cui il nuovo test non discriminasse per niente i malati dai sani, la curva ROC avrebbe invece un'AUC di 0.5 (o 50%) che coincide con l'area sottostante la diagonale del grafico. L'area sotto la curva può quindi avere valori compresi tra 0.5 e 1.0. Tanto più la curva si avvicina al vertice del grafico quanto maggiore è la capacità discriminante del test. Un test diagnostico si considera adeguato se l'area sotto la curva è \geq all'80%.

Per interpretare i valori è possibile riferirsi alla classificazione proposta da Swets, riportata di seguito.⁷³

- 1) $AUC=0.5$ il test non è informativo;
- 2) $0.5 < AUC \leq 0.7$ il test è poco accurato;
- 3) $0.7 < AUC \leq 0.9$ il test è moderatamente accurato;
- 4) $0.9 < AUC < 1.0$ il test è altamente accurato;
- 5) $AUC=1$ test perfetto.

- Principi di funzionamento dei sensori chemoresistivi -

Il sensore è un dispositivo in grado di generare un segnale, generalmente elettrico correlato alla grandezza misurata, in risposta alla variazione di una grandezza chimica/ fisica/biologica esterna.

In particolare, un "sensore chemoresistivo" di gas è un dispositivo che rileva la presenza di uno o più gas e che trasduce variazioni delle condizioni chimiche dell'ambiente circostante, come la concentrazione dei gas, in una variazione della conduttanza. I sensori chemoresistivi sono composti da uno strato sensibile di semiconduttore, microscopicamente omogeneo, depositato su un substrato ceramico (o di silicio microlavorato) nel quale sono integrati elettrodi d'oro per la rilevazione del segnale, e da un circuito riscaldatore.

I sensori hanno il vantaggio di essere di piccole dimensioni, poco costosi, di semplice funzionamento e utilizzo. Seguono la Regola delle 3-S essendo caratterizzati dalle seguenti proprietà:

1. *Sensibilità*: la capacità di rivelare e misurare concentrazioni di una specie chimica a livello di ppm, arrivando a decine di ppb per alcuni composti,
2. *Selettività*: la capacità di rivelare e misurare la concentrazione di una sola specie chimica in presenza di un mix di sostanze. Questa proprietà risulta massima quando i sensori vengono utilizzati in array (combinazioni di diversi sensori), mentre risulta scarsa per il singolo sensore;
3. *Stabilità*: la capacità di eseguire le misure in modo riproducibile nel tempo.

I sensori devono essere fabbricati in modo da favorirne la:

1. *Riproducibilità*: la resistenza intergranulare può variare anche con piccole alterazioni nella preparazione del campione pertanto è necessario usare tecniche che siano facilmente riproducibili;
2. *Stabilità termodinamica*: non devono subire variazioni stechiometriche, strutturali o reazioni irreversibili alla temperatura di lavoro.

- I semiconduttori e il modello a bande -

È ormai di molto tempo fa la scoperta⁷⁴ che gli atomi e le molecole adsorbite sulla superficie di un semiconduttore ne influenzano le proprietà quali la conducibilità ed il potenziale superficiale. Varie furono poi le descrizioni da parte di alcuni autori di tali effetti sulla conduttanza elettrica dei semiconduttori.⁷⁵ Non tardarono così le prime applicazioni pratiche di queste scoperte, con la produzione dei primi sensori di gas a semiconduttore chemoresistivi.

Un materiale semiconduttore ha:

1. resistività compresa tra 10^{-2} e 10^9 ohm·cm,
2. conducibilità elettrica che aumenta con la temperatura,
3. ampiezza del gap dell'ordine di elettronvolt.

Le proprietà caratteristiche di un semiconduttore sono generalmente dovute all'agitazione termica, alle impurezze ed ai difetti reticolari come quelli stechiometrici.

Per poter spiegare il comportamento elettrico di questi materiali è necessario introdurre il Modello a Bande Elettroniche risolvendo l'equazione di Schroedinger per un solido cristallino.

Gli elettroni in un materiale cristallino possono assumere solo valori di energia che stanno all'interno di determinati intervalli o più specificatamente bande di energia. Secondo il Modello

a Bande Elettroniche gli elettroni non hanno energie permesse all'interno di certe bande energetiche. Pertanto, bande di energia permesse sono separate da bande di energia proibite, chiamate band gap.

In un semiconduttore la banda di energia più alta popolata di elettroni allo stato fondamentale, è denominata banda di valenza, mentre la banda sovrastante nella quale gli elettroni possono venire promossi è denominata banda di conduzione

In un semiconduttore perfetto, allo stato fondamentale, la banda di energia completamente popolata dagli elettroni è quella di valenza, mentre quella superiore interamente vuota è quella di conduzione.

I semiconduttori alla temperatura di 0 K si comportano come degli isolanti, mentre all'aumentare della temperatura differiscono da questi ultimi poiché hanno un gap minore.

Il passaggio di un elettrone dalla banda di valenza a quella di conduzione diventa più probabile con l'aumento della temperatura e con la diminuzione del gap. Quando gli elettroni superano il gap e si portano nella banda di conduzione, se viene applicato un campo elettrico nel cristallo, si genera una corrente.

È prassi semplificare il movimento degli elettroni nella banda di valenza considerando l'assenza di un elettrone come la presenza di un portatore di carica positiva, che viene denominata lacuna. Elettroni e lacune, contribuiscono alla conducibilità del materiale:

1. nei semiconduttori intrinseci il numero di elettroni in banda di conduzione è uguale al numero di lacune in banda di valenza ed è determinato unicamente dalla temperatura,
2. nei semiconduttori estrinseci la presenza di impurezze o difetti elettronici mobili o lacune, in numero disuguale, ma in modo tale che il loro prodotto rimanga costante (legge dell'azione di massa).

I semiconduttori estrinseci possono essere classificati come:

1. semiconduttori n: se il numero di elettroni è maggiore rispetto a quello delle lacune; il trasporto di carica è affidato principalmente agli elettroni, cioè alle cariche negative,
2. semiconduttori p: se il numero di lacune è maggiore rispetto al numero degli elettroni e il trasporto di carica è affidato principalmente alle lacune, cioè alle cariche positive.

Attraverso un processo chiamato drogaggio possono essere creati artificialmente i semiconduttori estrinseci. Il drogaggio consiste nell'introdurre nel reticolo del materiale semiconduttore atomi estranei con dimensioni simili a quelle dell'elemento che costituisce il materiale, che in piccola parte si sostituiscono a quelli del materiale stesso.

Se queste “impurezze” possiedono un numero di elettroni di valenza inferiore o superiore rispetto a quelli dell'atomo ospitante, possono fornire elettroni alla banda di conduzione o lacune a quella di valenza; in questo caso la conducibilità può essere prevalentemente dovuta alle lacune (*drogaggio p*) o agli elettroni (*drogaggio n*).

Quando le impurezze sono in grado di fornire elettroni di conduzione sono dette donatori, quando invece sono in grado di fornire lacune sono dette accettori.

È importante sottolineare che cambiano solo gli stati energetici degli elettroni e quindi che il cristallo rimane complessivamente neutro. Infatti, dal punto di vista del modello a bande abbiamo:

1. I donatori, che introducono livelli elettronici addizionali, ad energie poco minori dell'energia corrispondente al limite inferiore della banda di conduzione,
2. Gli accettori che introducono nuovi livelli elettronici nel gap proibito, ad energie poco maggiori del livello superiore della banda di valenza. Un elettrone che occupa uno di questi livelli lascia una lacuna in banda di valenza.

Su questo principio si basano i semiconduttori di interesse per la sensoristica, sul fatto cioè che elettroni possano venire trasferiti o rimossi dalla banda di conduzione inducendo rilevanti variazioni nella conducibilità del materiale.

Sotto condizioni di equilibrio termico, la distribuzione degli elettroni nei diversi livelli energetici è data dalla funzione di Fermi-Dirac, che fornisce la probabilità di occupazione di uno stato di energia E in funzione della temperatura assoluta T.

$$f(E) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{E - E_F}{kT}\right)}$$

dove k è la costante di Boltzmann $8,6167 \times 10^{-5} \text{ eV/K}$ e T il valore assoluto della temperatura. L'energia di Fermi E_F fornisce la probabilità che un livello di energia E sia occupato da un elettrone; è quel valore di energia E_F per il quale $f = 1/2$, ovvero un livello di energia pari a E_F ha la stessa probabilità di essere trovato pieno o vuoto.

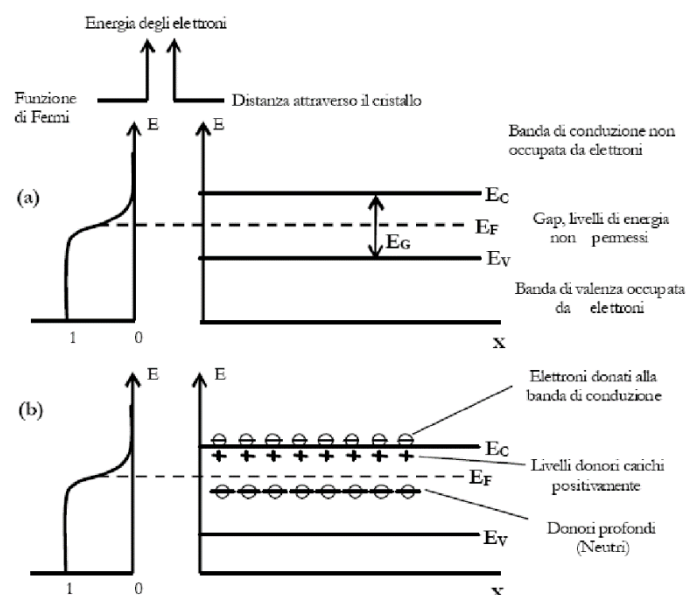
Alla temperatura di 0 K nei metalli tutti gli stati elettronici sotto a E_F saranno occupati, mentre tutti quelli sopra a E_F saranno vuoti. A temperature maggiori sarà non nulla la probabilità di trovare qualche elettrone con energia superiore ad E_F , probabilità che rimane comunque molto piccola fintantoché $(E - E_F) < kT$.

Il livello di Fermi nei semiconduttori intrinseci (Figura 21a) si posiziona tra la banda di conduzione e quella di valenza.

Nei semiconduttori estrinseci (Figura 21b):

- se introduciamo elettroni che vanno ad aggiungersi a quelli intrinseci, si crea uno spostamento del baricentro della distribuzione elettronica, per cui il valore della funzione viene traslato ad energie più alte, mantenendo inalterata la forma della funzione di Fermi;
- se introduciamo lacune che eliminano elettroni, resta inalterata la forma della funzione di Fermi, ma il valore viene traslato verso energie più basse.

Figura 21 Funzione di Fermi e diagramma a bande per un semiconduttore: (a) semiconduttore intrinseco, (b) semiconduttore estrinseco di tipo n.



- Semiconduttori per i sensori di gas -

I materiali semiconduttori più adatti per l'implementazione di sensori sono gli ossidi metallici, in contrasto con altri tipi di semiconduttori che, sotto prolungati o ciclici riscaldamenti in atmosfera ambiente, subiscono trasformazioni chimiche irreversibili formando strati stabili di ossido. Gli ossidi metallici legano l'ossigeno circostante alla loro superficie in modo reversibile. Anche per la rivelazione dei VOC i materiali più adatti sono proprio gli ossidi, essendo infatti i sensori posti a contatto con l'atmosfera è opportuno che uno dei costituenti principali della molecola sia proprio l'ossigeno. Ne consegue che l'elettronegatività

dell'elemento che si lega con l'ossigeno non deve essere troppo bassa, perché l'energia del legame si deve mantenere sempre entro un determinato range ovvero vengono utilizzati esclusivamente ossidi il cui legame ionico non abbia un'energia eccessivamente elevata. Gli elementi adatti all'impiego sensoristico hanno un'elettronegatività compresa fra 1,54 (titanio) e 2.16 (molibdeno).

Gli elementi utilizzati più frequentemente sono elencati in Tabella 12.

Tabella 12. Elementi utilizzati nei sensori

ELEMENTO	ELETTRONEGATIVITA'	Z (Numero Atomico)
Ti	1,54	22
Zn	1,65	30
W	1,7	74
In	1,78	49
Pb	1,8	82
Ga	1,81	31
Cu	1,9	29
Sn	1,96	50
Sb	2,05	51
Mo	2,16	42
O	3,44	8

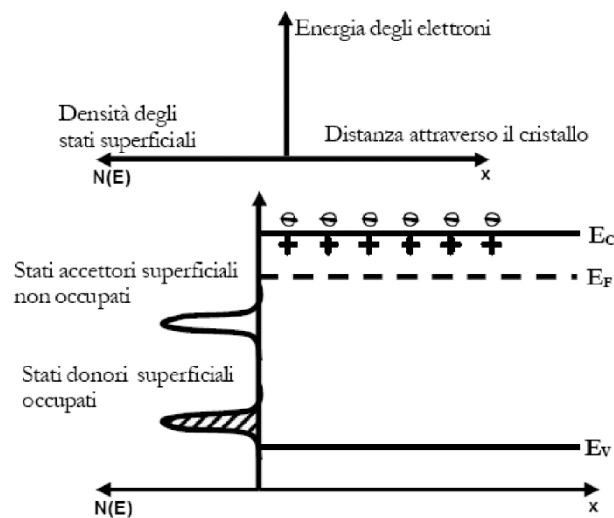
Questi elementi insieme all'ossigeno andranno a formare ossidi metallici come ZnO, SnO₂, TiO₂, WO₃ che si comportano come semiconduttori con legami ionici, diversi da altri semiconduttori come il silicio o il germanio, che formano legami covalenti.

- La superficie -

La superficie del semiconduttore è un'imperfezione, poiché è una regione dove la normale periodicità del cristallo viene interrotta da atomi o ioni con legami incompleti. Questi stati

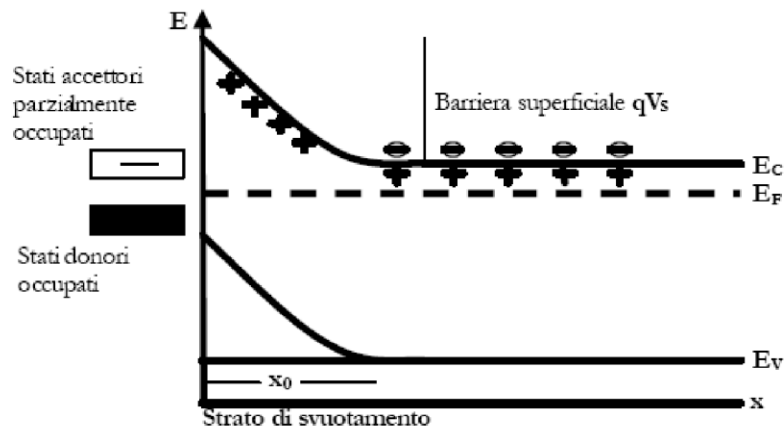
superficiali sono maggiormente reattivi e possono catturare o cedere elettroni. Gli ossidi metallici si comportano come semiconduttori ionici: il metallo può essere considerato come il catione e l'ossigeno come l'anione. Gli ioni ossigeno adsorbiti sulla superficie del grano fungono da accettori, la vacanza di ossigeno fungono invece da donatori.

Figura 22. Stati superficiali in un semiconduttore di tipo n nel caso di banda piatta, cioè di una situazione con carica superficiale netta nulla.



La Figura 22 mostra il caso di “banda piatta” in cui la carica superficiale netta è nulla e il semiconduttore (di tipo n) non è in equilibrio. L'energia di Fermi è collocata fra il fondo della banda di conduzione e i livelli donatori, in questo modo il potenziale chimico degli elettroni negli stati superficiali (alla temperatura di 0 K energia di Fermi e potenziale chimico coincidono) è più basso di quello nel bulk (volume interno). In queste condizioni gli elettroni della banda di conduzione nel bulk si muovono verso gli stati superficiali, andando ad occupare gli stati liberi ad energia inferiore (accettori), raggiungendo la configurazione di massima stabilità. Grazie a questo movimento di elettroni si ottiene una carica superficiale non nulla e di una di segno opposto nel bulk, posseduta dagli ioni donatori (Figura 23).

Figura 23. Doppio strato di carica costituito da carica negativa in superficie e carica positiva dovuta agli ioni donatori non compensati nel bulk nel caso di semiconduttore di tipo n.



- L'interazione con la superficie -

Esistono diversi tipi di interazione tra gas e superficie dei semiconduttori:

Effetto di bulk: un semiconduttore in aria subisce una variazione stechiometrica, in presenza di un gas o vapore organico perché, all'equilibrio, parte dell'ossigeno viene catturato dal materiale con una conseguente alterazione della conducibilità.

Nei sensori utilizzati in questa tesi, è un effetto secondario.

Adsorbimento di gas: un gas ossidante adsorbe ed estrae elettroni dal film semiconduttore, (diminuendone la conducibilità se di tipo n), mentre un gas riducente o vapore, reagisce con l'ossigeno del materiale che quindi si ossida: gli elettroni ritornano al semiconduttore. Talvolta è complesso stabilire quale dei due processi è motivo di variazione di conducibilità ma, se la variazione è veloce confrontata con il tasso di diffusione delle lacune di ossigeno del semiconduttore, si può essere ragionevolmente pensare che la variazione di conducibilità non sia dovuta alla variazione della composizione del bulk ma allo scambio di ioni in prossimità della superficie.

- Conducibilità di un film -

La conduttanza di un cristallo di larghezza W , spessore t e lunghezza L , è definita come la dipendenza della densità dei portatori di carica dalla temperatura e funzione dei livelli energetici dei donatori dominanti.

$$G = \frac{\sigma W t}{L}$$

A temperatura ambiente se i livelli dei donatori sono vicini alla banda di conduzione, gli ioni donatori sono completamente ionizzati: all'aumentare della temperatura, la densità degli elettroni nella banda di conduzione resta invariata. A temperatura ambiente se i livelli dei donatori sono più profondi rispetto alla banda di conduzione, gli elettroni non sono completamente eccitati in banda di conduzione; all'aumentare della temperatura, invece, la densità degli elettroni di conduzione cresce esponenzialmente. A temperature sufficientemente alte, indipendentemente dalla profondità dei livelli donatori, si possono produrre dei difetti nel reticolo che modificano la concentrazione degli elettroni e quindi la conducibilità.

Gli elettroni in banda di conduzione e le lacune in banda di valenza si muovono, sia forzati da un campo elettrico imposto dall'esterno, sia per diffusione associata ad un gradiente di concentrazione.

Nel caso unidimensionale il flusso di densità di corrente è:

$$J_i = \sigma_i \cdot E - D_i z_i e \cdot \frac{dC_i}{dx}$$

dove E è il campo elettrico esterno, D_i il coefficiente di diffusione della i -esima specie, z_i il numero di cariche elettroniche sulla particella i -esima e c_i la concentrazione della specie i -esima.

La variazione della conduttanza di un ossido semiconduttore in presenza di gas nell'atmosfera è esprimibile come la differenza tra la conduttanza di bulk G_{Xo} e la perdita, o il guadagno, di conduttanza dovuta agli effetti superficiali G_o , ovvero:

$$-G_o = \frac{\Delta N_e W_u}{L}$$

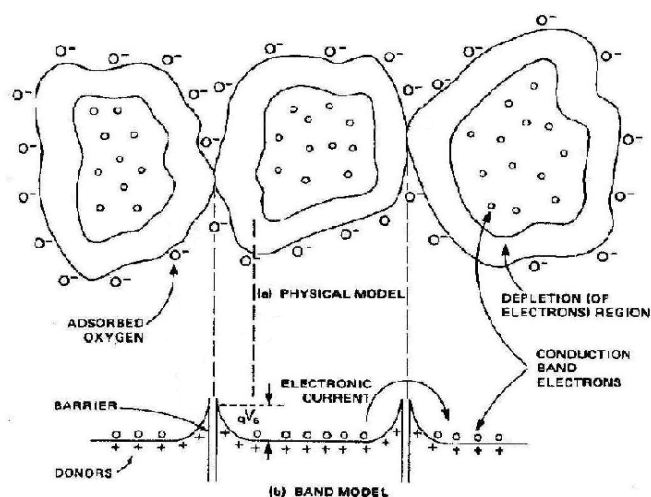
Si può calcolare direttamente la variazione del numero effettivo di elettroni, conoscendo la conduttanza a $V_s = 0$ (intendendo con V_s il valore della barriera superficiale) e misurando la variazione della conduttanza $G_{Xo} - G_o$.

La perdita di conduttanza dovuta agli effetti superficiali è una frazione piccola della conduttanza di bulk, a meno che il campione non sia molto sottile.

Generando una morfologia superficiale a grani molto fini, creando cioè una forte porosità, si aumenta la sensibilità ai gas poiché aumentando il rapporto superficie/volume si fa prevalere la variazione di conducibilità superficiale.

All'interno dei grani il comportamento è di tipo ohmico, ma a causa della carica superficiale nei punti di contatto si forma una barriera Schottky (Figura 24). In questi punti la conducibilità sarà limitata dal trasporto di carica attraverso la barriera stessa.

Figura 24. Schema rappresentante lo strato di svuotamento (a), e andamento della barriera di potenziale nella regione intergranulare (b). Caso del contatto Schottky.



Questo ci porta ad introdurre i meccanismi di conduzione responsabili dei segnali elettrici misurati ai capi del sensore. I sensori per gas utilizzati, sono costituiti da uno strato poroso composto da grani di materiale sensibile parzialmente sinterizzati, quindi gli elettroni sono obbligati ad oltrepassare la barriera superficiale formata nei contatti intergranulari. È proprio la morfologia porosa del materiale sensibile che permette ai gas di accedere al materiale superficiale.

L'energia di attivazione per la conduttanza è quindi direttamente correlata alla carica superficiale delle specie presenti nell'ambiente ed è quindi funzione della composizione dell'atmosfera. Nei contatti intergranulari, nella zona vicina alla superficie, è presente la regione di svuotamento perciò in questa zona la resistenza elettrica cresce. Pertanto, è proprio il contatto intergranulare il responsabile della maggior parte della resistenza elettrica fornita dal

campione, poiché i portatori di carica si trovano costretti a superare la barriera di potenziale V_s per poter passare da un grano all'altro.

$G = G_0 \cdot \exp\left(-\frac{eV_s}{kT}\right)$ è l'equazione che fornisce un'espressione approssimata della *conduttanza* di un film policristallino di ossido semiconduttore, dove G_0 è la costante di proporzionalità funzione dei parametri bulk e geometrici del dispositivo e eV_s è l'energia di attivazione per la conduttanza.

Gli ossigeni ionosorbiti catturano gli elettroni causando l'innalzamento della barriera di potenziale V_s e causando una variazione della conduttanza.

L'energia di attivazione per la conduttanza (eV_s) è influenzata dalla carica e dalla frazione di specie superficiali ed è perciò funzione della composizione dei gas dell'atmosfera.

La necessità di utilizzare un film di ossido semiconduttore policristallino, in cui i grani siano più piccoli possibile è fondamentale considerando gli effetti della superficie nel funzionamento dei sensori chimici per gas. Più la dimensione dei grani è piccola, più aumenta il rapporto superficie/volume, rendendo gli effetti superficiali dominanti su quelli di bulk.

2. CAPITOLO 2 - Obiettivi

L'obiettivo di questa tesi è quello di dimostrare come specifici composti volatili organici (VOC), presenti all'interno delle esalazioni di gas isolate dai campioni di feci di pazienti con patologie neoplastiche e preneoplastiche (adenomi) del colon-retto, possano essere sfruttati per implementare le metodiche di screening per la diagnosi precoce del cancro del colon-retto.

Attualmente in Emilia-Romagna il protocollo di screening di prevenzione del cancro del colon-retto utilizza come test per individuare i pazienti da inviare alla colonscopia il FIT (test immunologico per la ricerca del sangue occulto nelle feci), il quale presenta un alto tasso di falsi positivi per CCR (circa il 60%), poiché il sanguinamento rilevato dal test può derivare anche da cause diverse come ad esempio la presenza emorroidi sanguinanti, ragadi ecc

L'importanza dell'impiego di un nuovo test di screening, pensato come test di triage al FIT, permetterebbe di diminuire il numero di pazienti inviati ad eseguire la colonscopia come falsi positivi.

In definitiva l'obiettivo è quello di riuscire a realizzare un test specifico, sensibile, non invasivo e a basso costo, da utilizzare sui pazienti positivi al FIT per identificare in modo più specifico le lesioni neoplastiche ad uno stadio precoce e di conseguenza ridurre il numero di colonscopie non operative effettuate⁷⁶. Le colonscopie sui falsi positivi al FIT rappresentano:

1. un disincentivo alla partecipazione allo screening da parte della popolazione;
2. un potenziale rischio soprattutto per i pazienti più anziani e debilitati;
3. una spesa non irrisoria sia per il Sistema Sanitario Nazionale che per il Sistema Sanitario Regionale.

Migliorare lo screening, avvalendosi di un test che aumenti la specificità del FIT, dovrebbe impattare positivamente sull'adesione al programma di prevenzione e conseguentemente sull'incidenza e sulla mortalità cancro-correlata. È noto infatti, grazie ad uno studio condotto sulla popolazione che ha effettuato lo screening, che questo programma di prevenzione permette di ridurre del 30% la mortalità per CCR.^{34,35}

I risultati prodotti degli screening organizzati in E-R hanno inoltre dimostrato che, al progredire dei round di screening, aumenta il numero di lesioni diagnosticate ad uno stadio precoce (pT1) rispetto a quelle avanzate.

Il nostro obiettivo è quindi quello di dimostrare, come la metodica di analisi dei VOC tramite l'utilizzo di SCENT A1, strumento brevettato e concepito con l'obiettivo di eseguire un'analisi non invasiva, in-vitro, dei prodotti volatili presenti nei campioni di feci, può

essere utilizzata per discriminare meglio i soggetti sani da quelli affetti da adenoma o da neoplasia colon-rettale.⁷⁶

I VOC contenuti nelle feci dei soggetti sani, derivano per la maggior parte dal microbiota intestinale del colon, in seguito ai processi di fermentazione e al susseguirsi delle varie fasi del metabolismo dei microorganismi stessi.^{55, 56, 59} Le emissioni di gas delle feci possono variare la loro composizione a seconda della dieta, contenendo percentuali variabili di metano (CH₄) e di acido solfidrico (H₂S), prodotti dalla digestione dei vegetali; di idrogeno (H₂) prodotto dalla digestione della carne; di monossido e biossido di azoto (NO, NO₂) prodotti da batteri normalmente presenti nell'intestino come innocui coliformi, regolatori del tono della muscolatura liscia intestinale⁷⁷, o ospiti patologici come *Helicobacter pylori*.⁷⁸

Diversi studi che hanno dimostrato che ciascun tipo di tumore si caratterizza per un profilo di VOC specifico, completamente differente dalla normalità.^{58,59,60,61,62}

Ricerche pubblicate documentano come, sin dallo stadio di adenoma a basso rischio, la composizione dei gas fecali viene infatti caratterizzata da biomarcatori tumorali⁷⁹ e quindi i soggetti affetti da neoplasia e lesioni preneoplastiche del colon-retto hanno quindi un pattern di VOC differente da quello dei controlli sani (con colonscopia negativa). Tra i VOC che si riscontrano selettivamente nei pazienti affetti da CCR vi sono il benzene, l'1-iodo-nonano e il decanale (le cui formule chimiche sono state già mostrate precedentemente).

Per poter individuare questi VOC nei campioni di feci il nostro primo obiettivo è stato quello di sviluppare specifici e selettivi sensori di gas in grado di rilevare la presenza di decanale, 1-iodo-nonano e di benzene, calibrati in modo tale da non risultare eccessivamente responsivi ai normali gas prodotti dalla digestione o dalla flora residente, ovvero i cosiddetti "interferers" o gas interferenti.

È stato quindi individuata, tramite uno studio condotto in laboratorio su un intestino artificiale, la giusta combinazione di sensori, un array in grado di individuare solo ai VOC legati al CCR e agli adenomi. Una volta individuato l'array si è costruito il dispositivo denominato SCENT A1 (di cui si è parlato nel dettaglio in precedenza) che è stato testato, in uno studio preliminare a questo, sulle feci di soggetti sani e feci di soggetti con CRC, raccolte direttamente durante l'intervento chirurgico. Nello studio preliminare sono stati analizzati in cieco campioni 71 di feci di persone sane e su 86 campioni di feci di pazienti con cancro, raccolte durante l'intervento chirurgico.

Il nostro studio, supportato dall'approvazione del progetto da parte dal Comitato Etico Interaziendale della Provincia di Ferrara, è stato condotto al fine di valutare la capacità reale

del dispositivo SCENT A1 basato sulla tecnologia sensoristica dei gas, di distinguere tra miscele gassose prodotte da feci di pazienti sani e miscele gassose presenti nelle feci di pazienti affetti da adenoma o carcinoma del colon-retto nei pazienti positivi al FIT.

Testare lo SCENT A1 nei pazienti che partecipano allo screening del cancro di prevenzione del colon-retto permettere di valutare se il dispositivo è specifico per adenomi e CCR, quindi se risulta in grado di migliorare la performance del FIT, se risulta facile da utilizzare e ben accettato dai paziente.

3. CAPITOLO 3 - Materiali e metodi

Reclutamento pazienti e acquisizione campioni

Per l'acquisizione dei campioni da analizzare con SCENT A1, e successivamente confrontarli con la colonscopia, sono stati arruolati pazienti di ambo i sessi della fascia di età 50-69 anni che rispondevano alle seguenti tre caratteristiche:

1. avevano aderito al programma di screening regionale per la prevenzione del cancro del colon-retto;
2. erano risultati positivi al FIT;
3. avevano aderito all'indagine di approfondimento di secondo livello (colonscopia).

Non sono stati inclusi nello studio i pazienti con diagnosi nota di malattia infiammatoria cronica intestinale, che avevano eseguito terapie antibiotiche nel mese precedente e/o assunto nel mese precedente probiotici o lassativi.

Questi pazienti, secondo il protocollo di screening di prevenzione in uso in E-R, devono essere indirizzati all'esecuzione di una colonscopia. È proprio durante il colloquio informativo pre-colonscopia che è stato proposto ai pazienti di partecipare al progetto di ricerca, attraverso la donazione di un piccolo campione di feci, da riconsegnare al Centro Screening oncologici utilizzando uno specifico contenitore per la raccolta (ARTSANA SpA Feces Container STER 18140), al fine di standardizzare le condizioni di raccolta e conservazione.

A tale scopo sono stati consegnati ai pazienti aderenti allo studio il contenitore e un modulo con le procedure per la raccolta del campione (Allegato 1) ed è stata richiesta loro la firma per l'adesione allo studio (Allegato 2) e per il consenso informato (Allegato 3). A questi pazienti è stato somministrato anche un breve questionario teso ad escludere l'utilizzo di alcuni farmaci o altre condizioni che possano influenzare l'analisi dei VOC (Allegato 4) e rilasciata una lettera informativa per il Medico Curante (Allegato 5).

I VOC sono delle molecole volatili e termosensibili, quindi di difficile manipolazione, pertanto è stato ampiamente spiegato ai partecipanti allo studio che il campione di feci, dopo esser stato prelevato nel giorno antecedente l'inizio della preparazione intestinale, doveva essere conservato massimo per una notte in congelatore per poi essere riconsegnato al Centro Screening che ha provveduto a conservarli a -18°C in attesa di sottoporli alle analisi.

Il campione quindi per essere analizzato con SCENT A1 deve:

1. essere immediatamente riposto in congelatore, per evitare la proliferazione di batteri che con il loro metabolismo potrebbero alterarne le caratteristiche;
2. essere estratto dal congelatore circa 30 minuti prima dell'analisi ed essere inserito all'interno del dispositivo SCENT A1 senza preventivo scongelamento, al fine di evitare la dispersione e conseguente perdita dei composti organici volatili in esso contenuti;
3. essere etichettato in modo tale da mantenere l'anonimato sul paziente;
4. essere marchiato sull'etichetta con la data dell'avvenuto congelamento (per la misura del tempo trascorso in frigorifero).

L'analisi dei campioni raccolti per lo studio, eseguita da un tecnico, prevedeva:

- l'estrazione dal freezer circa 60 minuti prima dell'introduzione nel box di analisi;
- l'inserimento del campione di feci all'interno del box di analisi, mediante il dispositivo SCENT A1;
- il prolungamento della durata di ogni analisi di circa 30 minuti, allo scopo di raccogliere il maggior numero possibile di dati.

Al fine di garantire una sufficiente potenza statistica (definita come la probabilità di dichiarare significativo un test sotto ipotesi alternativa) è stata calcolata la numerosità del campione⁸⁰ n necessaria a garantire una potenza statistica del 95%, con l'equazione:

$$n = \frac{1.96^2 P_{att} (1 - P_{att})}{D^2}$$

↑ dimensione del campione
↑ prevalenza attesa
↑ n
↓ D^2

↓ precisione assoluta desiderata

dove P_{att} è la prevalenza di attesa (definita come il VPP della colonscopia) e D la precisione assoluta desiderata (definita come la % di FIT positivi). Sulla base di questi valori, assumendo un intervallo di confidenza del 95%, il calcolo fornisce una numerosità pari a 450.

Si è scelta una prevalenza attesa pari al 25%, che è il valore predittivo positivo delle colonscopie di screening effettuate come accertamento di secondo livello (test gold standard dello studio) e una precisione assoluta del 4%.

Per ogni paziente partecipante allo studio è stato creato un file Excel (Fig. 25) in cui sono registrati i parametri: tipo istologico, dimensione della lesione, grado di displasia, sito della lesione, numero di lesioni asportate e recuperate, tipo di chirurgia, TNM e stadio di Dukes.

Figura 25. Parametri registrati per ogni paziente aderente allo studio

	Bianco LR e Neg	Arancio HR	Rosso CA	Azzurro non eseguita colon									
NFIT	CAT	Esito	ng/ml	Caratteristiche inadeguate	Tipologia	Istologia	Displ	Dim (mm)	Sede	Chir	Data	Ist.	
1	1	neg	605										
7	2	pos	100	adenoma iniziale	sessile	adenoma tubulare 1.	basso grado	3	sigma				
2	3	pos	124	adenoma avanzato	1 2 sessile	Adenoma tubulare 2.	1 alto grado.	2	1- sigma				
3	1	neg	158	negativo		tubulare	basso grado.	1-0,7 mm	2- sigma				
17	2	pos	432	adenoma iniziale	sessile	adenoma tubulare	basso grado	10	ceco				

Si è reso poi necessario verificare che la popolazione dei partecipanti e dei non partecipanti allo studio fosse sovrapponibile in base allo stato di salute e sono stati pertanto confrontati i risultati delle colonscopie in entrambe le popolazioni.

Si è reso anche necessario verificare che la popolazione dei partecipanti e dei non partecipanti allo studio fosse sovrapponibile in base all'età e per analizzare questa condizione sono state suddividendole in classi di età: 50-54, 55-59, 60-64, 65-69+.

Queste due analisi sulle popolazioni sono fondamentali per garantire la potenziale universalità del test SCENTA 1.

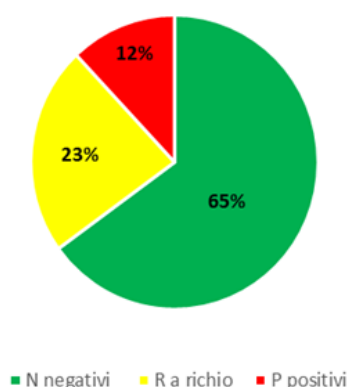
Successivamente i dati delle misure dei campioni ottenute da SCENTA 1 sono stati registrati secondo uno specifico algoritmo realizzato in LabView ed analizzati da un secondo software che si avvale di tecniche come analisi delle componenti principali (PCA) e support vector machine (SVM).^{81,82}

Nel programma di screening organizzato, i dati della colonscopia (gold standard del nostro studio) sono stati divisi, in base al loro grado di rischio, in tre categorie:

1. ALTO RISCHIO E CCR – tre o più adenomi; un adenoma di dimensioni superiori a 10 mm; adenoma con componente villosa o displasia di alto grado;
2. BASSO RISCHIO – 1-2 adenomi di dimensioni inferiori a 10 mm; adenoma tubulare o displasia di basso grado;
3. NEGATIVI – soggetti sani.

I 398 campioni analizzati con SCENT A1 sono stati inizialmente suddivisi in N negativi (65%), R basso rischio (23%) e P positivi (12%) in concordanza con la suddivisione in categorie di rischio previste nello screening di prevenzione (Figura 26).

Figura 26. Divisione in tre categorie di rischio: NEG (negativo alla colonscopia), LOW (adenomi a basso rischio) e HR + CCR (carcinomi e adenomi ad alto rischio).



Per valutare l'accuratezza diagnostica del dispositivo SCENT A1, il protocollo di studio prevede però la costruzione di una variabile binaria, pertanto i pazienti positivi al FIT sono stati raggruppati con due modalità differenti, in due macrocategorie a seconda dei risultati del gold standard di riferimento.

Nel primo caso le due macrocategorie sono state così costituite:

1. negativi alla colonscopia (soggetti sani);
2. positivi alla colonscopia (tutte le tipologie di carcinoma e di adenomi).

Nel secondo caso le due macrocategorie sono state così costituite:

1. negativi alla colonscopia (soggetti sani e adenomi a basso rischio);
2. positivi alla colonscopia (tutte le tipologie di carcinoma e di adenomi ad alto rischio).

Siamo così riusciti ad ottenere una variabile binaria, che ci ha consentito la costruzione delle Tabelle di contingenza, con le quali abbiamo potuto calcolare i parametri di potenza diagnostica di SCENT A1 (sensibilità, specificità, accuratezza, valore predittivo positivo, valore predittivo negativo).

L'end-point primario di questo studio è rappresentato dal confronto dell'analisi dei VOC rispetto al risultato della colonscopia per la presenza/assenza di lesioni neoplastiche/preneoplastiche.

L'end-point secondario è rappresentato da un'analisi sulla specificità dei VOC rispetto al FIT nell'identificare adenomi e carcinomi del colon.

Questo studio è stato, approvato dal Comitato Etico Unico della Provincia di Ferrara (Allegato 6), condotto congiuntamente al Dipartimento di Fisica e Scienze della Terra dell'Università di Ferrara, al Dipartimento di Scienze biomediche e chirurgiche dell'Università di Ferrara; al Centro Screening Oncologici del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'AUSL di Ferrara e al Dipartimento di Gastroenterologia del Nuovo Arcispedale S. Anna.

Analisi dei dati

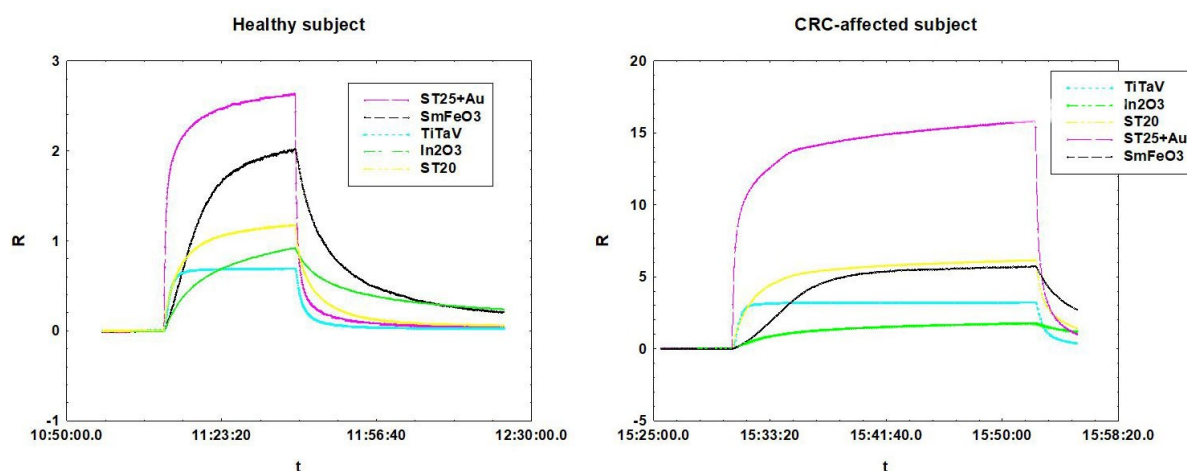
Nello studio preliminare a quello descritto in questa tesi avevamo testato diverse combinazioni di materiali per selezionare il pattern di sensori più adeguato da applicare al dispositivo SCENT A1. Come già descritto in *“Array di sensori utilizzati in laboratorio”*, il pattern utilizzato è stato calibrato dopo aver testato 19 differenti materiali, in modo da individuare la combinazione di sensori in grado di massimizzare la differenza tra i campioni positivi e quelli negativi oggetto di studio, ovvero feci provenienti dai controlli sani e feci di pazienti affetti da CCR, prelevate durante l'intervento chirurgico. I sensori utilizzati risultano ottimali per questa applicazione in quanto sono altamente sensibili per i gas oggetto di studio.

In Figura 27 è mostrata la risposta dell'array selezionato su di un soggetto sano e su un soggetto malato, dove in ordinata vi R (la risposta) e in ascissa il tempo (orario).

La misura successiva può esser effettuata previo pulizia della pneumatica mediante flusso di aria ambiente.

Lo strumento può essere riutilizzato sempre se sottoposto a normale manutenzione e non è soggetto ad un numero limitato di misure.

Figura 27. Curve di risposta dinamica dell'array di sensori, impiegate per l'analisi su due soggetti FIT positivi. A sinistra il soggetto negativo alla colonscopia, a destra il soggetto affetto da CCR.



La risposta è definita come $R = \Delta G / G$, dove ΔG è la differenza tra la conduttanza del sensore in presenza del gas (G_{gas}) e la conduttanza del sensore nell'aria (G).

Per riuscire a discriminare i pazienti sani da quelli malati i dati raccolti sono stati registrati secondo uno specifico algoritmo realizzato in LabView ed analizzati da un secondo software che si avvale di tecniche come analisi delle componenti principali (PCA) e support vector machine (SVM).^{81,82}

PCA Principal Component Analysis

La PCA o Principal Component Analysis è una procedura matematica che consente di trasformare un numero di variabili ipoteticamente correlate, in uno più piccolo. È un metodo di semplificazione dei dati.

Questo metodo è stato utilizzato solo all'inizio dello studio, poi sostituito dal metodo SVM che si è rivelato migliore per il nostro studio.

Con la PCA è possibile rappresentare su di un grafico ogni campione testato come un punto, in un intervallo dimensionale di variabili minore, è pertanto possibile identificare due regioni ellissoidali, corrispondenti rispettivamente al gruppo di pazienti sani e a quello dei pazienti affetti da CCR.

La PCA permette di ridurre le dimensioni dei dati massimizzandone la varianza, ovvero mette in evidenza ed esprime le differenze esistenti tra le variabili del campione.

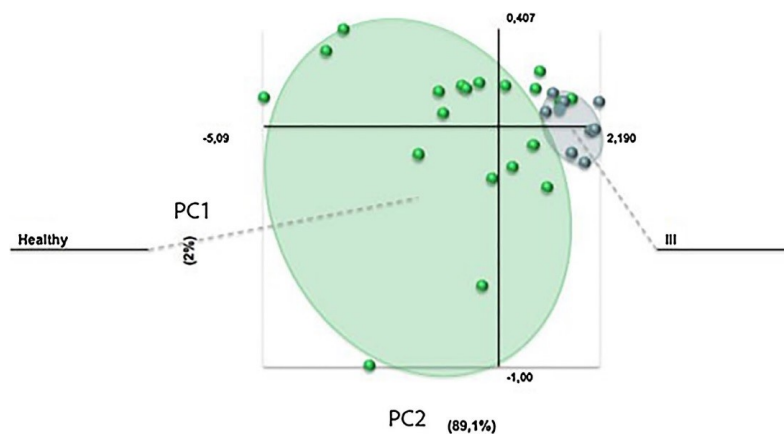
Per eseguire questa semplificazione utilizza un numero inferiore di “fattori” o “componenti principali”, quindi individuare le componenti principali significa trovare un compromesso tra perdita di informazioni e riduzione delle dimensioni del sistema. La riduzione delle dimensioni delle variabili porta anche a mostrare in maniera più immediata la relazione esistente tra di esse, consentendone ad esempio la rappresentazione su un diagramma cartesiano.

In questo modo con la PCA si può costruire uno spazio diverso su cui rappresentare i campioni, ridefinendo gli assi attraverso l'utilizzo delle componenti principali al posto delle variabili originarie.

In sintesi, lo scopo della PCA è quello di descrivere le distanze tra i punti, distribuzione e variabilità, impiegando il minor numero di dimensioni possibili.

I parametri utilizzati per condurre l'analisi sono i valori di risposta dell'array di sensori scelto per lo studio.

Figura 28. PCA relativa all'array utilizzato sui primi 28 campioni



In Figura 28 sono mostrati i risultati della prima parte dello studio effettuato su 18 campioni di pazienti sani (puntini verdi) e di 10 campioni ottenuti di pazienti con CCR (puntini blu). L'area verde rappresenta la popolazione sana mentre l'area blu rappresenta la popolazione affetta da CCR.⁸³

È visivamente evidente che l'overlap tra di esse è minimo e questo è indicativo della grande capacità discriminativa dello strumento.

Per massimizzare il margine geometrico e minimizzare l'errore di classificazione empirico 20 variabili sono state successivamente processate con l'algoritmo SVM (Support Vector Machine), che abbiamo individuato essere il miglior metodo di analisi per lo SCENT A 1.

SVM Support Vector Machines

SVM o Support Vector Machines macchine a vettori di supporto, o macchine kernel, appartengono alla famiglia dei classificatori lineari generalizzati, quindi sono delle metodologie di apprendimento supervisionato per la regressione e la classificazione di pattern.⁸¹

Siccome sono in grado allo stesso tempo di minimizzare l'errore empirico di classificazione e massimizzare il margine geometrico sono noti anche come classificatori a massimo margine.

Un classificatore lineare ha l'obiettivo di usare le caratteristiche degli oggetti per identificare a quale classe (o gruppo) appartengono. Per identificare la classe di appartenenza degli oggetti analizzati bisogna decidere di basare la classificazione sul valore di una combinazione lineare di caratteristiche.

Un modello SVM è una rappresentazione dei campioni come punti nello spazio organizzati in modo tale che la divisione tra le diverse categorie sia evidenziata da un gap più ampio possibile. Successivamente nuovi campioni possono essere disposti in quello stesso spazio e verranno associati ad una categoria o all'altra in base al lato del gap in cui ricadono.

In questo studio si è utilizzato il metodo SVM per calcolare la specificità e la sensibilità dello SCENT A 1. Utilizzando l'SVM, in particolare nella "k-fold cross validation test" il campione originario (totale dei dati 398) viene diviso in un numero k di sottocampioni. Il valore di k è stato deciso dopo una serie di prove = 3. Di questi k sottocampioni, uno è stato utilizzato per testare l'algoritmo (validation data), mentre i rimanenti k-1 sottocampioni sono stati utilizzati per l'allenamento dell'algoritmo (training data). Quando l'algoritmo è risultato "allenato" si è inserito, quindi, il validation data, che ha costituito da prova per il test in doppio cieco.

In sostanza il validation data è stato necessario per dimostrare che l'algoritmo è in grado di distinguere i pazienti sani ed i pazienti malati di questo sottocampione (di cui non si conoscevano ancora gli esiti alla colonscopia).

Questo processo è ripetuto più e più volte, ruotando progressivamente i sottocampioni.

Al termine di tutto il processo il risultato ottenuto è la media dei risultati di tutte le rotazioni ed è attendibilmente una stima del valore predittivo in doppio cieco del test.

4. CAPITOLO 4 - Risultati

Tra Maggio 2016 e Luglio 2019 cinquecento pazienti di ambo i sessi, arruolati durante i colloqui di screening che precedono l'esecuzione della colonscopia, sono stati inclusi nello studio.

I risultati che illustrerò in questo capitolo sono oggetto del paper “Clinical validation outcomes of a non-invasive device for colorectal cancer preventive screening through fecal exhalation analysis” che abbiamo sottoposto a rivista scientifica per la pubblicazione.⁸⁴

All'inizio dell'analisi dei risultati è stato necessario valutare la numerosità occorrente per garantire una sufficiente potenza statistica dello studio stesso. Utilizzando la Formula per il calcolo della numerosità del campione (Figura 25 di Materiali e Metodi), assumendo un intervallo di confidenza del 95%, il calcolo fornisce una numerosità pari a 450.

I pazienti che sono stati coinvolti nello studio sono stati 500, un numero sufficiente per:

1. garantire una sufficiente potenza statistica dello studio stesso;
2. una prima calibrazione dell'algoritmo di riconoscimento e visualizzazione;
3. calcolare sensibilità e specificità del metodo nella capacità di discernere feci di soggetti sani da feci di soggetti affetti da forme preneoplastiche o neoplastiche del colon-retto tra quelle risultanti positive al FIT;
4. calcolare il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo del test.

Nel periodo in cui è stato condotto lo studio il numero di pazienti che avevano aderito allo screening di prevenzione e che erano risultati FIT positivi a Ferrara, e quindi afferenti all'endoscopia del Nuovo Arcispedale S. Anna lo studio, è stato pari a 1130.

Questi 1130 pazienti sono stati suddivisi in due popolazioni, una aderente allo studio e una non aderente allo studio che sono state analizzate per attestare che fossero comparabili per lo stato di salute e per l'età.

La popolazione che non è stata testata con SCENT A1 era costituita di 630 pazienti:

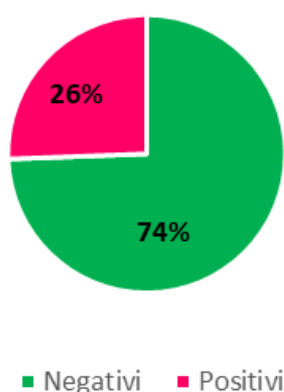
- 448 erano i pazienti risultati FIT positivi che avevano partecipato allo screening di prevenzione nei periodi estivi, momento in cui lo studio si interrompeva;
- 192 erano i pazienti risultati FIT positivi che avevano rifiutato di partecipare allo studio o non che erano idonei (affetti da IBD o per assunzione di farmaci nel mese precedente) o che erano stati reclutati al colloquio pre-colonscopia quando il medico sperimentatore era temporaneamente assente.

Osservando il database completo riguardante i 630 non aderenti a SCENT A1, 74 dei quali sono stati sottratti al totale perché avevano rifiuto di eseguire la colonscopia o avevano presentato al colloquio una colonscopia recente documentata, si ottiene una popolazione di non partecipanti allo studio, ma di cui abbiamo il risultato della colonscopia, di 562 soggetti.

Analizzando i risultati della colonscopia (gold-standard) di questi su 562 pazienti abbiamo osservato (Figura 29) che:

- 418 (74,4%) risultavano negativi alla colonscopia (soggetti sani);
- 144 (25,6%) risultavano positivi alla colonscopia (tutti i tipi di adenomi e carcinomi coloretali).

Figura 29. FIT+ non aderenti a SCENT A1: NEG e POS (CCR + HR + LOW) alla colonscopia.



La popolazione arruolata per lo studio con SCENT A1 è stata di 500 pazienti.

I campioni testati con SCENT A 1 sono stati 398, perché:

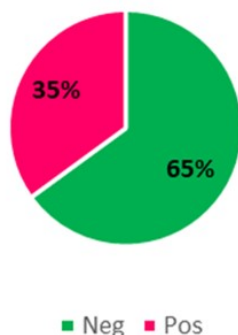
- 13 pazienti non avevano effettuato l'esame colonscopico, per rifiuto o per motivi di salute (8 colonscopie rigettate, 5 colonscopie non eseguite per ragioni di salute)
- 102 campioni sono stati scartati a causa di errori nella conservazione dei campioni da parte dei pazienti.

L'alto numero di errori di conservazione si è particolarmente concentrato nel primo anno di studio: si erano verificati alcuni problemi nella trasmissione delle informazioni ai pazienti. Tali errori sono diminuiti progressivamente grazie all'ottimizzazione delle istruzioni ed alla crescente esperienza del medico sperimentatore in carica.

Osservando i risultati alla colonscopia (gold-standard) di questi 398 pazienti (Figura 30) abbiamo osservato che:

- 260 (35%) risultavano negativi alla colonscopia (soggetti sani);
- 138 (65%) risultavano positivi alla colonscopia (tutti i tipi di adenomi e carcinomi colorettali): 54 adenomi a basso rischio e 84 adenomi ad alto rischio e carcinomi.

Figura 30. FIT+ aderenti a SCENT A1: NEG e POS (CCR + HR + LOW) alla colonscopia



Da questa analisi possiamo pertanto affermare che le due popolazioni risultano comparabili per lo stato di salute.

Supponiamo che i valori leggermente discrepanti delle percentuali di pazienti positivi al FIT e negativi alla colonscopia tra popolazioni aderenti e non aderenti a SCENT A 1 siano dovuti al fatto che tra la popolazione aderente allo studio non siano stati arruolati i pazienti con IBD.

Questi pazienti sono generalmente falsi positivi per il FIT e quindi negativi alla colonscopia a causa di sanguinamenti di origine diversa da quella neoplastica o preneoplastica.

I risultati (Tabella 13) mostrano che le popolazioni aderenti e non aderenti al test SCENT A1 sulle fasce di età risultano sovrapponibili e quindi anche per questa variabile comparabili.

Tabella 13. Popolazione catalogata per età

Popolazione	Età 50/54	Età 55/59	Età 60/64	Età 65/69+	TOTALE
NO SCENT A1 (#)	130	114	132	186	562
SCENT A1 (#)	93	91	79	135	398
NO SCENT A1 (%)	23	20	24	33	100
SCENT A1 (%)	23	23	20	34	100

Utilizzando l'algorithmo di analisi basato su SVM sono stati ottenuti due istogrammi che mostrano la sensibilità e la specificità di SCENT A1.

Le colonne blu degli istogrammi sono i valori ottenuti nelle rotazioni dei sottocampioni. La linea rossa rappresenta la media finale raggiunta dopo tutto il processo e quindi il risultato finale. Con i dati di questo studio elaborati con SVM abbiamo quindi acquisito due percentuali attendibili di specificità e sensibilità.

Nelle figure 31 e 32 sono mostrati i risultati conseguiti considerando positivi tutti i tipi di adenomi e carcinomi coloretali, e i valori medi ottenuti sono sensibilità 84,1% e specificità 82,4%.

Figura 31. Distribuzioni sensibilità statistica. Il valore medio ottenuto è 84,1%.

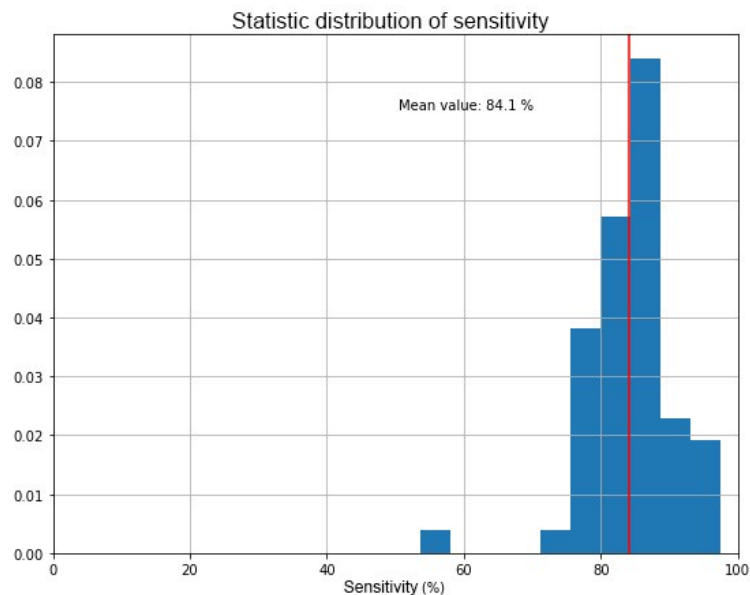
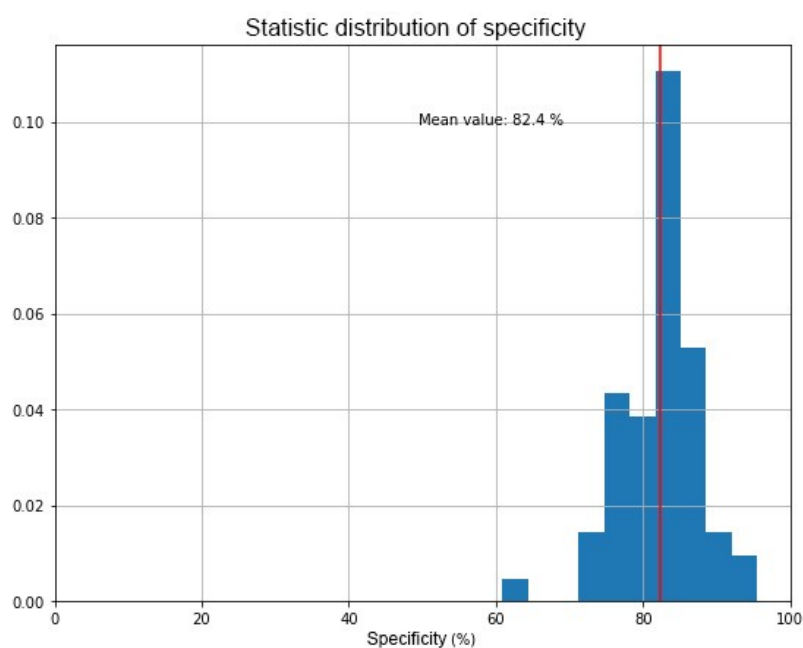
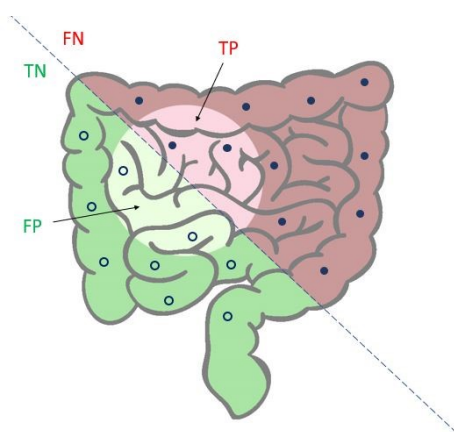


Figura 32. Distribuzione della specificità statistica. Il valore medio ottenuto è 82,4%.



Successivamente, sulla base dei dati ottenuti dallo studio, si è ottenuta una variabile binaria, che ha consentito la costruzione di una Tabella di contingenza, con la quale calcolare i parametri del potere diagnostico di SCENT A1 (accuratezza, potere predittivo positivo, potere predittivo negativo), ottenuti considerando positivi i pazienti con adenomi di basso grado, adenomi di alto grado e carcinomi coloretali. (Tabella 14)

Figura 33. Grafico rappresentante la classificazione totale dei dati: negativi (TN e FP, punti vuoti) e positivi (TP e FN, punti riempiti).



Abbreviazioni: P positivi, N negativi, TP veri positivi, TN veri negativi, FP falsi positivi e FN falsi negativi (Figura 33).

Tabella 14. Definizioni matematiche di sensibilità, specificità, precisione, VPN e accuratezza.

Quantità	Definizione
Precisione (PPV : positive predictive value)	$TP/(TP+FP)$
Negative predictive value (NPV)	$TN/(TN+FN)$
Accuratezza	$TP+TN/(P+N)$

La Tabella di contingenza (Tabella 15) mostra i risultati del dispositivo in conformità con i risultati della colonscopia considerando tra i positivi i pazienti con adenomi a basso grado, adenomi ad alto grado e carcinomi.

Tabella 15. Tabella di contingenza che mostra i risultati del test SCENT A1 rispetto alla colonscopia.

		Malato	Sano	Totali
Metodo da validare (SCENT A1)	Positivo	116	46	162
	Negativo	22	214	236
	Totali	138	260	398

Basandoci sui seguenti calcoli, il potere diagnostico del test SCENT A1 è riassumibile nei seguenti parametri:

$$VPP = \frac{116}{116 + 46} \cdot 100 = 72\%$$

$$VPN = \frac{214}{214 + 22} \cdot 100 = 91\%$$

$$\text{Accuratezza} = \frac{116 + 214}{398} \cdot 100 = 83\%$$

Nelle figure 34 e 35 sono mostrati i risultati ottenuti dopo l'analisi dei campioni con SCENT A 1, considerando positivi tutti gli adenomi avanzati e i carcinomi coloretali, e utilizzando l'algoritmo di analisi basato su SVM.

Anche in questi istogrammi le colonne blu sono i valori ottenuti nelle rotazioni dei sottocampioni e la linea rossa rappresenta la media finale raggiunta dopo tutto il processo e quindi il risultato finale. I valori medi ottenuti sono stati: sensibilità 80,2% e specificità 94,4%.

Figura 34. Distribuzioni sensibilità statistica. Il valore medio ottenuto è 80,2%.

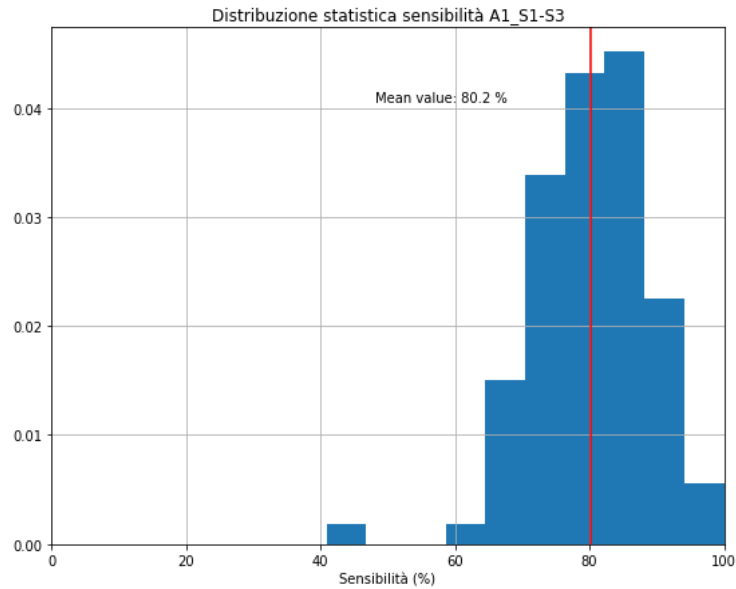
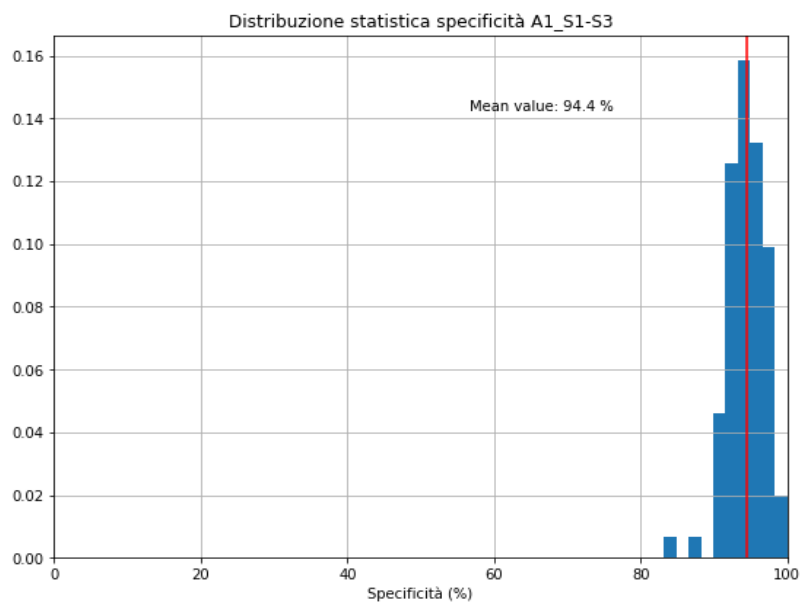


Figura 35. Distribuzione della specificità statistica. Il valore medio ottenuto è 94,4%.



Sulla base dei dati ottenuti, si è ottenuta una variabile binaria, che ha consentito la costruzione di una Tabella di contingenza (Tabella 16), con la quale calcolare i parametri del potere diagnostico (accuratezza, potere predittivo positivo, potere predittivo negativo) di SCENT A1, considerando tra i positivi i pazienti con adenomi a basso grado, adenomi ad alto grado e carcinomi.

La Tabella 16 mostra i risultati del dispositivo in conformità con i risultati della colonscopia che si ottengono considerando tra i positivi i pazienti adenomi ad alto grado e carcinomi.

Tabella 16. Tabella di contingenza che mostra i risultati del test SCENT A1 rispetto alla colonscopia.

		Malato	Sano	Totali
Metodo da validare (SCENT A1)	Positivo	67	19	86
	Negativo	17	295	312
	Totali	84	314	398

Basandoci sui seguenti calcoli, il potere diagnostico del test SCENT A1 è riassumibile nei seguenti parametri:

$$VPP = \frac{67}{67 + 19} \cdot 100 = 78\%$$

$$VPN = \frac{295}{295 + 79} \cdot 100 = 95\%$$

$$\text{Accuratezza} = \frac{67 + 295}{398} \cdot 100 = 91\%$$

5. CAPITOLO 5 - Discussione e conclusioni

L'efficacia dello screening del CCR è determinata dal tasso di partecipazione e dalla resa diagnostica del test FIT. Un aumento dell'adesione allo screening di prevenzione, che oggi si attesta intorno al 50%⁸², sarebbe importante in termini di salute della popolazione perché, come già detto in precedenza, dall'anno di avvio del programma lo screening ha portato ad una riduzione del 30% dell'incidenza e della mortalità per CCR.³⁵

I dati hanno inoltre, dimostrato che, al progredire dei round di screening, aumenta il numero di lesioni diagnosticate ad uno stadio precoce (pT1), rispetto a quelle avanzate, che hanno una maggior probabilità di cura.

L'uso del FIT come test per il primo livello dello screening, anziché l'utilizzo della colonscopia (che rappresenta il gold standard per il CCR), dovrebbe facilitare la partecipazione della popolazione al programma di prevenzione, sia per la semplicità con cui si raccoglie il campione sia perché il FIT è un test non invasivo: per aderire è infatti sufficiente consegnare un solo campione di feci e non vengono imposte restrizioni dietetiche prima del test.

L'inserimento di un check doppio nel protocollo di screening preventivo sarà utile per promuovere una maggiore consapevolezza da parte della popolazione, attualmente riluttante nel prendere parte allo screening, a causa del timore di doversi sottoporre alla colonscopia con la probabilità di non esser affetti da adenomi o carcinomi. Infatti, il VPP del FIT è del 25-35%⁸⁵ perciò molti pazienti positivi al FIT risultano poi negativi alla colonscopia.

La capacità diagnostica del test SCENT A1 è attestata dalla performance in termini di sensibilità, di specificità, di VPP e di VPN.

Il test SCENT A1 è un metodo economico e user-friendly, in quanto si basa su una procedura di raccolta simile al FIT, con la differenza che il campione deve essere conservato in un comune congelatore.

I dati ottenuti nello studio dimostrano la capacità del dispositivo, se utilizzato sui campioni dei pazienti positivi al FIT, di riconoscerne i falsi positivi con una probabilità superiore all'80% e di ridurre notevolmente il numero di colonscopie non operative.

La scelta effettuata nel corso dello studio di raggruppare diversamente, ma sempre in due categorie di risultati, gli esiti dei test (in un gruppo sono raggruppati carcinomi, adenomi ad alto e basso rischio e nell'altro gruppo adenomi ad alto rischio e carcinomi), è stata fatta per testare l'accuratezza del dispositivo mediante un test statistico binario.

Essendo il rischio di degenerazione nel tempo degli adenomi a basso rischio molto basso, e spesso irrilevante, abbiamo preferito testarli includendoli in un'analisi tra i positivi di SCENT A1 e in un'altra tra i negativi.

Con queste 2 azioni di raggruppamento abbiamo verificato che, essendo spesso gli adenomi a basso rischio molto simili ai tessuti sani in termini di emissioni di gas cellulari⁷⁹, includerli tra i positivi porta ad una riduzione della specificità di SCENT A1 rispetto ad includerli tra i negativi. In Italia e in molti altri paesi, il FIT è utilizzato programma di screening organizzato come test di primo livello, poiché ha una sensibilità molto buona per il CCR, anche se rileva un numero elevato di falsi positivi.

Il dispositivo SCENT A1 è progettato per eseguire un'analisi non invasiva (in vitro) della composizione chimica delle esalazioni dei campioni fecali, fornendo una panoramica dello stato di salute del paziente.

La validazione clinica di questo dispositivo, eseguita a Ferrara, ha dimostrato che SCENT A1 è in grado di distinguere correttamente tra soggetti sani e soggetti affetti da tumore o adenoma, grazie ad un array di sensori di gas nanostrutturati calibrato per tale scopo. La popolazione è stata divisa in due gruppi, uno dei partecipanti e uno dei non partecipanti al protocollo che si sono rivelate sovrapponibili in base all'età e allo stato di salute. Ciò garantisce la potenziale universalità del test SCENT A1.

La sensibilità e la specificità alla colonscopia ottenute con questa metodologia sono risultate rispettivamente del 72 % e dell'82,4% considerando positivi i carcinomi e gli adenomi ad alto e basso rischio.

La sensibilità e la specificità alla colonscopia ottenute con questa metodologia sono risultate rispettivamente del 80,2% e dell'94,4% considerando positivi i carcinomi e gli adenomi ad alto rischio.

Il VPP di SCENT A 1 sui pazienti positivi al FIT calcolato rispetto al gold standard è risultato del 72%, e il VPN del 91% considerando positivi carcinomi e adenomi ad alto e basso rischio, e del 78% e VPN del 95% considerando positivi carcinomi e adenomi ad alto rischio.

Il VPP indica la capacità del test di identificare correttamente le persone a rischio per la patologia in esame e costituisce quindi un indicatore importante di performance del programma di screening.

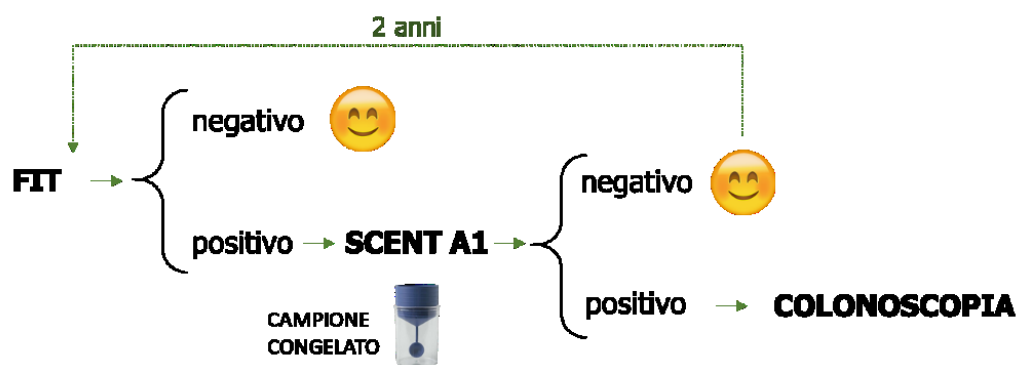
È proprio questo il risultato che mostra le potenzialità dell'analisi di SCENT A1, se eseguita su tutti i positivi al FIT, ovvero la capacità di eliminare quasi i due terzi delle colonscopie che verrebbero effettuate sui pazienti di screening, in quanto colonscopie non operative.

Poiché il VVP alla colonscopia per adenoma avanzato e CCR del FIT è del 20-35%⁸⁵, l'alta predittività di SCENT A1 consentirebbe di rafforzare di circa 4 volte la capacità del FIT di identificare correttamente le persone da inviare alla colonscopia, riducendo così potenzialmente il numero di colonscopie di 2/3.

Questo porterebbe a numerosi vantaggi:

- 1 - una significativa diminuzione dei rischi per i pazienti;
- 2 - una riduzione dei costi del programma di screening per il SSN e SSR;
- 3 - un aumento della capacità attrattiva dello screening sulla popolazione ad oggi restia ad aderire al programma.

In definitiva, sulla base di questi risultati, si propone di inserire SCENT A1 come test di triage al FIT nello screening del colon-retto, secondo il seguente algoritmo:



Il VVP e il VVN di SCENT A1 attestano la sua potenziale capacità di eliminare quasi i due terzi delle colonscopie non operative, che verrebbero effettuate sui pazienti di screening in seguito all'utilizzo del solo FIT come test di primo livello.

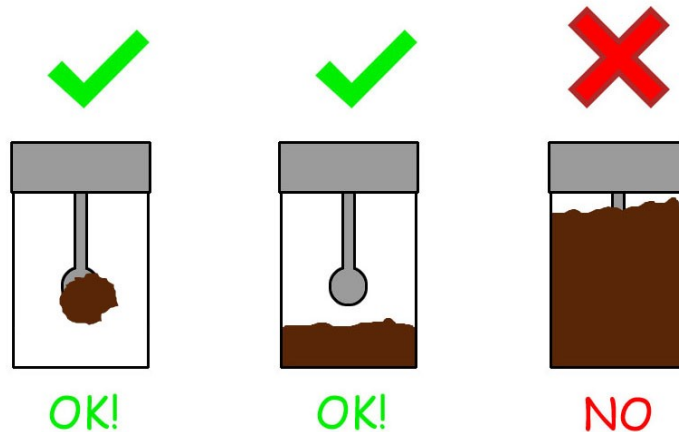
Questo risultato è particolarmente rilevante perché attesta come l'utilizzo di SCENT A1, come test di triage al FIT nello screening del CCR, sia auspicabile per la salute dei pazienti, poiché porterebbe ad un aumento dell'adesione al programma di prevenzione (quindi ad un calo dell'incidenza e della mortalità) ed eviterebbe che coloro che non hanno necessità di effettuare la colonscopia, in quanto falsi positivi del FIT, vengano esposti alle possibili complicanze dell'esame stesso. L'utilizzo di SCENT A1 nel programma di screening è auspicabile anche in termini di risparmio economico per il SSN e il SSR poiché il test SCENT A1 è economicamente molto più vantaggioso rispetto alla colonscopia.



Allegato 1 PROCEDURA PER LA RACCOLTA CAMPIONI

Il paziente dovrà seguire **ATTENTAMENTE** le istruzioni indicate per la raccolta e conservazione del campione di feci, al fine di non invalidare l'esito del test:

- 1) Per la raccolta del campione si consiglia di coprire l'interno del water con carta igienica.
- 2) Tramite l'apposito cucchiaino posto sul tappo del contenitore del bocchettino, prelevare un quantitativo di feci pari a poco più della dimensione del cucchiaino stesso.



- 3) Il bocchettino (avvolto con carta stagnola e posizionato nel sacchettino di plastica) va messo in freezer **IMMEDIATAMENTE**.
- 4) Il bocchettino andrà estratto dal freezer **APPENA** prima di portarlo al centro Screening (non portare campioni più vecchi di tre giorni) in un contenitore che ne impedisca lo scongelamento durante il tragitto (thermos o borsa frigo).
- 5) Giunti al centro Screening occorre depositare il bocchettino nel freezer apposito, che si trova nel laboratorio analisi in fondo al corridoio.

Allegato 2 FOGLIO INFORMATIVO PER IL PAZIENTE

TITOLO DELLO STUDIO:

**Valutazione dell'accuratezza della determinazione di
composti organici volatili quali biomarker di neoplasia colo rettale nelle feci di soggetti FOBT-
positivi sottoposti a colonscopia**

Gentile Signore/a,

in questo ospedale si sta effettuando uno studio per valutare l'efficacia di un nuovo marcatore diagnostico per la prevenzione e la diagnosi precoce di tumore del colon-retto.

Lo scopo di questo foglio informativo è di spiegarle perché vogliamo condurre lo studio, perché riteniamo che lei possa prendervi parte e che cosa dovrà fare se lei accetterà di partecipare. Il medico responsabile dello studio in questo ospedale è a sua disposizione per rispondere a tutte le sue domande e per fornirle spiegazioni su eventuali punti di questo documento che non le fossero chiari. La preghiamo di leggere attentamente questo documento e di prendersi il tempo per decidere, sulla base delle informazioni ricevute ed in assoluta libertà, se partecipare o meno a questo studio.

Qual è lo scopo di questo studio?

Il tumore del colon-retto rappresenta in Italia ed in Emilia Romagna la seconda causa di morte per tumore sia nell'uomo che nella donna. La diagnosi precoce del tumore del colon-retto è un elemento fondamentale nella prognosi della malattia: prima il tumore viene individuato tanto maggiore è la possibilità di cura. Lo sviluppo del tumore del colon-retto è, inoltre, quasi sempre preceduto dalla comparsa di lesioni benigne dell'intestino (polipi), che possono essere individuate e rimosse prima che il tumore cominci a svilupparsi. Il test che viene oggi eseguito nel programma di screening per la prevenzione di tumore del colon-retto è la ricerca del sangue occulto nelle feci: quando questo test risulta positivo viene proposta come indagine di approfondimento la colonscopia, che permette di esplorare il colon, cioè la parte di intestino dove possono crescere i polipi e di rimuoverli se presenti. Tuttavia, tale indagine, piuttosto invasiva, è superflua quando il sanguinamento è dovuto a cause diverse (es. diverticoli, coliti, emorroidi).

Numerosi studi hanno dimostrato che la formazione di un tumore è accompagnata da un'alterazione della membrana delle cellule del colon, dalla modificazione delle proteine della cellula con conseguente emissione di componenti volatili (VOCs = *sostanze gassose alterate dalla presenza di*

cellule tumorali). Queste, quindi, potrebbero rappresentare utili marcatori per la diagnosi di polipi adenomatosi (*tumori benigni presente sulli mucosa del colon*) o cancro del colon-retto.

I ricercatori del Dipartimento di Fisica e Scienze della terra dell'Università di Ferrara hanno messo a punto un sistema di analisi dei VOCs di origine fecale che ha dimostrato di essere in grado di discriminare tra pazienti portatori di polipi adenomatosi o cancro del colon-retto e soggetti sani.

Questo studio si propone di verificare se il test di studio delle sostanze volatili abbia una specificità maggiore rispetto al classico test della ricerca del sangue occulto nelle feci, se cioè sia in grado di individuare i pazienti dove il tumore o la lesione benigna siano effettivamente presenti, permettendo di consigliare la colonscopia solo a coloro che ne possano trarre un vero beneficio.

Perché le viene chiesto di partecipare a questo studio?

Le è stato chiesto di partecipare a questo studio perché lei sta effettuando esami diagnostici nell'ambito della campagna di screening per la prevenzione di tumore del colon-retto e perché il suo test di ricerca del sangue occulto nelle feci è risultato positivo.

Se lei accettasse di sottoporsi al test da noi proposto sulla ricerca delle sostanze volatili, questo errà effettuato su un secondo campione di feci che lei preleverà a domicilio come già fatto per quello per la ricerca del sangue occulto.

Lei è obbligato a partecipare allo studio?

No, la partecipazione a questo studio è completamente volontaria. Se lei deciderà di parteciparvi le verrà consegnato dal collega questo foglio informativo da leggere e conservare e le verrà chiesto di firmare e datare il modulo di consenso e quello della riservatezza dei dati personali (privacy).

Cosa dovrà fare se decidesse di partecipare allo studio?

Se lei deciderà di partecipare allo studio, le verrà chiesto di prelevare un campione di feci al suo domicilio (così come quello per eseguire il test della ricerca di sangue occulto) non più di tre giorni prima della consegna. Le verrà dato un contenitore per conservare il campione in freezer fino a quando si recherà nell'ambulatorio per consegnare il campione di feci. Si recherà al Centro Screening per consegnare il campione feci.

Quali sono i possibili rischi legati allo studio?

Non esistono rischi legati allo studio.

Quali sono i possibili benefici legati allo studio?

Partecipando a questo studio contribuirà ad individuare il test più efficace per la selezione dei soggetti che devono sottoporsi a colonscopia nelle campagne di prevenzione del tumore al colon-retto. In questo modo si limiterà l'esame endoscopico a coloro che effettivamente sono affetti da

lesioni benigne o tumorali, risparmiandolo ai soggetti sani.

Inoltre, il test migliorerà la capacità di diagnosticare precocemente questo tipo di tumore, contribuendo ad una diminuzione dei casi e della mortalità.

RISERVATEZZA

Ai sensi della legge sulla tutela dei dati personali (Decreto Legislativo n. 196/2003 (“Codice in materia di protezione dei dati personali”), titolare del trattamento dei suoi dati personali è l’Ente Ospedaliero presso i quali lo studio si svolge ed i responsabili sono quelli nominati dal medesimo ente. Al risultato dell’analisi svolta sul campione di feci, di cui lei non potrà conoscere l’esito, potrà accedere solo il medico responsabile, che non potrà divulgarne il contenuto se non mediante codice numerici anonimi.

Il medico della ricerca le consegnerà una lettera rivolta al suo medico di base, per informarlo della sua partecipazione allo studio, per la migliore conduzione clinica dello stesso.

La ringraziamo per la collaborazione

Nome in stampatello del soggetto _____

Firma del soggetto _____

Data _____

Nome in stampatello del medico sperimentatore Aldo De Togni Responsabile Centro Screening Oncologici AUSL Ferrara

Firma per il medico sperimentatore _____

Data _____

Nome in stampatello del rappresentante legale* _____

Firma del rappresentante legale _____

Data _____

*In caso sia designato quale rappresentante legale un amministratore di sostegno, il medico sperimentatore avrà cura di verificare che l’ordinanza di affidamento da parte del giudice tutelare comprenda anche la tutela della salute dell’amministrato.

Allegato 3 CONSENSO INFORMATO

MODULO DI CONSENSO SCRITTO

TITOLO DELLO STUDIO: **Valutazione dell'accuratezza della determinazione di composti organici volatili quali biomarker di neoplasia colo rettale nelle feci di soggetti FOBT-positivi sottoposti a colonscopia**

Io sottoscritto (nome e cognome)

Età _____ sesso M F data di nascita ___/___/____.

Indirizzo: Via/Piazza _____ n. _____

CAP _____ Città _____ tel. _____

Dichiaro di:

- partecipare volontariamente allo studio “**valutazione dell'accuratezza della determinazione di composti organici volatili quali biomarker di neoplasia colo rettale nelle feci di soggetti FOBT-positivi sottoposti a colonscopia**” avente lo scopo di valutare la specificità dell'analisi dei VOCs nell'identificare lesioni tumorali coliche rispetto alla colonscopia (considerata “gold standard”) in pazienti positivi al FOBT
- aver ricevuto dal Medico su menzionato tutte le informazioni chiare ed esaurienti sulle finalità e le procedure dello studio clinico a cui mi è stato chiesto di prendere parte;
- aver letto e compreso il foglio di informazioni che mi è stato consegnato con sufficiente anticipo e che conferma quanto mi è stato verbalmente detto;
- aver avuto l'opportunità di porre domande chiarificatrici e di aver avuto risposte soddisfacenti;
- essere stato/a informato/a sui possibili benefici che potrei trarre
- **acconsentire / NON acconsentire** (cancellare l'opzione che NON interessa) che lo sperimentatore o il Medico sopra menzionato informi il mio Medico curante (del mio tutelato) nella persona di _____ circa la partecipazione a questo studio clinico;
- essere consapevole:
 - che la partecipazione allo studio è volontaria;

- che i miei dati clinici potranno essere esaminati o utilizzati per pubblicazioni scientifiche ma resteranno strettamente riservati nel rispetto della normativa vigente e successive modifiche e integrazioni;
- che il mio dossier clinico potrà essere esaminato, ma resterà strettamente riservato e che i dati saranno utilizzati nell’insieme dello studio per la redazione di un rapporto finale destinati alle Autorità Sanitarie o ad una pubblicazione, qualunque sia l’esito dello studio, sempre nel rispetto della confidenzialità della mia identità;
- che il Comitato Etico di questa Azienda ha approvato il protocollo sperimentale di ricerca;
- di dover firmare due moduli identici del presente consenso: un originale verrà trattenuto dal medico (e conservato per almeno 15 anni) e il secondo mi verrà consegnato;
- prendo atto che ricevo una copia firmata del presente Modulo di Consenso, unitamente al Foglio Informativo;
- che per ogni problema o per eventuali ulteriori informazioni potrò rivolgermi a:

Dr. Alessandro Pezzoli

Indirizzo: Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Cona (Fe)

Telefono: 0532236886

Pertanto, acconsento liberamente alla partecipazione allo studio clinico.

Nome in stampatello del soggetto _____

Firma del soggetto _____

Data _____

Nome in stampatello del medico sperimentatore Aldo De Togni

Firma per il medico sperimentatore _____

Data _____

Nome in stampatello del rappresentante legale* _____

Firma del rappresentante legale _____

Data _____

**In caso sia designato quale rappresentante legale un amministratore di sostegno, il medico sperimentatore avrà cura di verificare che l’ordinanza di affidamento da parte del giudice tutelare comprenda anche la tutela della salute dell’amministrato*

Allegato 4 QUESTIONARIO INFORMATIVO

Gent.ma Sig.ra/Sig.....

ai fini dello studio a cui Le è stato chiesto di partecipare abbiamo bisogno di alcune semplici informazioni che rimarranno assolutamente riservate e che serviranno a rendere ancora più proficui i risultati del campione in esame. È sufficiente barrare la risposta che considera esatta segnalando le eventuali annotazioni.

La ringraziamo per la collaborazione.

1) ha utilizzato nell'ultimo mese antibiotici?

no

si: come si chiama l'antibiotico?

2) ha utilizzato nell'ultimo mese "fermenti lattici"?

no

si: come si chiama il "fermento lattico" utilizzato?

3) ha utilizzato nell'ultimo mese prodotti per la stitichezza?

no

si: come si chiama il prodotto?

4) soffre di emorroidi o ragadi o Morbo di Crohm?

no:

si:

Allegato 5 LETTERA INFORMATIVA PER IL MEDICO CURANTE

Gentile Collega,

con la presente vorremmo informarla che il/la, Sign/Sig.ra _____ suo/a paziente è stato invitato a partecipare, ed ha liberamente e consapevolmente accettato di farlo, ad una sperimentazione in corso presso la nostra struttura. Il paziente è in possesso di copia della Nota Informativa e del Consenso Informato dal quale potrà evincere ulteriori informazioni sullo studio.

Di seguito alcune informazioni circa la sperimentazione e le sue finalità che potrebbero esserle utili per l'assistenza al suo paziente.

TITOLO: Valutazione dell'accuratezza della determinazione di composti organici volatili quali biomarker di neoplasia colo-rettale nelle feci di soggetti FOBT-positivi sottoposti a colonscopia RAZIONALE DELLA SPERIMENTAZIONE

Il cancro del colon-retto (CRC) rappresenta una delle neoplasie più frequentemente diagnosticate in endoscopia digestiva ed è la terza causa di morte per tumori nei paesi occidentali. La ricerca del sangue occulto fecale (FOBT) si è dimostrato un metodo efficace e fattibile di screening (4-6) e da 10 anni in Italia è attiva una campagna di screening del CRC basata sull'esecuzione del FOBT nei soggetti di età superiore ai 50 anni. Numerosi studi hanno dimostrato che la crescita tumorale è accompagnata da perossidazione della membrana cellulare, che può portare alla modificazione delle proteine cellulari, con conseguente emissione di VOCs che possono quindi rappresentare utili biomarkers per il CRC. I ricercatori del Dipartimento di Fisica e Scienze della terra dell'Università di Ferrara hanno messo a punto un sistema di analisi dei VOCs fecali che ha dimostrato di essere in grado di discriminare tra pazienti affetti da tumore colico e soggetti sani. Tale sistema si basa sull'analisi di un panel di VOCs che sembra essere in grado di identificare le alterazioni neoplastiche coliche.

OBIETTIVI DELLA SPERIMENTAZIONE

Valutare la specificità dell'analisi dei VOCs nell'identificare lesioni tumorali coliche rispetto alla colonscopia (considerata "gold standard") in pazienti positivi al FOBT. Ai soggetti che accetteranno di eseguire la colonscopia verrà chiesto di fornire un ulteriore piccolo campione di feci. Le feci dovranno essere raccolte massimo tre giorni prima della consegna e conservate in freezer. Tali campioni verranno poi analizzati dai ricercatori del Dipartimento di Fisica e Scienze della Terra senza essere a conoscenza del risultato della colonscopia.

RECAPITO DEL REFERENTE DELLA SPERIMENTAZIONE

Dr. Aldo De Togni

DIP. Sanità Pubblica, Resp. MOD Screening Oncologici, Epidemiologia e Programmi Promozione della Salute

Tel: 0532235503

In Fede,

Il medico responsabile della sperimentazione

Allegato 6 ULTIMA VERSIONE DEL PROGETTO APPROVATO DAL COMITATO ETICO DELLA PROVINCIA DI FERRARA

Emendamento sostanziale: richiesta di proroga e aggiornamento del progetto

“Valutazione dell’accuratezza della determinazione di composti organici volatili quali biomarker di neoplasia colo rettale nelle feci di soggetti FOBT-positivi sottoposti a colonscopia”

approvato dal Comitato Etico Unico della Provincia di Ferrara in data 21/01/2016 e iniziato il 01/05/2016

Background

Il cancro del colon-retto (CRC) rappresenta una delle neoplasie più frequentemente diagnosticate in endoscopia digestiva ed è la terza causa di morte per tumori nei paesi occidentali. Nel 2012 sono stati identificati 1,361,000 nuovi casi di cancro del colon-retto che hanno determinato più di 694,000 morti (1). Si stima che nel 2013 in Italia ci siano state 55.000 diagnosi di CRC e 22.000 decessi ad esso correlati (2). Il CRC nella grande maggioranza dei casi ha origine da lesioni preneoplastiche (polipi adenomatosi) che possono essere identificate e rimosse. Per questo motivo sono state proposte numerose metodiche di screening del CRC per l’identificazione precoce delle lesioni preneoplastiche e attualmente lo screening è fortemente raccomandato da molte organizzazioni sanitarie (3). La ricerca del sangue occulto fecale (FOBT) si è dimostrato un metodo efficace e fattibile di screening (4-6) e da 10 anni in Italia è attiva una campagna di screening del CRC basata sull’esecuzione del FOBT nei soggetti di età superiore ai 50 anni.

Nonostante i numerosi vantaggi posseduti dal FOBT (facilità di esecuzione, assenza di invasività e costi contenuti) la sua sensibilità e specificità per le neoplasie coliche risulta piuttosto bassa; anche utilizzando il metodo immunochimico la sensibilità del FOBT si aggira attorno al 79% per il CRC e al 38% per gli adenomi avanzati, con una specificità del 94 e 93%, rispettivamente (7-8). Per migliorare la selezione dei pazienti da sottoporre a colonscopia sono stati studiati altri marcatori precoci di neoplasia nelle feci, tra i quali le alterazioni del DNA fecale (9-10). Tali metodi, sebbene promettenti, non hanno avuto larga diffusione e sono peraltro gravati da costi elevati.

Una strada alternativa potrebbe essere rappresentata dall’analisi dei metabolomi ovvero delle micromolecole che esprimono lo status del metabolismo cellulare; è stato ipotizzato che differenti patologie siano associate a profili di metabolomi specifici (11). I metabolomi possono essere identificati in numerosi campioni biologici tra i quali feci, urine, saliva e respiro. L’identificazione delle alterazioni metabolomiche può essere eseguita anche analizzando i componenti organici volatili (VOC) che sono rappresentati da elementi chimici gassosi che vengono rilasciati durante i processi metabolici

dell'organismo e dal microbiota intestinale (12-13). Numerosi studi hanno dimostrato che la crescita tumorale è accompagnata da perossidazione della membrana cellulare, che può portare alla modificazione delle proteine cellulari, con conseguente emissione di VOCs che possono quindi rappresentare utili biomarkers per il CRC. I ricercatori del Dipartimento di Fisica e Scienze della terra dell'Università di Ferrara hanno messo a punto un sistema di analisi dei VOCs fecali che ha dimostrato di essere in grado di discriminare tra pazienti affetti da tumore colico e soggetti sani. Tale sistema si basa sull'analisi di un panel di VOCs che sembra essere in grado di identificare le alterazioni neoplastiche coliche (14).

Scopo del presente studio è valutare l'accuratezza dell'analisi dei VOC fecali nell'identificare lesioni preneoplastiche e neoplastiche nei pazienti che partecipano allo screening regionale per la prevenzione del cancro del colon.

Aim

Valutare la specificità dell'analisi dei VOCs nell'identificare lesioni tumorali coliche rispetto alla colonscopia (considerata "gold standard") in pazienti positivi al FOBT

Materials and methods

Lo studio è uno studio monocentrico, prospettico in cui verranno arruolati pazienti con FOBT positivo che aderiscono alla campagna di Screening regionale per la prevenzione del cancro del colon. Il percorso della campagna di screening prevede che questi pazienti, dopo aver eseguito il FOBT (che abbia dato esito positivo) eseguono normalmente un colloquio preliminare con un operatore sanitario, in cui gli viene spiegato l'utilità di sottoporsi alla colonscopia.

Ai soggetti che accetteranno di eseguire la colonscopia verrà chiesto di fornire un ulteriore piccolo campione di feci. Per tale motivo verrà consegnato un apposito contenitore fornito dall'istituto di fisica dell'UNIFE. Durante il colloquio preliminare effettuato presso il Centro Screening dell'AUSL verrà fatto firmare l'apposito modulo di consenso informato per l'adesione allo studio ed un modulo informativo per il Medico Curante. Verrà Inoltre, somministrato un breve questionario teso ad escludere l'utilizzo di farmaci o altre condizioni che possano influenzare l'analisi dei VOCs.

Il paziente che accetta di partecipare allo studio tornerà al Centro Screening per consegnare il campione di feci che verrà conservato in un congelatore apposito. Le feci dovranno essere raccolte in un giorno antecedente a quello in cui viene eseguita la preparazione intestinale e conservate in freezer. Tali campioni verranno poi analizzati dai ricercatori dell'Istituto di Fisica senza essere a conoscenza del risultato della colonscopia.

L'end-point primario è rappresentato dal confronto dell'analisi dei VOC rispetto al risultato della colonscopia (presenza/assenza di lesioni neoplastiche/preneoplastiche).

Si valuterà Inoltre, come end-point secondario, un'analisi sulla specificità dei VOC rispetto al FOBT nell'identificare adenomi e cancri del colon.

Per poter ampliare il numero delle analisi sugli adenomi con displasia di alto grado e sugli adenocarcinomi, verrà coinvolta anche la Chirurgia dell'Ospedale del Delta.

Verranno infine calcolati i costi sostenuti per eseguire l'analisi dei VOC e paragonati con quelli del FOBT.

Lo studio verrà condotto congiuntamente dall'U.O. di Gastroenterologia, dal Modulo Dipartimentale di Endoscopia Digestiva, dal Dipartimento di Fisica e Scienze della Terra dell'Università di Ferrara, dal Centro Screening del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'AUSL di Ferrara e dal Dipartimento di Chirurgia Generale dell'Ospedale del Delta.

Il protocollo verrà sottoposto alla valutazione del Comitato Etico e verrà registrato sul sito clinicaltrials.gov.

Criteri di inclusione/esclusione

Verranno inclusi nello studio tutti i pazienti di ambo i sessi della fascia di età 50-69 anni che aderiscono allo screening regionale per la prevenzione del CCR che abbiano eseguito un FOBT con esito positivo e che accettino di eseguire l'indagine di approfondimento di secondo livello (colonscopia).

Non verranno inclusi nello studio pazienti con diagnosi nota di malattia infiammatoria cronica intestinale, che abbiano eseguito terapie antibiotiche nel mese precedente, che abbiano assunto recentemente probiotici o lassativi.

Numerosità del campione

Verranno inclusi circa 400 soggetti arruolati durante i colloqui di screening. Il tempo previsto per l'arruolamento del campione è di circa 24 mesi.

Analisi statistica

L'analisi statistica sarà di tipo descrittivo riguardo alle caratteristiche del campione osservato: per le variabili di tipo quantitativo verranno riportate media, deviazione standard, valore massimo e minimo; per variabili di tipo qualitativo frequenza assoluta e frequenza relativa percentuale.

I risultati osservati relativamente al numero di casi concordanti e discordanti tra i due test (FOBT e VOCs) rispetto al Gold Standard (colonscopia) saranno riportati mediante frequenze relative percentuali e relativi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%).

Modifiche apportate al progetto:

- 1) La sede in cui ai pazienti verrà illustrato il progetto di ricerca, dove verrà fatto firmare l'apposito modulo di consenso informato per l'adesione allo studio ed il modulo informativo per il Medico Curante, non sarà più l'endoscopia digestiva dell'Azienda Ospedaliera S. Anna, ma il Centro Screening dell'AUSL di cui il Responsabile è il dott. Aldo De Togni.

- 2) La sede in cui i pazienti dovranno consegnare i campioni non sarà più l'endoscopia digestiva dell'Azienda Ospedaliera S. Anna, ma il Centro Screening dell'AUSL
- 3) Per poter ampliare il numero delle analisi sugli adenomi con displasia di alto grado e sugli adenocarcinomi, verrà coinvolta anche la Chirurgia dell'Ospedale del Delta con la collaborazione del Prof. Carlo Feo
- 4) Sarà necessario continuare lo studio per altri 2 anni, Il tempo previsto per l'arruolamento del campione è di circa 24 mesi.

Responsabili del progetto

Dir. Aldo De Togni

Prof. Cesare Malagù

Dir. Paolo Pazzi

Dir. Carlo Feo

Referenti del progetto

Dott.ssa Caterina Palmonari

Dott.ssa Giulia Zonta

Dott. Alessandro Pezzoli

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014;136(5):E359–86.
2. In "I numeri del cancro in Italia 2013". Editors: Associazione italiana di oncologia medica
3. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*. 2008;134:1570–1595.
4. Mandel JS, Bond JH, Church TR et al Reducing mortality from colorectal cancer by screening for faecal occult blood. *N Engl J Med* 1993;328:1365-71.
5. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MHE et al Randomized controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-7.
6. Kromborg O, Fenger C, Olsen J et al. Randomized study of screening for colorectal cancer with faecal-occult blood test. *Lancet* 1996;348:1467-71.
7. [de Wijkerslooth TR](#) et al. Immunochemical fecal occult blood testing is equally sensitive for proximal and distal advanced neoplasia. [Am J Gastroenterol](#). 2012;107:1570-8.

8. [Lee JK](#), et al Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. [Ann Intern Med](#). 2014;160: 2-35
9. Tagore KS, Lawson MJ, Ycaitis JA, Gage R, Orr T et al. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 2003;3:47-53.
10. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:858-65.
11. Davis V, Bathe O, Schiller D, Slupsky CM, Sawyer MB. Metabolomics and surgical oncology: potential role for small molecule biomarkers. *J Surg Oncol* 2011;103: 451 – 459
12. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:868–75. doi:pii:S1542–3565(13)00272-3
13. Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB J* 2007;21:1675–88
14. Malagù C, Fabbri B, Gherardi S, et al. Chemoresistive Gas Sensor for the detection of colorectal cancer biomarker. *Sensors* 2014, *14*, 18982-18992; doi:10.3390/s141018982

BIBLIOGRAFIA

1. «I programmi di screening oncologici della Regione Emilia-Romagna- I dati dei seminari regionali 2018» Servizio Sanitario Regionale Emilia Romagna, Bologna, 2019.
2. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin.* 1999;49(2):1,33-64. doi:10.3322/caac.20107.Available
3. Global Cancer Observatory, «GCO- Cancer Today,» 2018. [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/home>
4. Available: www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-colon-retto. [Consultato il giorno maggio 2019].
5. Warthin AS. Heredity With Reference To Carcinoma: As Shown By the Study of the Cases Examined in the Pathological Laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med.* 1913;12(5):546-555. doi:10.1001/archinte.1913.00070050063006.
6. Capelle LG, Van Grieken NCT, Lingsma HF, et al. Risk and Epidemiological Time Trends of Gastric Cancer in Lynch Syndrome Carriers in The Netherlands. *Gastroenterology.* 2010;138(2):487-492. doi:10.1053/j.gastro.2009.10.051.
7. Vasen HFA, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(2):88-97. doi:10.1038/nrgastro.2014.229.
8. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2010;53(7):1099. doi:10.1007/DCR.0b013e3181d60a51.
9. <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-key-statistics>
10. AIRC, «Il tumore del colon-retto,» 16 Novembre 2017. [Online]. Available: <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-colon-retto>.
11. De Jonge V, Sint Nicolaas J, Cahen DL, et al. Quality evaluation of colonoscopy reporting and colonoscopy performance in daily clinical practice. *Gastrointest Endosc.* 2012;75(1):98-106. doi:10.1016/j.gie.2011.06.032.

12. Valori R, Rey J-F, Atkin W, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition – Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis. *Endoscopy*. 2012;44(S 03):SE88-SE105. doi:10.1055/s-0032-1309795.
13. *Global Epidemiology of Cancer*, Jones & Bartlett publishers, 2015.
14. S. D. P. G. T. A.R. Bianco, *Core Curriculum, Oncologia Clinica*, Mc Graw Hill, 2011.
15. *Global Epidemiology of Cancer*, Jones & Bartlett publishers, 2015.
16. S. J. Duthie, Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability, *Br. Med. Bull*, 1999.
17. *Global Epidemiology of Cancer*, Jones & Bartlett publishers, 2015.
18. M. R. B. N. H. & L. Lipkin, «S.A. Dietary factors in human colorectal cancer,» *Ann. Rev. Nur.*, vol. 19, pp. 545-589, 1999.
19. E. D. e. a. Gorham, « vitamin D and prevention of colorectal cancer,» *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, pp. 179-194, 2005.
20. A. T. O. S. & F. Chan, in *Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of Cox-2*, *N. Engl. J. Med.*, 2007, pp. 356, 2131-2141.
21. H. De vita, *Principles & Practice of Oncology*, Lippincott Williams and Wilkins, 2015.
22. M. Sorich, «Exttended Rasmutations and anti- Egfr monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer,» *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, n. 26, pp. 13-21, 2015
23. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058 (2010)
24. Butterworth, A. S., Higgins, J. P. T. & Pharoah, P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 42, 216–227 (2006).
25. Rugarli, C. *Medicina interna sistematica*. Sesta edizione. Elvisier srl (2010).

26. C. E. e. a. Desch, «Raccomandato colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology,» *J. Clin. Oncol. Off. J. Ann. Soc. Clin. Oncol.*, 1999, pp. 17, 1312
27. Fearon EF, Vogelstein B. for Colorectal Tumorigenesis. 1990;61: 759-767.
28. Luo Y, Wong CJ, Kaz AM, et al. Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2014;147(2):418-429.e8. doi:10.1053/j.gastro.2014.04.039
29. Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(2):90-100. doi:gastro.2010.211 [pii]r10.1038/nrgastro.2010.211.
30. Jones S, Chen W -d., Parmigiani G, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(11):4283-4288. doi:10.1073/pnas.0712345105.
31. A.I.O.M., «Linee guida Tumori del Colon-retto,» 2018.
32. Aiom. linee guida aiom colon. (2018). Available at: https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/11/2018_LG_AIOM_Colon.pdf.
33. Rugarli, C. *Medicina interna sistematica*. Sesta edizione. Elsevier srl (2010)
34. Communities, C. of the E. Report from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social committee and the Committee of the Regions- Implementation of the Council Recommendation of 2 December 2003 on cancer screening (2003/878/EC) Brussels, COM. (2008).
35. Pawa, N., Arulampalam, T. & Norton, J. D. Screening for colorectal cancer: Established and emerging modalities. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (2011).
36. ONS. Lo screening coloretale. (2018). Available at: <https://www.osservatorionazionale screening.it/content/lo-screening-coloretale>. (Accessed: 22nd August 2019)
37. Orietta Giuliani, Flavia Baldacchini, Silvia Mancini, Alessandra Ravaioli, Rosa Vattiato, Lauro Bucchi, F. F. Survey al 31-12-2017 del programma di screening dei tumori del colon-retto in Emilia-Romagna.

38. G. d. lavoro, Il protocollo diagnostico-terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore del colon-retto, Servizio sanitario regionale Emilia-Romagna, 2012.
39. Reumkens, A. et al. Post-colonoscopy complications: A systematic review, time trends, and meta-analysis of population-based studies. *American Journal of Gastroenterology* (2016). doi:10.1038/ajg.2016.234
40. Madhoun, M. F. et al. Efficacy and tolerability of various bowel preparations in diabetic patients: a randomized controlled trial. *Endosc. Int. open* 6, E1157–E1163 (2018).
41. Atkin, W. et al. Computed tomographic colonography versus colonoscopy for investigation of patients with symptoms suggestive of colorectal cancer (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)* 381, 1194–1202 (2013).
42. Plumb, A. A., Halligan, S., Pendse, D. A., Taylor, S. A. & Mallett, S. Sensitivity and specificity of CT colonography for the detection of colonic neoplasia after positive faecal occult blood testing: systematic review and meta-analysis. *Eur. Radiol.* 24, 1049–1058 (2014).
43. O. informativo, Consenso informato per la colon-TC, Azienda ospedaliero-universitaria di Ferrara
44. R. Mignani, C. Naldoni, A. Finarelli e P. Landi, «Il protocollo diagnostico-terapeutico per la diagnosi precoce del tumore del colon-retto» Centro Stampa Giunta - Regione Emilia-Romagna, Bologna, 2012.
45. S. Pita-Ferández, M. Alhayek-Aí, C. González-Martín e al., «Intensive follow-up strategies improve outcomes in nonmetastatic colorectal cancer patients after curative surgery: a systematic review and meta-analysis.» *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, pp. 644-656, 2015.
46. M. Rosen, L. Chan, R. Beart e al., «Follow-up of colorectal cancer: a meta-analysis.» *Diseases of the colon and rectum*, pp. 1116-1126, 1998.
47. SALUTE-R. Il protocollo diagnostico-terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore del colon-retto 71. (2012)

48. Ban E, Park SH, Kang MJ, Lee HJ, Song EJ, Yoo YS. Growing trend of CE at the omics level: The frontier of systems biology - An update. *Electrophoresis*. 2012;33(1):2-13. doi:10.1002/elps.201100344.
49. *Gastroenterology* da D.K. Rex e coll. May 2015 Volume 148, Issue 5, Pages 948–957
50. [Accuracy of Capsule Colonoscopy in Detecting Colorectal Polyps in a Screening Population. Douglas K. Rex e coll., *Gastroenterology* 2015; 148:948-957]
51. Davis VW, Bathe OF, Schiller DE, Slupsky CM, Sawyer MB. Metabolomics and surgical oncology: Potential role for small molecule biomarkers. *J Surg Oncol*. 2011;103(5):451-459. doi:10.1002/jso.21831.
52. Toyokuni S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: From epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life*. 2008;60(7):441-447. doi:10.1002/iub.61.
53. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R CP. Quantitative analysis of urine vapour and breath by gas–liquid partition chromatography. October. 1971:1008.
54. Boguslaw Buszewski, Martyna Keszy TL and AA. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr*. 2007;1(2):108-118. doi:10.1002/bmc.
55. Garner CE, Smith S, Costello L, et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. doi:10.1096/fj.06-6927com.
56. Garner ACE, Ewer AK, Elasoquad K, et al. Analysis of Faecal Volatile Organic Compounds in Preterm Infants Who Develop Necrotising Enterocolitis : A Pilot Study. 2009:559-565.
57. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, et al. Fecal Microbiome and Volatile Organic Compound Metabolome in Obese Humans With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *YJCGH*. 2013;11(7):868-875.e3. doi:10.1016/j.cgh.2013.02.015.
58. Fuchs P, Loeseken C, Schubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(11):2663-2670. doi:10.1002/ijc.24970.
59. Phillips M, Cataneo RN, Saunders C, Hope P, Schmitt P, Wai J. Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. *J Breath Res*. 2010;4(2):26003. doi:10.1088/1752-7155/4/2/026003.

60. Abaffy T, Duncan R, Riemen D, Tietje O, Elgart G MC et al . Differential volatile signatures from skin, nevi and melanoma: a novel approach to detect a pathological process. *PLoS One* 2010. 2010;5:13813.
61. De Gennaro G, Dragonieri S, Longobardi F, et al. Chemical characterization of exhaled breath to differentiate between patients with malignant plueral mesothelioma from subjects with similar professional asbestos exposure. *Anal Bioanal Chem.* 2010;398(7-8):3043-3050. doi:10.1007/s00216-010-4238-y.
62. Qin T, Liu H, Song Q, et al. The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(9):2247-2253. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0302.
63. G. Zonta et al./ *Sensors and Actuators B* 262 (2018) 884-891
64. Brooks SW, Moore DR, Marzouk EB, Glenn FR, Hallock RM. Canine Olfaction and Electronic Nose Detection of Volatile Organic Compounds in the Detection of Cancer: A Review. *Cancer Invest.* 2015;33(9):411-419. doi:10.3109/07357907.2015.1047510.
65. Ehmann R, Boedeker E, Friedrich U, et al. Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: Revisiting a puzzling phenomenon. *Eur Respir J.* 2012;39(3):669-676. doi:10.1183/09031936.00051711.
66. Dodd G, Bartlett P GJ. Complex sensor systems: odour detection by the sense of smell and by electronic noses Sensor systems Flavours , perfumes and natural smells Receptor mechanisms in the vertebrate olfactory system. *Dodd. Biosensors.* 1991;19(1):1991
67. SCENT A1, italian patent number: RM20144000595, patent and intellectual property of SCENT S.r.l., European patent number (UK, Germany extension): 3210013
68. Dragonieri S, Schot R, Mertens BJA, et al. Health care education , delivery , and quality An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. :856-862. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.043.
69. Van der Schee, Fens N, Brinkman P, et al. Effect of transportation and storage using sorbent tubes of exhaled breath samples on diagnostic accuracy of electronic nose analysis. :1-19.

70. Peng G, Hakim M, Broza YY, et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *Br J Cancer*. 2010;103(4):542-551. doi:10.1038/sj.bjc.6605810.
71. Altomare DF, Di Lena M, Porcelli F, et al. Exhaled volatile organic compounds identify patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2013;100(1):144-150. doi:10.1002/bjs.8942.7
72. C. Wang, P. Li, A. Lian, B. Sun, X. Wang, L. Guo, C. Chi, S. Liu, W. Zhao, S. Luo, Z. Guo, Y. Zhang, C. Ke, G. Ye, G. Xu, F. Zhang, E Li, Blood volatile compounds as biomarkers for colorectal cancer, *Cancer Biol Ther*. 2014 Feb 1; 15(2): 200–206;
73. I TEST DIAGNOSTICI E L'ANALISI DELLA CURVA ROC Graziella D'Arrigo, Fabio Provenzano, Claudia Torino, Carmine Zoccali, Giovanni Tripepi CNR-IBIM, Unità di Ricerca di Epidemiologia Clinica e Fisiopatologia delle Malattie Renali e dell'Ipertensione Arteriosa, Reggio Calabria
74. Bell System Technical Journal Surface Properties of Germanium. Walter H. Brattain John Bardeen First published: January 1953 <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1953.tb01420.x>
75. Morrison, S.R., *Advan. Catal.Relat. Subj.*,7:259 (1955)
76. G. Zonta et al./ *Sensors and Actuators B* 262 (2018) 884-891
77. Vermeiren J, Van de Wiele T, Verstraete W, Boeckx P, Boon N. Nitric Oxide Production by the Human Intestinal Microbiota by Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:1-10. doi:10.1155/2009/284718.
78. Kondo T, Mitsui T, Kitagawa M, Nakae Y. Association of fasting breath nitrous oxide concentration with gastric juice nitrate and nitrite concentrations and *Helicobacter pylori* infection. *Digestive Diseases and Sciences* volume 45, pages2054–2057(2000).
79. T. G. de Meij, I. Ben Larbi, M. P. van der Schee, Y. E. Lentferink, T. Paff, J. S. Terhaar sive Droste, C. J. Mulder, A. A. van Bodegraven and N. K. de Boer, Electronic nose can discriminate colorectal carcinoma and advanced adenomas by fecal volatile biomarker analysis: proof of principle study, *International Journal of Cancer* (2014), 134, 1132–1138;
80. <http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/campion/dimens.htm>

81. A.J. Izenman, *Modern Multivariate Statistical Techniques*, Springer-Verlag, New York, 2008, <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-78189-1> (ISSN1431-875X, ISBN 978-0-387-78188-4);
82. Michal Aharon; Michael Elad; Alfred Bruckstein (2006), "K-SVD: An Algorithm for Designing Overcomplete Dictionaries for Sparse Representation" (PDF), *IEEE Transactions on Signal Processing*, 54 (11): 4311–4322, doi:10.1109/TSP.2006.881199;
83. G. Zonta, G. Anania, M. Astolfi, C. Feo, A. Gaiardo, S. Gherardi, A. Giberti, V. Guidi, N. Landini, C. Palmonari, A.de Togni, C. Malagù, "Chemosensitive sensors for colorectal cancer preventive screening through fecal odor: double-blind approach", *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 301, 12 December 2019, 12706284.
84. submitted "Clinical validation outcomes of a non-invasive device for colorectal cancer preventive screening through fecal exhalation analysis" Giulia Zonta^{1,3*}, Cesare Malagù^{1,3}, Sandro Gherardi³, Alessio Giberti⁴, Alessandro Pezzoli⁵, Aldo De Togni², Caterina Palmonari^{1,2}
85. https://www.epicentro.iss.it/passi/pdf2013/contributi_74_screen_febbraio2013.pdf