

## Linee guida per il monitoraggio biochimico delle neoplasie

M. Caputo<sup>a</sup>, R.M. Dorizzi<sup>a</sup>, F. Carmignoto<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera, Verona

<sup>b</sup>Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale "S. Maria della Misericordia", Rovigo

### Introduzione

I risultati ottenuti dalle analisi di un fluido biologico, al fine di ottenere informazioni sulla diagnosi di cancro, vengono a confrontarsi con una serie di problemi, compresi quelli emotivi e di ordine "etico", che appaiono paradigmatici per la necessità che Clinica e Laboratorio raggiungano la condivisione di chiare linee guida basate sulla Medicina delle Evidenze.

Se da una parte i marcatori tumorali (o TAA = antigeni associati al tumore) sono sicuramente i più pubblicizzati in assoluto (si pensi alle prime pagine che ripetutamente il PSA ha guadagnato sui giornali "laici" di tutto il mondo) i pazienti e, talvolta, perfino i medici prescrittori non sono a conoscenza dei limiti di queste analisi. In particolare la valutazione dei risultati di queste analisi deve tenere sempre conto della bassa specificità e sensibilità e della bassa prevalenza delle particolari forme di cancro. Nel caso di un test con una sensibilità ed una specificità del 95%, se usato in una popolazione con una prevalenza di 20 casi su 100.000, 19 dei 20 pazienti con cancro saranno diagnosticati ma l'esame risulterà positivo in 4999 soggetti non malati di cancro. Con la stessa analisi eseguita in una popolazione con una prevalenza del 10%, 9500 dei 10000 pazienti con cancro saranno diagnosticati ma l'esame risulterà positivo in 4500 soggetti non malati di cancro. Semplificando si può dire che nel primo caso (la situazione più frequente) i risultati sono positivi in quattro casi su 1000 casi di malati, nel secondo caso in due su tre.

Un'altra serie di problemi deve essere posta in evidenza. La classificazione di un risultato si fa sulla base di un valore di cut-off che va scelto in modo da individuare il maggior numero possibile di casi di cancro senza sottoporre un numero eccessivo di pazienti ad esami di conferma. D'altra parte anche quando la probabilità di cancro aumenta proporzionalmente all'aumento della concentrazione del TAA, questo non costituisce la regola ed inoltre spesso concentrazioni eccezionalmente elevate di un particolare TAA non sono in grado di orientare verso la diagnosi di sede. Nel monitoraggio devono essere considerate l'entità della diminuzione dopo la

terapia ed il tempo richiesto dalla diminuzione (che dipende da concentrazione iniziale, emivita del marker e tipo di terapia). La chemioterapia, per esempio, può indurre un aumento transitorio della concentrazione che può durare alcuni giorni come nel caso della gonadotropina corionica (HCG) od alcune settimane come nel caso dell'antigene carcinoembrionale (CEA).

Complessa è anche l'interpretazione della variazione di concentrazione dopo un intervento terapeutico o nel corso del tempo. Una resezione incompleta o una recidiva può essere indicata da una diminuzione della concentrazione che avviene con una emivita più lunga, rispetto a quella attesa (anche se la Tabella I mostra come i dati di emivita riportati in letteratura presentino grandi oscillazioni). Secondo il Working Group on Tumor Marker Criteria of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine "una recidiva è indicata dall'aumento di almeno il 25% in tre prelievi successivi separati da almeno 2-4 settimane; una diminuzione di almeno il 50% indica una parziale remissione". Chi interpreta i risultati deve basarsi sulla variazione percentuale e sulla differenza critica. Mentre esistono da tempo dati sulla variabilità biologica di molti analiti, solo negli ultimi anni sono stati presentati dati sulla variabilità biologica dei marcatori tumorali.

**Tabella I. Emivita dei TAA più importanti nel laboratorio clinico.**

CEA	3-11; 2-8 giorni; 0.5-10 giorni 3.5 giorni (I) + 13 giorni (II)
AFP	2-8 giorni; 5-6 giorni (0-7-1.3 (I) + 5.9-6.6 (II); 5 giorni
CA125	5 giorni; 5-10 giorni
CA 19-9	4-8 giorni; 0.4-0.6 giorni (I) + 2.7-7 giorni (II)
CA 72-4	3-7 giorni
CA15-3	5-10 giorni; 5-7 giorni
PSA	2-3 giorni; 1.5-3.2 giorni
HCG	12-36 ore; 24-36 ore; 16-48 ore
NSE	1 giorno;
SCC	1 giorno
CYFRA 21	1 giorno
TPA	1.5-4.5 ore; 1-3 giorni; 4-5 giorni

Anche se la concentrazione di TAA non è determinante per indicare la completa remissione, una concentrazione elevata deve far dubitare della diagnosi di remissione. Infine, nel monitoraggio del trattamento è importante ricordare che i tumori maligni possono presentare tipi cellulari diversi e non tutti producono il TAA che viene misurato. Il trattamento può modificare il tipo cellulare e può interrompere la produzione di un particolare TAA.

### Gli screening per le malattie neoplastiche e l'Unione Europea

Le decisioni prese dall'Unione Europea influenzeranno sempre di più la sanità dei singoli paesi. Per esempio nel novembre 1999 è stato raggiunto il consenso tra Stati Membri, Commissione Europea ad hoc e Parlamento Europeo sui seguenti punti della politica degli screening del cancro (2).

*Cancro della cervice:* l'efficacia dello screening con il metodo di scelta, il PAP-test, è stata dimostrata in molti paesi (è stato stimato che un programma di screening che raggiunge l'intera popolazione riduce del 90% i casi di malattia). Lo screening deve essere eseguito tra i 30 ed i 60 anni e con un intervallo di 3-5 anni; devono essere scoraggiati screening prima dei 20 anni e con intervalli di meno di 3 anni.

*Cancro della mammella:* lo screening mediante mammografia (non vi è dimostrazione dell'efficacia dell'autopalpazione e dell'esame clinico) deve essere eseguito tra i 50 ed i 70 anni e con un intervallo di 2-3 anni. Gli effetti collaterali dello screening tra i 40 e 49 anni non sono trascurabili a causa del basso valore predittivo della mammografia in questa fascia di età, la possibile individuazione di forme di cancro a crescita indolente ed il maggiore rischio di radiazioni.

*Cancro del colon-retto:* lo screening deve essere eseguito mediante ricerca del sangue occulto nelle feci seguito da colonscopia tra i 50 ed i 74 anni e con un intervallo di 1-2 anni.

Le raccomandazioni della Commissione concludono che nessun altro screening deve essere offerto prima che ne sia dimostrata l'efficacia. Anche lo screening del cancro della prostata non è raccomandato fino a quando l'European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer che coinvolge 192000 soggetti e il Prostate, Lung, Colon Ovary Screening Study che coinvolge 63625 soggetti non avranno dimostrato l'effetto sulla mortalità.

Molto recentemente (18 agosto 2001) è stato segnalato come le autorità sanitarie dei diversi paesi sono state molto lente nell'implementare queste raccomandazioni perpetuando l'esecuzione di screening opportunisti poco efficienti ed efficaci (3). La prassi di inserire il PSA nei controlli periodici eseguiti dai medici di medicina generale e nel pannello di ingresso del ricovero ospedaliero ha portato ad una *sovradignosi* (diagnosi di una malattia che non avrà alcun impatto sulla vita del paziente) del cancro della pro-

stata tra il 50-93% a Firenze, tra il 75 ed il 100% a Rotterdam e dal 150% al 275% negli Stati Uniti (4). È davvero preoccupante che l'appello di un epidemiologo illustre come Ciatto (3) e di uno dei padri della urologia mondiale, Stamey (4), di ridurre almeno la disinformazione dei referti di laboratorio portando il limite decisionale del PSA a 10 µg/L non sia stato seguito da nessuno. Alcuni degli Autori di questa nota (RMD, MC) sono stati costretti recentemente a ritornare sui loro passi per le insistenze dei clinici e dei pazienti.

### Le linee guida dell'American Society of Clinical Oncology

L'American Society of Clinical Oncology (ASCO) ha prodotto delle linee guida per l'impiego dei marcatori tumorali nella prevenzione, nello screening e nel monitoraggio del cancro della mammella e del colon-retto basate su una metodologia molto severa e corretta (che tiene conto della evidenza degli articoli considerati) ed aggiornate periodicamente.

Il Tumor Marker Expert Panel di questa prestigiosa Società, formato da specialisti in oncologia, chirurgia, medicina di laboratorio, tecniche decisionali in ambito medico, rappresentanti dei malati, partiva dall'assunto che l'uso inappropriato dei marcatori, come di altre procedure terapeutiche, può indurre decisioni cliniche che portano ad *outcome* peggiori di quelli che si ottengono senza avere le informazioni date dai marcatori. Tutti i componenti del Panel esaminarono, oltre agli articoli sull'argomento dei componenti del Panel stesso, tutti gli articoli pubblicati in inglese nel periodo gennaio 1989 - aprile 1994 (5). Fino ad oggi le linee guida sono state aggiornate due volte: prima sono stati considerati gli articoli dal 1994 al luglio 1997 (6, 7) e poi quelli compresi tra il 1994 ed il marzo 1999 (8). Il Panel ha basato le proprie decisioni sulla "evidenza" nonostante le difficoltà causate, per esempio, dalle ampie variazioni di pratiche consolidate, dalla scarsità dei dati disponibili a favore o contro l'impiego di un determinato marcatore. Il livello di evidenza (dal V al I) dell'utilità del marcatore è:

*Livello V:* evidenza derivata da studi limitati, retrospettivi e non progettati per correlare risultati del marcatore ed outcome clinico.

*Livello IV:* evidenza derivata da studi limitati o non basati sull'analisi multivariata.

*Livello III:* evidenza derivata da studi retrospettivi, ma con notevole numerosità di soggetti (> 200) e basati sull'analisi multivariata.

*Livello II:* evidenza derivata da trial clinici prospettici con lo scopo di valutare principalmente una ipotesi terapeutica e, secondariamente, un marcatore.

*Livello I:* evidenza derivata da meta-analisi o studi controllati prospettici con lo scopo principale di valutare un marcatore.

L'approccio è complessivo per cui, se un marcatore è considerato affidabile nel predire una percentuale ele-

vata di recidiva ma non sono disponibili dati sulla utilità della terapia adiuvante in questa situazione, le informazioni sulla prognosi sono considerate di scarsa utilità.

Gli *outcome* valutati per definire l'utilità del marcatore sono: sopravvivenza complessiva; allungamento dell'intervallo senza malattia; tossicità; miglioramento della qualità di vita; miglioramento del rapporto costo/efficienza della cura. Un marcatore è raccomandato per un determinato impiego solo se i dati della letteratura dimostrano un impatto favorevole su uno di questi *outcome* ovvero se consente decisioni cliniche che possono migliorare l'*outcome* del paziente.

I punti salienti delle linee guida dell'ASCO, confermati negli aggiornamenti del 1998 e del 2001, sono riassunti di seguito.

#### *Cancro del colon-retto*

- il CEA non deve essere usato nello screening del cancro del colon-retto;
- se il CEA può essere utile nella stadiazione e nella programmazione dell'intervento, può essere misurato prima dell'intervento;
- il CEA va misurato ogni 2-3 mesi nei pazienti in stadio II e III per 2 o più anni; un aumento del CEA confermato suggerisce di ricercare eventuali metastasi con altre indagini ma non giustifica l'inizio di terapia adiuvante o sistemica per sospetto di malattia metastatica;
- il CEA deve essere misurato all'inizio della terapia per malattia con metastasi ed ogni 2-3 mesi. Due risultati consecutivi al di sopra del valore di base sono sufficienti per documentare il progresso della malattia anche in assenza di altri dati. Il CEA è il marcatore di scelta per il monitoraggio del cancro del colon-retto;
- non vi sono dati sufficienti per raccomandare gli esami LASA (acido sialico associato ai lipidi), CA 19-9, ploidia del DNA in citometria a flusso (DNA index), indice di proliferazione del DNA in citometria a flusso (% S fase), p-53, oncogene *ras* per screening, diagnosi, sorveglianza e monitoraggio dei pazienti con cancro del colon-retto.

*CEA nello screening.* I limiti del CEA nello screening del cancro del colon-retto sono noti da oltre 20 anni. La percentuale di riconoscimento di cancro del colon nei pazienti con concentrazione di CEA > 5 µg/L è compresa tra 0.1 e 4%. Se si considera una prevalenza del cancro del colon nella popolazione generale intorno allo 0.1%, un test standard che presenti una sensibilità del 40% ed una specificità del 90% (performance tipiche nel caso del cancro in stadio A e B) darebbe 250 falsi positivi per ogni vero positivo. Il Panel conclude che:

- anche se lo screening individuasse qualche caso di cancro che può essere sottoposto a resezione, la percentuale di falsi positivi ed i costi sono inaccettabili;
- non esistono dati che dimostrano che lo screening basato sulla determinazione del CEA assicura migliore sopravvivenza e qualità di vita o costi inferiori.

*Concentrazione post-intervento del CEA.* La concentrazione elevata di CEA ritorna al normale entro 6 settimane dopo una resezione completa. Il permanere di una concentrazione elevata di CEA post-intervento rappresenta un indicatore prognostico negativo anche se non altera sopravvivenza e qualità di vita. Il CEA non deve essere misurato immediatamente dopo l'intervento ma deve essere misurato dopo 4-6 settimane.

*CEA come indicatore di recidiva asintomatica.* Un aumento persistente del CEA (indagini approfondite vanno sempre avviate dopo almeno due determinazioni di CEA) o una slope in aumento indicano la necessità di un controllo della funzionalità epatica e renale (anche la chemioterapia può indurre un aumento del CEA).

*Monitoraggio dopo il trattamento.* La determinazione del CEA rappresenta un modo adeguato per individuare metastasi in pazienti sottoposti a resezione del cancro del colon. Uno studio prospettico ha dimostrato una sensibilità del 94%, una specificità del 96% ed una accuratezza del 94%; un altro studio ha dimostrato che la determinazione del CEA ogni 3 mesi ha identificato una recidiva nel 50% dei pazienti con un anticipo compreso tra 1 e 30 mesi. Il Panel concludeva che il CEA deve essere eventualmente misurato dopo l'intervento ogni 2-3 mesi per 2 anni per quei pazienti che possono sopportare una resezione epatica nel caso di una recidiva.

*Monitoraggio dopo il trattamento per malattia con metastasi.* La riduzione della concentrazione di CEA dopo trattamento chemioterapico indica una risposta ed è associata con una maggiore sopravvivenza rispetto ai pazienti in cui il CEA non diminuisce. Il Panel raccomanda che il CEA sia misurato ogni 2-3 mesi; concentrazioni aumentate di CEA in almeno due occasioni in corso di terapia indicano la progressione della malattia e suggeriscono l'interruzione della terapia anche in assenza di dati radiologici di conferma.

#### *Cancro della mammella*

- non vi sono dati sufficienti per raccomandare il CA 15-3 in screening, diagnosi, sorveglianza e monitoraggio delle pazienti con cancro della mammella. Anche se un progressivo aumento della concentrazione può indicare una recidiva dopo un trattamento, non è stato definito il beneficio clinico;
- i dati disponibili non sono sufficienti per raccomandare l'uso del CA 15-3 nel monitoraggio della risposta al trattamento anche se un aumento della concentrazione del CA 15-3 può indicare il fallimento della terapia;
- non viene raccomandata la determinazione del CEA in screening, diagnosi, stadiazione sorveglianza dei pazienti con cancro della mammella dopo trattamento;
- l'uso routinario del CEA per monitorare la risposta della malattia metastatica al trattamento non è raccomandato anche se un aumento della concentrazione del CEA può indicare l'inefficacia della terapia;
- la determinazione dei recettori per estrogeni e progesterone è raccomandata per ogni paziente con

cancro della mammella primitivo e può essere eseguita per pazienti con lesioni metastatiche se i risultati possono influenzare il trattamento;

- lo status dei recettori degli ormoni steroidei può identificare le pazienti che riceveranno più probabilmente beneficio dalla terapia endocrina;
- lo status dei recettori per estrogeni e progesterone predicono debolmente le recidive a lungo termine e la mortalità legata al cancro della mammella; non possono essere usati da soli per assegnare una paziente ad un determinato gruppo prognostico;
- i dati a disposizione non sono sufficienti per raccomandare la determinazione routinaria mediante citofluorimetria a flusso del contenuto di DNA o S fase;
- la determinazione con citofluorimetria a flusso del contenuto di DNA o S fase non è raccomandata per assegnare una paziente ad un gruppo prognostico;
- la determinazione del contenuto di DNA con citofluorimetria a flusso è insufficiente per prendere decisioni circa opzioni diverse della malattia con metastasi;
- i dati disponibili sono insufficienti per raccomandare l'uso dell'amplificazione genica c-erb-2-(HER-2/neu) per le pazienti con cancro della mammella;
- i dati disponibili sono insufficienti per raccomandare l'uso del p53 per le pazienti con cancro della mammella;
- i dati disponibili sono insufficienti per raccomandare la determinazione della catepsina-D per le pazienti con cancro della mammella.

**CA 15-3.** La sensibilità va dal 9% per il cancro in stadio I al 75% per il cancro in stadio IV anche se basse concentrazioni di CA 15-3 non escludono metastasi e la concentrazione di CA 15-3 non è correlata allo stadio di malattia; concentrazioni superiori al limite superiore dell'intervallo di riferimento di 5-10 volte suggeriscono metastasi (le concentrazioni più alte si ottengono in presenza di metastasi alle ossa ed al fegato). I risultati falsi positivi (in genere fino a concentrazioni inferiori a 100 U/L) arrivano al 5-6% nei soggetti sani e al 30% nei pazienti con epatopatia. Poiché un esame con sensibilità e specificità sopra indicate presenta un quoziente di verosimiglianza intorno a 2, il valore predittivo di un risultato positivo nei primi stadi della malattia (prevalenza = 2%), arriva all'1%. In generale si considera significativa una variazione della concentrazione di CA 15-3 del 25%. Il CA 15-3 risulta elevato nel 67% delle pazienti che hanno presentato una recidiva (con un anticipo della diagnosi di 2-9 mesi) e nell'8% di quelle che non l'hanno presentata. Non devono essere usati insieme CA 15-3 e CEA.

**CEA.** Si deve sempre tenere presente che la terapia può causare inizialmente un aumento del CEA e che il CEA può presentare oscillazioni del 30% (il CA 15-3 del 20%).

*Recettori per gli estrogeni e per il progesterone.* Maggiore è la concentrazione del recettore per gli estrogeni più probabile è la risposta dei tumori alla terapia ormonale, mentre non è ancora accettato da tutti che

la concentrazione dei recettori per gli estrogeni e per il progesterone consenta di predire la risposta della malattia metastatica alla chemioterapia.

Gli aggiornamenti dell'ASCO mantengono le conclusioni delle linee guida del 1997 con l'unica eccezione dell'inserimento del CA 27.29 negli esami che sono considerati per il cancro della mammella (in pratica l'Expert Panel condivide il parere della Federal Drug Administration che il CA 27.29 sia equivalente al CA 15-3). L'aggiornamento del 2000 ricorda con molta evidenza che l'adesione alle linee guida è volontaria e che esse devono assistere il clinico e non sostituirne il giudizio che deve essere basato sulle caratteristiche particolarità del singolo paziente (9). L'ASCO ha prodotto anche delle linee guida circa gli accertamenti clinici e strumentali da eseguire dopo l'intervento per cancro della mammella (8). Secondo l'Expert Panel vi sono dati sufficienti per raccomandare:

- esame clinico mensile della mammella;
- mammografia annuale della mammella sottoposta ad intervento e di quella controlaterale;
- anamnesi ed esame clinico ogni 3-6 mesi per 3 anni;
- anamnesi ed esame clinico ogni 6-12 mesi per i successivi 2 anni;
- anamnesi ed esame clinico annuali a partire dal sesto anno.

Non vi sono dati sufficienti per raccomandare l'esecuzione routinaria di scintigrafia ossea, radiografia del torace, emocromo, CEA, CA 15-3/CA 27.29, ecografia epatica, TAC.

### **Le linee guida della National Academy of Clinical Biochemistry**

All'incirca negli stessi anni in cui l'ASCO produceva le linee guida per il cancro della mammella e del colon-retto la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) e l'European Group on Tumor Markers (EGTM) producevano delle linee guida basate su criteri meno rigidi.

Gli esperti della NACB avevano l'obiettivo di rispondere a 6 domande (10):

- in che modo devono essere usati i marcatori tumorali in screening, diagnosi, monitoraggio della terapia e valutazione della prognosi?
- quali sono gli intervalli di riferimento raccomandati per i diversi marcatori tumorali?
- quali fattori pre-analitici, analitici (per esempio la stima della imprecisione analitica), post-analitici (per esempio conservazione, congelamento e scongelamento) influenzano i diversi esami?
- quale informazione relativa all'esame deve essere contenuta nel referto?

Il documento, non ancora pubblicato nella sua forma definitiva, si occupa di mammella, ovaio, cervice, prostata, sistema neuroendocrino, cellule germinali.

*Cancro della mammella*

Non si discosta dalle linee guida dell'ASCO per quanto riguarda recettori estroprogestinici, CA 15-3 e CA 27.29. Sottolinea la necessità dell'indicazione del metodo usato nel referto, dell'intervallo di riferimento metodo e laboratorio-specifico e del congelamento del campione a  $-20^{\circ}\text{C}$  per la conservazione a breve termine ed a  $-70^{\circ}\text{C}$  per la conservazione a lungo termine.

*Cancro dell'ovaio*

- non deve essere misurato il CA 125 nello screening.
- nelle donne con una forte familiarità per cancro della mammella e dell'ovaio deve essere misurato il CA 125 e deve essere eseguita una ecografia transvaginale ogni 6 mesi;
- il CA 125 deve essere misurato nel donne con massa pelvica; se la concentrazione è superiore a 95 KU/L devono essere eseguite ulteriori indagini;
- dopo l'intervento o la chemioterapia il CA 125 deve essere misurato ogni 3 mesi; se la concentrazione raddoppia devono essere eseguite ulteriori indagini; nel 90% dei casi indica, infatti, il fallimento della terapia;
- il CA 125 non è specifico: aumenta infatti in numerose patologie maligne (tube, endometrio, cervice, mammella, pancreas, colon e polmone) ed in numerose condizioni ginecologiche benigne come endometriosi, infiammazioni pelviche, mestruazioni, gravidanza (primo trimestre);
- nel referto deve essere indicato il metodo usato ed un intervallo di riferimento metodo e laboratorio specifico;
- il campione deve essere congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per la conservazione a breve termine e a  $-70^{\circ}\text{C}$  per la conservazione a lungo termine.

*Cancro della cervice*

- elevate concentrazioni di antigene del carcinoma a cellule squamose (SCCA) al momento della diagnosi di un cancro della cervice in stadio IB o IIA indicano un aumento del rischio di recidive di 3 volte indipendentemente dal diametro e dal grado del tumore o dalla presenza di metastasi linfonodali;
- due aumenti consecutivi della concentrazione dell'SCCA indicano una recidiva o una progressione della malattia nel 76% dei casi e quindi la determinazione dell'antigene ogni 3 mesi può risultare utile;
- l'SCCA 125 non è specifico: aumenta infatti in molte forme di cancro a cellule squamose (cute, polmone, esofago, vescica, pene ed ano) e numerose patologie benigne della pelle (pemfigo, eczema, psoriasi) del polmone (tubercolosi, ARSD, sarcoidosi) e del rene;
- deve essere indicato nel referto il metodo usato ed un intervallo di riferimento metodo e laboratorio specifico.

*Cancro della prostata*

- il PSA non deve essere usato da solo ma insieme all'esplorazione rettale;

- non è ancora chiarito l'impatto della diagnosi precoce del cancro della prostata su morbilità e mortalità;
- il PSA ha molti limiti decisionali che vanno da 2  $\mu\text{g/L}$ , virtuale esclusione di patologia prostatica, a 20  $\mu\text{g/L}$ , virtuale inclusione di cancro della prostata. Il valore di cut-off più frequentemente adottato è 4  $\mu\text{g/L}$  anche se concentrazioni tra 4 e 10  $\mu\text{g/L}$  hanno un valore predittivo basso poiché in questo gruppo di pazienti l'incidenza di ipertrofia prostatica benigna è maggiore di quella del cancro;
- la determinazione della frazione libera di PSA è raccomandata nei casi in cui la concentrazione di PSA totale è compresa tra 4 e 10  $\mu\text{g/L}$  e l'esplorazione rettale risulta negativa;
- la biopsia deve essere raccomandata nei soggetti con concentrazione di PSA totale compresa tra 4 e 10  $\mu\text{g/L}$  e PSA libero inferiore al 10%;
- deve essere indicato nel referto il metodo usato e la sensibilità di questo; deve essere inoltre ricordato che il PSA deve essere usato per la diagnosi di cancro della prostata solo se associato all'esame clinico o ad altre indagini strumentali.

*Cancro del sistema neuroendocrino*

Comprende feocromocitoma, neuroblastoma, carcinoma midollare della tiroide, insulinoma, sindrome carcinoide.

- le diverse forme di cancro possono essere escluse se la concentrazione di adrenalina, noradrenalina e dopamina urinarie e plasmatiche, acido vanilmandelico, acido omovanillico (feocromocitoma), calcitonina (carcinoma midollare della tiroide), insulina (insulinoma), acido 5-idrossiindolacetico (sindrome carcinoide) risulta ripetutamente all'interno dell'intervallo di riferimento;
- la raccolta del campione per catecolamine plasmatiche deve essere eseguita in un paziente a riposo ed in posizione supina da almeno 30 minuti; il campione deve essere immediatamente refrigerato, centrifugato al più presto e congelato a  $-70^{\circ}\text{C}$ ;
- la concentrazione delle catecolamine plasmatiche è influenzata da molti farmaci che devono essere sospesi per almeno 72 ore prima del prelievo;
- la concentrazione di acido vanilmandelico, acido omovanillico e acido 5-idrossiindolacetico è influenzata da molti farmaci che devono essere sospesi prima del prelievo;
- la settimana prima della raccolta del campione per acido 5-idrossiindolacetico non devono essere assunti cibi contenenti molta serotonina ed altri indoli come avocado, banane, caffè, prugne, ananas, pomodori, noce, melanzane;
- la determinazione deve essere eseguita mediante HPLC.

*Cancro delle cellule germinali (CCG)*

- il cancro delle cellule germinali è il più frequente nei maschi di età compresa tra 15 e 35 anni; terapia chirurgica, radioterapia e chemioterapia eventualmente associate portano a remissione del 90% dei casi;

- nella stadiazione del CCG devono essere misurati AFP, gonadotropina corionica (HCG) e lattico deidrogenasi (LD);
- il CCG comprende seminoma e CCGNS (non seminomatoso); il razionale di questa classificazione è che il seminoma è molto sensibile alla radioterapia mentre il CCGNS è molto resistente. L'AFP è prodotta solo in forme del CCGNS come il tumore del seno endodermico e il carcinoma embrionale; l'HCG è prodotta non solo dalle cellule sinciziotrofoblastiche ma anche nel seminoma e nel CCGNS;
- la LD ha un significato prognostico indipendente nel CCG avanzato;
- l'HCG è aumentato nel 7-18% dei seminomi mentre l'AFP aumenta solo nei CCGNS (un paziente in cui è stata fatta diagnosi istologica di seminoma se presenta un'AFP aumentata è considerato affetto da CCGNS e trattato conseguentemente);
- la stadiazione dei CCG è stata completamente rivista nel 1997 ed è stata adottata dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC) e dall'Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Il nuovo sistema comprende oltre alle variabili TNM (Tumore primario, linfoNodi, Metastasi) anche la categoria S (Marcatori tumorali Sierici) che comprende AFP, HCG e LD;
- i tre marcatori devono essere misurati subito dopo l'orchietomia e successivamente tenendo conto della loro emivita: AFP = 5 giorni, HCG = 30 ore; LDH: 3-6 giorni;
- in tutti i pazienti deve essere eseguita una stadiazione secondo il sistema TNMS;
- malattia in stadio I e II: AFP, HCG, LDH, radiografia del torace ed esame clinico devono essere eseguiti mensilmente nel primo anno e ogni 2 mesi nei due anni successivi. La TAC addominale deve essere eseguita ogni 2-3 mesi per 3 anni;
- malattia in stadio III: il valore assoluto della concentrazione dei marcatori tumorali dopo il completamento della chemioterapia consente di predire la risposta alla chemioterapia. Si ha risposta completa quando AFP e HCG si "normalizzano". Concentrazioni persistentemente elevate indicano resistenza alla chemioterapia e, di norma, comportano una prognosi infausta;
- la velocità di riduzione della concentrazione dei marcatori tumorali nelle prime 6 settimane di terapia predice la prognosi e la risposta alla chirurgia ed alla chemioterapia;
- di seguito sono indicati i limiti di riferimento dei marcatori tumorali:

	LD (< LSIR)	HCG (U/L)	AFP (KU/L)
S1	< 1.5	< 5000	< 1000
S2	1.5-10	5000-50000	1000-10000
S3	> 10	>50000	> 10000

LSIR = limite superiore dell'intervallo di riferimento.

## Le linee guida dell'European Group on Tumour Markers

Nel 1999 sono state prodotte dall'EGTM delle linee guida relative a cancro della mammella, ginecologico, gastrointestinale, prostata, polmone, cellule germinali che in certi casi si sovrappongono, in altri integrano ed in altri contrastano con quelle precedentemente descritte (11). L'EGTM è un gruppo costituito formalmente nel 1997 a Barcellona da ricercatori di base e clinici di provenienza mista (accademica, ospedaliera e dalle industrie di diagnostici maggiormente impegnate nella messa punto e nella commercializzazione di metodi per la determinazione dei marcatori tumorali). Gli scopi principali del gruppo sono: informare clinici e laboratoristi circa i vantaggi dell'uso dei marcatori tumorali; fornire consulenza scientifica nello studio dei marcatori tumorali e nella valutazione dei nuovi marcatori; pubblicare linee guida per clinici e laboratoristi, istituire un Programma di Valutazione Esterna di Qualità europea e sostenere Programmi Nazionali.

Le linee guida sviluppate dall'EGTM si propongono una sorta di approccio intermedio tra quello dell'ASCO, più orientate verso la clinica, e quello della NACB, più orientate verso il laboratorio.

### Cancro della mammella

**Diagnosi.** Nella fase iniziale della malattia la sensibilità è bassa (15-35%) e quindi i marcatori non sono utili nella diagnosi.

**Prognosi.** La concentrazione di CEA, CA 15-3 e altri prodotti MUC-1 è significativamente più alta nei pazienti con interessamento dei linfonodi rispetto a quelli senza questo interessamento. Non è dimostrato che costituiscano un fattore prognostico indipendente né che migliorino l'intervallo privo di malattia o la sopravvivenza. Non è dimostrata la relazione tra concentrazione dei marcatori e risposta alla chemioterapia o alla terapia ormonale.

**Follow-up.** CEA e CA 15-3 hanno un *lead time* compreso tra i 2 e i 18 mesi rispetto alla diagnosi clinica o radiologica di malattia. La concentrazione è più alta nelle metastasi epatiche ed ossee mentre è più bassa nelle recidive locali e nelle metastasi polmonari. Rimane da definire il beneficio che la paziente ottiene da una diagnosi precoce della recidiva in termini di sopravvivenza.

**Monitoraggio della terapia.** Rimane da definire il beneficio che la paziente ottiene in termini di qualità di vita.

**Conclusioni.** L'antigene MUC-1 e CEA sono i più utili nel cancro della mammella.

### Cancro ginecologico

**Screening.** L'uso del CA 125 non può essere raccomandato per lo screening del cancro dell'ovaio anche se uno Statement del National Institutes of Health (NIH) raccomanda che le donne con sindrome da cancro ovarico ereditario siano sottoposte almeno annualmente a esame clinico, ecografia transvaginale e determinazione del CA 125.

**Diagnosi.** Anche se la diagnosi è istologica la concentrazione pre-operatoria del CA 125 può essere utile,

soprattutto dopo la menopausa, nella diagnosi differenziale delle masse pelviche.

*Prognosi.* La concentrazione di CA 125 dopo 1, 2, 3 cicli di terapia è uno degli indicatori più efficaci di outcome clinico. Un allungamento dell'emivita del CA 125 o una riduzione di meno di 7 volte della concentrazione nei primi mesi di terapia predicono un cattivo outcome.

*Monitoraggio della terapia.* L'applicazione più importante del CA 125 è il monitoraggio delle pazienti con cancro dell'ovaio con un *lead time* di 1-17 mesi; rivelare la recidiva può modificare la gestione del paziente anche se non è stato dimostrato un effetto sulla sopravvivenza.

*CCG dell'ovaio.* Il cancro indifferenziato (ad esempio il disgerminoma) non produce né AFP né HCG, quello con elementi trofoblastici produce di solito HCG e quello con elementi del sacco vitellino esprime frequentemente AFP. Il follow-up dei pazienti con CCG dell'ovaio deve comprendere AFP e HCG.

*Cancro della cervice.* Non è dimostrato che l'SCCA contribuisca alla diagnosi precoce, che sia un indicatore prognostico indipendente e che sia utile nel monitoraggio del carcinoma a cellule squamose (90% dei casi).

*Conclusioni.* La maggiore utilità del CA 125 è nel monitoraggio delle pazienti con cancro dell'ovaio sottoposte a chemioterapia. Alle pazienti che non rispondono possono essere risparmiati gli effetti collaterali di una terapia inefficace. L'utilità clinica del CA 125 nel cancro dell'endometrio e dell'SCCA nel carcinoma a cellule squamose della cervice non è stata dimostrata.

#### *Cancro gastrointestinale. Cancro del colon retto*

*Diagnosi e screening.* Il CEA non è raccomandato.

*Prognosi.* Non è stato dimostrato che il CEA possa identificare i pazienti del sottogruppo che ottengono benefici dalla chemioterapia.

*Monitoraggio della terapia.* Sono in pratica seguite le linee guida dell'ASCO.

*Cancro del pancreas.* Il CA 19-9 ha un valore limitato della diagnosi; non è dimostrata una utilità nella prognosi e nel monitoraggio.

*Cancro dello stomaco.* Nessuno dei marcatori proposti (CEA, CA 19-9 e CA 72-4) è utile nello screening e nella diagnosi; non è dimostrata una utilità nel monitoraggio.

*Cancro dell'esofago.* Nessuno dei marcatori proposti (SCCA e citocheratine per il carcinoma a cellule squamose e il CA 19-9 per l'adenocarcinoma) è utile nella diagnosi e nel monitoraggio.

*Cancro del fegato. Screening.* Una Consensus Conference dell'NIH ha raccomandato che i pazienti positivi per l'epatite B e con epatite cronica attiva o cirrosi siano sottoposti a screening con AFP ogni 3 mesi. È raccomandato che ad analogo screening siano sottoposti i pazienti con epatite C cronica.

*Diagnosi.* La diagnosi differenziale è ostacolata dal fatto che la concentrazione di AFP può aumentare anche nell'epatite e nella cirrosi.

#### *Cancro della prostata*

*Screening.* Poiché la storia naturale del cancro della prostata non è nota l'uso indiscriminato del PSA può portare ad un eccesso di diagnosi e trattamento. Non è dimo-

strato che diagnosi e terapia precoce portino ad un miglioramento della mortalità complessiva e di quella causata dalla malattia. Il PSA è stato proposto nei pazienti sintomatici e nei soggetti (con attesa di vita superiore a 10 anni e disposti ad eseguire la biopsia della prostata nel caso che il PSA sia aumentato) che lo desiderano. L'introduzione dello screening nella popolazione generale deve essere subordinato alla conclusione degli studi prospettici randomizzati in corso.

*Diagnosi.* Non è raccomandato l'uso di un intervallo di riferimento specifico per fascia di età. Il PSA è raccomandato nei pazienti sintomatici. Ogni referto del laboratorio deve contenere il nome del metodo impiegato e l'intervallo di riferimento specifico per quel metodo e quel laboratorio.

*Follow-up.* Il PSA è utile per determinare la prognosi di un paziente non trattato con anti-androgeni (in corso di trattamento il PSA non sempre riflette il comportamento del tumore; l'assunzione di LHRH agonisti e 5- $\alpha$ -finasteride può abbassare il PSA nonostante la presenza del cancro). Poiché il PSA può cominciare ad aumentare mesi o anni prima della ricomparsa dei sintomi deve essere valutato quanto questa informazione, in rapporto con le opzioni terapeutiche che possono essere offerte, incide sulla qualità di vita del paziente. Nel follow-up del cancro della prostata non deve essere misurato il PSA libero.

*Conclusioni.* Il PSA deve essere usato congiuntamente alla esplorazione rettale; insieme possono portare al sospetto di cancro della prostata che deve essere confermato istologicamente.

#### *Cancro del polmone*

*Diagnosi.* I marcatori (CYFRA 21-1 associato a CEA nell'adenocarcinoma e nel carcinoma a larghe cellule, da solo nell'SCC, con l'NSE nel carcinoma a piccole cellule) possono essere utili nei casi (20%) in cui la diagnosi istologica non è possibile.

*Follow-up.* I marcatori possono risultare utili nel valutare l'efficacia della terapia. Una diminuzione lenta della concentrazione, o addirittura un aumento ed il non ritorno entro l'intervallo di riferimento possono indicare malattia residua.

*Conclusioni.* In generale la prognosi cattiva della malattia e la mancanza di terapia alternativa limitano l'importanza del monitoraggio.

#### *Cancro delle cellule germinali (CCG)*

*Screening.* Non sono raccomandati screening biochimici per il CCG.

*Diagnosi.* In caso di sospetto di CCG alla palpazione o all'ecografia devono essere misurati AFP, HCG e LDH; devono essere misurati anche prima e 5-6 giorni dopo l'intervento e prima di ogni ciclo di chemioterapia. Concentrazioni aumentate di AFP indicano la presenza di elementi di sacco vitellino (tumori a cellule germinali miste, soprattutto carcinoma embrionale e tumori del sacco vitellino).

*Stadiazione.* AFP, HCG e LDH devono essere misurati prima e dopo l'orchietomia; se la loro concentrazione è aumentata le misurazioni devono essere ripetute in modo da calcolare l'emivita.

**Prognosi.** Una cattiva prognosi è indicata da metastasi epatiche, ossee e cerebrali, una concentrazione di AFP > 1000 KU/L e di HCG > 10000 U/L, presenza di una massa mediastinica di diametro > 10 cm e più di 20 metastasi polmonari. È ripresa la classificazione della NACB con cattiva prognosi allo stadio S3, prognosi intermedia allo stadio 2 e buona prognosi allo stadio S1. Anche un'emivita dell'AFP superiore a 7 giorni e dell'HCG superiore a 3 giorni comportano una cattiva prognosi.

**Follow-up.** Concentrazioni di HCG o AFP persistentemente elevate nei CCGNS e di HCG nei seminomi indicano che il cancro non era limitato al testicolo. Una concentrazione in aumento di uno dei marcatori anche senza altri dati strumentali implica malattia attiva ed è sufficiente per iniziare la terapia. Una concentrazione "normale" del marcatore non esclude una recidiva; questa può avere un comportamento biologico diverso rispetto alla lesione originale e può non produrre più il marcatore.

**Conclusioni.** Il CCG rappresenta un caso unico di integrazione di marcatori tumorali strettamente integrati nella diagnosi, stadiazione, prognosi e monitoraggio. La presenza di AFP prevale addirittura sull'istologia per considerare un cancro un seminoma con importanti implicazioni terapeutiche. I marcatori consentono una stadiazione più accurata e sono indispensabili per valutare la risposta alla chemioterapia.

**Tabella II. Diagnosi ICD-9-CM per cui Medicare rimborsa l'esame CEA.**

150.0-150.9	Neoplasia maligna dell'esofago
151.0-151.9	Neoplasia maligna dello stomaco
152-154.8	Neoplasia maligna del piccolo intestino, colon, e retto
157.0-157.9	Neoplasia maligna del pancreas
159.0	Neoplasia maligna del tratto intestinale, sede non specificata
162.0-162.9	Neoplasia maligna della trachea, bronco, polmone
174.0-174.9	Neoplasia maligna mammella, femmina
175.0-175.9	Neoplasia maligna mammella, maschio
183.0	Neoplasia maligna, ovaio
197.0	Neoplasia maligna, polmone
197.4	Neoplasia maligna secondaria, piccolo intestino
197.5	Neoplasia maligna secondaria, grosso intestino e retto
230.3	Carcinoma in situ, colon
230.4	Carcinoma in situ, retto
230.7	Carcinoma in situ, intestino altre sedi
230.9	Carcinoma in situ, intestino, altra sede ed imprecisata
235.2	Neoplasia di incerta natura di stomaco, intestino, retto
V10.00	Storia personale di neoplasia maligna del tratto gastro-intestinale, Non specificato
V10.3	Storia personale di neoplasia maligna, mammella
V10.05	Storia personale di neoplasia maligna, grosso intestino
V10.06	Storia personale di neoplasia maligna, retto, giunzione retto-sigmoidea, ano
V10.11	Storia personale di neoplasia maligna, bronco, e polmone
V10.43	Storia personale di neoplasia maligna, ovaio
V67.2	Follow-up dopo chemioterapia

## La posizione del Medicare

Nel corso del 1999 negli Stati Uniti è stato raggiunto l'accordo tra il governo e le principali Associazioni Scientifiche e Professionali (tra le altre American Medical Association, American Hospital Association, American College of Physicians-American Society of Internal Medicine, American Society of Internal Medicine, American Association for Clinical Chemistry, American Society of Clinical Pathologists, American Clinical Laboratory Association, College of American Pathologists, American Society for Microbiology) circa il rimborso da parte del programma Medicare (che si occupa delle prestazioni sanitarie erogate ai cittadini con più di 65 anni) delle spese sostenute per l'esecuzione di 23 esami di laboratorio o gruppi di esami (tra cui i marcatori tumorali) che comprendono il 60% di tutte le prestazioni di laboratorio.

L'accordo è di interesse sia perchè è stato sottoscritto da tutte le associazioni professionali che a qualche titolo sono coinvolte nella medicina di laboratorio di quel paese sia perchè altre modalità di regolamentazione dei rimborsi delle prestazioni sanitarie (DRG) sono state "esportate" dagli Stati Uniti nel nostro paese (12). Questi accordi:

- non consentono i rimborsi di prestazioni che sono eseguite per screening (con l'eccezione della ricerca del sangue occulto nelle feci e della determinazione del PSA che sono stati successivamente approvati dal governo);
- prevedono che gli esami sono considerati necessari da gruppi di lavoro sulla base di "evidenze" autorevoli che riflettono le indicazioni di Società Scientifiche e Professionali a livello nazionale e non l'opinione di singoli medici.

In pratica si fa riferimento alla classificazione delle malattie secondo l'International Classification of Diseases 9<sup>th</sup> revision - Clinical Modification (ICD-9-CM) (Tab. II). Il concetto fondamentale è che *questi test non sono in grado di fare diagnosi di nessun tipo di neoplasia e quindi non possono essere usati in questo senso ma sono in grado, se usati correttamente, di dare informazioni circa gli effetti di una terapia.*

Le indicazioni e le limitazioni per ottenere il rimborso delle spese per la determinazione dei marcatori tumorali sono molto limitate. Di seguito sono riportati alcuni esempi.

**CEA. Indicazioni:** Follow-up del cancro gastroenterico, cancro del pancreas, mammella, polmone (adenocarcinoma e piccole cellule) e monitoraggio della risposta alla terapia. **Limitazioni:** dopo la resezione di metastasi epatiche ogni 2-3 mesi per almeno 2 anni. Nel corso della terapia prima dell'inizio e prima di ogni ciclo.

**CA125. Indicazioni:** dopo terapia tre determinazioni per determinare l'emivita. Dopo il completamento della terapia ogni 3 mesi per 2 anni e poi ogni 6 mesi per altri 3 anni. **Limitazioni:** non rimborsato per la valutazione di pazienti e sintomi suggestivi di cancro e specificatamente nella diagnosi differenziale di masse benigne e maligne.

## Conclusioni

L'esame delle più recenti ed autorevoli linee guida relative al monitoraggio biochimico delle neoplasie dimostra che l'imponente letteratura in questo ambito ha oscurato il fatto che la rilevanza clinica di molti TAA è modesta. La pervasività delle informazioni irrilevanti o addirittura fuorvianti è tale che anche le Guide curate dagli Autori più preparati che seguono la metodologia più moderna danno nel complesso una informazione diametralmente diversa da quella raccomandata da ASCO, NACB e EGTM (13). Molti TAA rilevano una recidiva prima che diventi clinicamente evidente, ma se non sono disponibili trattamenti efficaci, questa informazione è inutile per il paziente ed inutile (ed onerosa) per il Laboratorio e per il Sistema Sanitario Nazionale. Sia per il clinico che per il paziente un risultato negativo può essere rassicurante ma un risultato positivo può causare grande ansia e indurre ulteriori indagini di *resa* informativa molto modesta. Il comprensibile desiderio del clinico e del paziente di sapere come "sta andando" può essere soddisfatto con la valutazione clinica. È possibile che questa situazione cambi con la messa a punto di terapie maggiormente efficaci (14, 15).

Gli assi portanti dell'uso dei TAA sono stati recentemente sintetizzati in una decina di pagine nelle recenti linee guida della Associazione dei Biochimici Clinici irlandesi (16):

- nessun TAA è specifico per il cancro;
- la concentrazione dei TAA è aumentata di rado nelle fasi precoci del cancro;
- nessun TAA possiede una specificità assoluta d'organo;
- l'unico TAA aumentato virtualmente in tutti i casi di un tipo particolare di cancro è l'HCG nel corioncarcinoma;
- tentare di identificare il tumore primitivo chiedendo insieme due o più TAA, per esempio CEA e una o più antigeni mucinici, è raramente utile;
- gli intervalli di riferimento per i TAA sono mal definiti. Sono più utili le variazioni nel tempo piuttosto che i valori assoluti;
- la standardizzazione dei metodi, per il PSA in particolare, è molto scarsa; metodi diversi possono dare risultati molto diversi;
- il referto relativo ai TAA deve contenere l'indicazione del metodo usato.

Questi punti essenziali rappresentano la base condivisa per la radicale innovazione della forma e della sostanza delle modalità di impiego dei TAA. Negli anni scorsi ASCO, NACB, EGTM e Medicare hanno applicato questi punti generali e le regole dell'"evidenza" alle modalità di impiego dei diversi TAA con risultati non ancora completi ma già di grande interesse.

Venti anni fa KD Bagshawe (17) inaugurando il Joint Meeting della British Association for Cancer Research, riflettendo sulle implicazioni dei risultati falsi positivi dei marcatori tumorali, commentava che sempre più risorse vengono trasferite dalla cura dei malati allo

studio dei sani. Per evitare di perpetuare questa situazione l'impegno dei medici di laboratorio, delle Società Scientifiche e della Società Italiana di Medicina di Laboratorio, in particolare, deve essere quello di applicare raccomandazioni per l'impiego degli antigeni associati al cancro realmente basate su evidenze solide non dal prossimo anno, non dal prossimo mese ma da subito.

## Bibliografia

1. Thomas CMG, Sweep CGJ. Serum tumor markers: past, state of the art, and future. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 73-86.
2. Advisory Committee on Cancer Prevention. Position paper. Recommendations on cancer screening in the European Union. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1473-8.
3. Arbin M, Van Oyen H, Lyng E, Mickshe M. European consensus on cancer screening should be applied urgently by health ministers. *BMJ* 2001; 323: 396.
4. Ciatto S. Screening for prostate cancer by PSA determination: a time for caution. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 285-7.
5. Stamey TA. Preoperative serum prostate-specific antigen (PSA) below 10 µg/L predicts neither the presence of prostate cancer nor the rate of postoperative PSA failure. *Clin Chem* 2001; 47: 631-4.
6. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Tumor Markers Expert Panel. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2843-77.
7. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Review Committee. 1997 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 793-5.
8. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Breast Cancer surveillance Expert Panel. 1998 update of recommended breast cancer surveillance guidelines. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1080-2.
9. Bast RC Jr, Radvin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H Jr, Jessup JM, et al. 2000 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865-78.
10. Witliff JL, Kaplan LA, eds. Guidelines for the analytical performance and clinical utility of tumor markers: Standards of laboratory practice. Rye brook, NY, USA: NACB, 1998; 1-46.
11. European Group on Tumour Markers: consensus recommendations. *Anticancer Res* 1999; 19: 2785-820.
12. Schwartz MK. Opening remarks. In: Tumour markers: successful laboratory practice for today and tomorrow. Washington: AACC, 1999; 3-14.
13. Gion M. Uso clinico dei markers tumorali. Guida rapida. Milano: Biomedica, 1997.
14. Pannall P, Kotasek D. Cancer and clinical biochemistry. London: ACB Venture Publications, 1997.
15. Duffy MJ. Clinical uses of tumour markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 225-62.
16. Duffy MJ, McGing P, McSweeney J. Guidelines for the use of tumour markers. 2nd ed. Dublin: ACBI, 2000.
17. Bagshawe KD. Tumour markers- where do we go from here. *Br J Cancer* 1983; 48: 167-75.