Guida all'uso clinico dei biomarcatori in oncologia: premesse e generalità

Massimo Gion[1], Chiara Trevisiol[1,2], Silvia Pregno[3], Aline S.C. Fabricio[1,2] a nome dei Gruppi e Comitati di Progetto della Guida*

[1]Centro Regionale Biomarcatori, U.O. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda ULSS 12 Veneziana, [2]Fondazione ABO, Venezia

[3]GRADE Working Group, Cochrane Methodology Review Group, Castelvetro di Modena, MO

**L'elenco completo di tutti gli Autori e Collaboratori della Guida è pubblicato su Biochim Clin 2011;35:91-3.*

ABSTRACT

Guidelines for clinical use of biomarkers in oncology: premises and introductory concepts. In this document a working definition of circulating cancer biomarkers is provided and discussed within a broader definition of disease biomarkers and their possible classifications. The biomarker families possibly suitable for clinical use on the basis of available evidence are then considered, concluding that only few biomarkers may be helpful in the management of cancer patients. They are well known molecules discovered 20-30 yeas ago, quantitatively related to the tumour burden, encompassing classical "tumor markers" (CEA, AFP, hCG) and glycoproteins discovered by immunologic recognition (CA 125, CA 15.3, CA 19.9). The most relevant characteristics of quoted biomarkers are reported. The poor "cancer specificity" of available biomarkers is discussed, concluding that circulating concentrations of the so-called "tumor" markers are the sum of several variables including (if present) the malignancy. Non-tumor variables potentially responsible of variations in circulating concentrations of biomarkers are reported. They include physiological conditions and life style patterns, diseases other than cancer, and iatrogenic artefacts. The analytical and pre-analytical issues that may interfere with the biomarker determination, including autoantibodies, human anti-mouse monoclonal antibodies, and the "hook effect", are also examined.

ABBREVIAZIONI E ACRONIMI UTILIZZATI

Parametri ematochimici

5-HIAA	Acido idrossiindolacetico
AbTg	Anticorpi anti-tireoglobulina
ACTH	Ormone adrenocorticotropo
AFP	α-fetoproteina
CA 15.3	Antigene carboidratico 15.3
CA 19.9	Antigene carboidratico 19.9
CA 27.29	Antigene carboidratico 27.29
CA 125	Antigene carboidratico 125
CEA	Antigene carcinoembrionario
CgA	Cromogranina A
Ct	Calcitonina
CTC	Cellule tumorali circolanti
DHEA-S	Deidroepiandrosterone solfato
ECD HER2	Dominio extracellulare di HER2
HAMA	Anticorpi umani anti-immunoglobulina murina
hCG e β-hCG	Gonadotropina corionica umana e subunità β
HER2	Recettore umano per il fattore di crescita epidermico 2
IgM	Immunoglobuline M
LDH	Lattato deidrogenasi
MIA	Melanoma inhibitory activity
MUC-1	Mucin 1 (cell surface associated mucin)
NSE	Enolasi neurone specifica
PAP	Fosfatasi acida prostatica
PSA	Antigene prostatico specifico
PSA L/T	Rapporto PSA libero su PSA totale
SCCA	Squamous cell carcinoma-associated antigen
Tg	Tireoglobulina
TSH	Ormone tireostimolante
VEGF	Fattore di crescita vascolare endoteliale
VES	Velocità di eritrosedimentazione
VIP	Peptide intestinale vasoattivo

Organizzazioni, Società, Gruppi cooperativi

ACCP	American College of Chest Physicians
ACN	Australian Cancer Network
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ACS	American Cancer Society
AGREE	Appraisal of Guidelines for Research and Evaluation
AHRQ	Agency for Healthcare Research and Quality
AIOM	Associazione Italiana di Oncologia Medica
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATA	American Thyroid Association

Corrispondenza a: Massimo Gion, Centro Regionale Biomarcatori, U.O. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda ULSS 12 Veneziana, Campo Santi Giovanni e Paolo, 30122 Venezia. Tel. 0415294260, Fax 0415294910, E-mail massimo.gion@ulss12.ve.it

EMEA	European Medicines Agency
ESMO	European Society for Medical Oncology
GRADE	Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGC	National Guideline Clearinghouse
NICE	National Institute for Health and Clinical Excellence
SIGN	Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SNLG	Sistema Nazionale Linea Guida

Miscellanea

CAS	Chemical abstract service
CC	Consensus conference
CRM 457	Human thyroglobulin reference material 457
DT	Tempo di raddoppio
EBG	Linea guida evidence-based
EBM	Evidence-based medicine
ER	Esplorazione rettale
FMTC	Carcinoma midollare tiroideo familiare
FNAC	Fine needle aspiration cytology
HCC	Epatocarcinoma
HTA	Health technology assessment
IRP	International reference preparation
LG	Linea guida
LoE	Level of evidence
MTC	Carcinoma midollare della tiroide
NEBG	Linea guida non evidence-based
NSCLC	Tumore non a piccole cellule del polmone
NSGCT	Tumori germinali non seminomatosi del testicolo
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PET	Tomografia a emissione di positroni
Qaly	Quality adjusted life years
RMI	Risk of malignancy index
RT-PCR	Reazione a catena della polimerasi in tempo reale
SCLC	Tumore a piccole cellule del polmone
SI	Standard internazionale
SoR	Strength of recommendation
TAC	Tomografia assiale computerizzata

INTRODUZIONE

Negli ultimi 50 anni la mortalità per cancro è complessivamente diminuita del 7-10%. Tali progressi sono legati principalmente alla diagnosi precoce ottenuta mediante campagne di screening e all'efficacia delle terapie "precauzionali" eseguite assieme all'ablazione radicale del tumore. Tuttavia, per avere un termine di paragone, è necessario tenere presente che nello stesso intervallo temporale la mortalità per le malattie cardiovascolari si è ridotta di ben il 60-70%. Pur vedendo in modo positivo i progressi fatti in oncologia, l'impatto sulla diagnosi precoce e sulla cura è quindi ancora limitato.

Nei due decenni più recenti, grazie anche ad uno straordinario sviluppo delle biotecnologie e della bioinformatica, la progressiva disponibilità di informazioni sulla biologia della cellula tumorale ha portato a un incremento precedentemente inimmaginabile delle nostre conoscenze sui tumori. Parallelamente si sono così sviluppate nuove linee di farmaci, mirati a bersagli biologici, e si sono aperte nuove frontiere diagnostiche, sia nell'"imaging" che nella diagnostica *in vitro*, ed in particolare nel campo dei biomarcatori. Infatti, l'attuale sviluppo delle conoscenze e il livello di innovazione tecnologica fanno prevedere la possibilità di utilizzare i marcatori a) per identificare i meccanismi della cellula tumorale che possono diventare bersaglio di farmaci mirati a specifiche molecole, offrendo le premesse biochimiche per una terapia individualizzata; b) per classificare i profili genetici o fenotipici del singolo paziente in modo da predire la capacità individuale di rispondere ai farmaci o il rischio individuale di sviluppare fenomeni tossici; e c) per distinguere profili di rischio individuali in base a condizioni genetiche o situazioni contingenti (ad es., stati infiammatori cronici, infezioni virali, stati metabolici anomali), aprendo così la strada alla prevenzione primaria.

Tuttavia, in questo scenario molto promettente, ma di crescente complessità, è necessario distinguere in modo esplicito e non equivoco la ricerca dall'ambito clinico applicativo, rimarcando che il compito di identificare e collaudare i nuovi marcatori deve rimanere confinato a progetti di ricerca di base e di trasferimento, mentre l'impiego per finalità diagnostiche o terapeutiche deve essere ristretto ai presidi diagnostici già consolidati per i quali esistano evidenze sufficienti a garantire un utilizzo appropriato.

Tenendo presente questo principio, la parte introduttiva della presente Guida così come il capitolo contenente le tavole delle raccomandazioni fanno riferimento ai marcatori per i quali esistono evidenze consolidate.

DEFINIZIONE

In termini generali, un biomarcatore è una caratteristica oggettivamente misurabile e valutata come indicatore di un processo biologico fisiologico, di uno stato patologico, o della risposta ad un intervento terapeutico. In oncologia, la definizione di un biomarcatore dipende dall'ambito di interesse scientifico o dall'obiettivo applicativo. Un marcatore può essere infatti misurato nel tessuto del tumore a fini prognostici o predittivi, nelle cellule nucleate del sangue per identificare polimorfismi utili a prevedere la sensibilità a qualche farmaco, in liquidi biologici diversi nella popolazione generale per identificare eventuali predittori molecolari associati ad un maggior rischio di sviluppare una neoplasia. Altri esami, che misurano comuni componenti dei fluidi corporei, sono correntemente usati per identificare potenziali portatori di una neoplasia; tipico è l'esempio della ricerca del sangue occulto nelle feci per lo screening del cancro del colon-retto che, in tale scenario, è un "biomarcatore" utilizzato in oncologia. Va poi considerata un'ampia serie di parametri ematochimici generali, che possono modificarsi in

presenza di una neoplasia come risposta dell'ospite; fra questi, l'emoglobina, l'albumina, la VES, la proteina C-reattiva e numerosi enzimi espressione di danno d'organo. Da un punto di vista generale, ogni segnale biologico correlato alla presenza di una neoplasia può essere quindi definito "marcatore". Si tratta però di una definizione alquanto estensiva, che può includere categorie molto eterogenee di indicatori biologici. È quindi comprensibile che in letteratura si rilevino numerose definizioni per i marcatori utilizzati in oncologia.

Ai fini pratici, in oncologia si tende oggi a considerare "biomarcatori" o "marcatori" quelle molecole che sono espresse e rilasciate dal tessuto tumorale stesso o dal microambiente circostante. I marcatori così intesi possono essere classificati secondo le caratteristiche biochimico-biologiche, secondo la specificità tissutale, in relazione al meccanismo cellulare cui eventualmente sono associati, o ancora in base alla loro topografia sub-cellulare. Possono anche essere operativamente catalogati in base al possibile significato clinico (marcatori diagnostici, prognostici, predittivi).

La classificazione dei marcatori è quindi un problema complesso, spesso legato a modalità convenzionali o arbitrarie di raggruppamento, ma fortunatamente, nel caso dei marcatori circolanti consolidati cui la presente Guida si riferisce, non si tratta di un problema critico per le decisioni cliniche.

QUALI MARCATORI PER LA PRATICA CLINICA?

I marcatori classici

Oggi, solo per un numero limitato di marcatori disponiamo di informazioni, basate sia su un'ampia esperienza applicativa che su un numero limitato di studi sperimentali, sufficienti a consentire la definizione di indicazioni d'uso ragionevolmente condivise. Si tratta dei marcatori "classici" identificati oltre 30 anni fa, che comprendono sia molecole di cui si conosce la struttura chimica (CEA, AFP, hCG, PSA) sia marcatori identificati con anticorpi monoclonali (CA 15.3, CA 125, CA 19.9). Caratteristiche chiave di tali marcatori sono la non-tumore specificità e la relazione diretta delle concentrazioni misurabili nel sangue con la quantità di tessuto neoplastico.

Per quanto riguarda la non-tumore specificità, tutti i marcatori classici sono molecole normalmente presenti nei tessuti non neoplastici, che possono essere prodotte e/o rilasciate in maggior quantità in diverse condizioni patologiche, tumorali e non. Si tratta quindi di marcatori tessutali che indicano, se elevati in circolo, un possibile stato patologico di uno o più organi.

Per quanto riguarda la seconda caratteristica, è provato che la quantità di marcatore prodotta e/o rilasciata da una neoplasia è in genere proporzionale all'estensione del tumore. La relazione diretta pressoché costante con la massa di tessuto neoplastico compromette in genere la sensibilità di tali marcatori per la diagnosi di tumore iniziale.

La ragione di questi limiti si comprende ripensando alla "storia" di tali marcatori. Essi furono infatti scoperti circa 30 anni fa con tecniche finalizzate ad individuare molecole associate alla presenza di un tumore. Tessuti tumorali (in pool o selezionati per sede) venivano usati per generare una batteria di anticorpi che, successivamente, erano cimentati con tessuti diversi, normali e neoplastici, per selezionare gli anticorpi capaci di identificare antigeni maggiormente "tumore-specifici". Tale approccio, che si basava sull'ipotesi non dimostrata di una diversità antigenica qualitativa fra tumore e tessuto normale, ha in qualche modo orientato le aspettative dei ricercatori e condizionato l'impiego dei marcatori da parte dei clinici. La definizione di "antigeni tumore-associati", basata appunto su tale modalità di identificazione, e la conseguente, universale definizione di marcatori "tumorali" hanno senza dubbio oscurato i limiti intrinseci di specificità e sensibilità di tali molecole, contribuendo senz'altro alla diffusione di un utilizzo inappropriato a scopo diagnostico.

Gli "esami ematochimici"

Nella pratica clinica anche alcuni parametri ematochimici classici, quali l'emoglobina, l'albuminemia, la VES, le proteine della fase acuta, gli indicatori di metabolismo osseo e numerosi enzimi, vengono utilizzati nella gestione del paziente oncologico. Alterazioni di questi parametri possono corrispondere ad una invasione e a un danno dei tessuti normali da parte del tumore; il loro ruolo resta quindi in genere limitato alla valutazione dello stato di organi e tessuti del paziente con malattia neoplastica avanzata. Per tale ragione non vengono considerati abitualmente "marcatori" oncologici in senso stretto. Alcuni di essi sono stati in effetti utilizzati, in associazione con i classici marcatori di estensione, nel monitoraggio della terapia per la malattia avanzata. In particolare, la VES è stata studiata in associazione con il CA 15.3 nel carcinoma della mammella metastatico, mentre albumina, emoglobina e LDH sono stati variamente associati ai marcatori tessuto specifici (PSA, hCG) in algoritmi diversi per il monitoraggio della terapia delle neoplasie avanzate della prostata e del testicolo, rispettivamente.

Fra i parametri ematochimici, LDH rappresenta un caso particolare. Infatti, oltre ad essere un indicatore di danno d'organo, può anche comportarsi come un biomarcatore di neoplasia in senso stretto in quanto sembra possa essere prodotto e rilasciato dal tessuto di alcuni tumori. Questa ipotesi è sostenuta da dati sperimentali relativi al carcinoma del testicolo, che vale quindi la pena di riassumere brevemente. LDH è presente in circolo come tetramero costituito da due dimeri (LDH-A e LDH-B), che possono combinarsi in modo variabile dando origine a cinque isoenzimi LDH-1 [4 subunità B (B_4)], LDH-2 (B_3A_1), LDH-3 (B_2A_2), LDH-4 (B_1A_3) e LDH-5 (A_4). Il gene che codifica LDH-A è localizzato sul cromosoma 11, mentre il gene per LDH-B è localizzato sul braccio corto del cromosoma 12 (*12p*). I seminomi e i NSGCT esprimono copie addizionali del

braccio corto del cromosoma 12 ed è stata riportata una correlazione fra il numero di copie di *12p* e le concentrazioni sieriche di LDH-1.

Marcatori di rischio

Le varianti genetiche correlate al rischio di sviluppare tumori eredo-familiari rappresentano una categoria di marcatori ben consolidata e caratterizzata da un alto valore predittivo. Tali marcatori riguardano un numero limitato di neoplasie e una frazione ristretta di pazienti e presentano problematiche del tutto particolari, sia analitiche che applicative. Considerato l'alto livello di specializzazione richiesto per gestire questi marcatori e le neoplasie ad essi correlate, si ritiene che la loro trattazione non rientri nell'obiettivo di questa Guida. Per completezza espositiva si crede opportuno citarli fra i marcatori che hanno un ruolo clinico definito rinviando però alla letteratura specialistica chi fosse interessato ad una trattazione analitica.

PRINCIPALI CARATTERISTICHE DEI MARCATORI CITATI

In questa riedizione 2010 si è convenuto di presentare le informazioni in forma tabulare per offrire al lettore una visione sinottica e rapida delle caratteristiche principali dei biomarcatori di cui si raccomanda l'impiego.

I marcatori sono elencati per sigla in ordine alfabetico. Per ogni marcatore vengono riportati gli elementi di maggior rilievo per un inquadramento biologico-clinico che, per comodità di presentazione, sono riassunti nelle Tabelle 1 e 2. Di essi, alcuni meritano un commento.

L'emivita (tempo di dimezzamento) e la differenza critica sono informazioni relative alla cinetica dei biomarcatori che possono essere di aiuto nella interpretazione clinica di valori seriati. La natura chimica e il PM sono informazioni di base finalizzate a un inquadramento biochimico della molecola di interesse.

Tabella 1
Principali caratteristiche biologiche dei marcatori citati nella Guida

Marcatore (acronimo)	Marcatore (nome per esteso)	Emivita ($T_{1/2}$)	Differenza critica[a]	Natura chimica	PM (kDa)
AFP	α-fetoproteina	4-7 gg	40%	Glicoproteina (α_1-globulina) con microeterogeneità carboidratica (isoforme)	≈67
CA 15.3[b]	Antigene carboidratico 15.3	5-7 gg	20%	Glicoproteina (mucina MUC1)	300-400
CA 19.9 (GICA)	Antigene carboidratico 19.9	4-8 gg	45%	Glicoproteina (mucina MUC1)	360
CA 125	Antigene carboidratico 125	5-6 gg	80%	Glicoproteina (mucina MUC16)	≈500
CEA	Antigene carcinoembrionario	6-8 gg	40%	Glicoproteina	200
CgA	Cromogranina A	3-8 ore	45%	Glicoproteina acida (secretogranine)	49-52
Ct	Calcitonina	2-15 min	ND	Polipeptide a catena singola	3,5
hCG (vedi Tabella 3)	Gonadotropina corionica umana	1-3 gg	ND	Glicoproteina (dimero)	12-36,7
5-HIAA	Acido 5-idrossi-3-indolacetico (CAS 54-16-0)	5-20 ore	ND	Metabolita della serotonina	≈190
Inibina	Inibina (in circolo due isoforme A e B)	ND	ND	Glicoproteina	28-39
LDH	Lattato deidrogenasi (EC 1.1.1.27)	ND	25%	Proteina (enzima)	135-140
NSE	Enolasi neurone specifica	ND	ND	Glicoproteina (enzima glicolitico)	≈90
PSA	Antigene prostatico specifico	2-3 gg	50%	Glicoproteina[c]	30-90
SCCA	Squamous cell carcinoma-associated antigen	<24 ore	ND	Glicoproteina	≈48
Tg	Tireoglobulina	5 gg	ND	Glicoproteina (dimero)	660
VIP	Peptide intestinale vasoattivo	ND	ND	Peptide	3,5

[a] Dati derivati da Dolci A, Scapellato L, Panteghini M. Biochim Clin 2008;32:181-5.
[b] Sono disponibili altri metodi che riconoscono lo stesso antigene (CA 27.29, antigene carboidratico mucinoso).
[c] Il PSA circolante si trova sia in forma libera ("free PSA") che complessata (prevalentemente con α_1-antichimotripsina). PM: ~30 kDa la forma libera, ~90 kDa la forma complessata.
ND, non determinata.

Tabella 2
Principali caratteristiche metologiche della misurazione dei marcatori citati nella Guida

Marcatore	Anticorpi utilizzati per la misura	Standard internazionale di riferimento	No. metodi commerciali	Disponibilità metodi automatizzati
AFP	Numerosi, sia policlonali che monoclonali	WHO 1° SI 72/225	>15	Sì
CA 15.3	Due monoclonali (DF3 e 115D8)	No	>15	Sì
CA 19.9	Uno monoclonale 1116NS19-9 e altri	No	>15	Sì
CA 125	Due monoclonali (OC125 e MoAb M11)	No	>15	Sì
CEA	Numerosi, sia policlonali che monoclonali	IRP 73/601	>15	Sì
CgA	Sia monoclonali che policlonali, sia per la molecola intera che per il frammento carbossi-terminale	No	3	No
Ct	Policlonali	2° SI 89/620	>5	Sì
hCG	Numerosi, sia policlonali che monoclonali	Vedi Tabella 3	>15	Sì
5-HIAA	Policlonali o determinazione per via cromatografica con rilevazione elettrochimica	No	>10	No
Inibina	Numerosi monoclonali	WHO 191/624 per inibina A	3	Sì per inibina A, no per inibina B
LDH	No (Determinazione spettrofotometrica della cinetica enzimatica)	ERM-AD453 IFCC	>15	Sì
NSE	Numerosi, sia policlonali che monoclonali	No	>5	Sì
PSA	Numerosi, sia policlonali che monoclonali	WHO 96/670[a]	>15	Sì
SCCA	Policlonali	No	2	Sì
Tg	Policlonali	CRM 457 (European Bureau of Reference)	>10	Sì
VIP	Sia monoclonali che policlonali	No	4	No

[a] *Fornisce risultati più bassi del 20-25% rispetto alla calibrazione "Hybritech".*

Gli anticorpi utilizzati per la misura, la disponibilità o meno di un SI di riferimento, il numero di metodi commerciali disponibili e la esistenza di metodi automatizzati di dosaggio sono indicatori della potenziale variabilità dei risultati di dosaggi, quando eseguiti in centri diversi.

Nel caso della hCG si è preferito elencare in una apposita Tabella (Tabella 3) le informazioni relative alle varie isoforme di interesse oncologico.

CAUSE NON ONCOLOGICHE DI VARIAZIONI DEI LIVELLI DEI MARCATORI

I valori ematici di numerosi biomarcatori possono mostrare variazioni sia legate a eventi clinici non associati alla presenza o alla progressione del tumore, sia dovute a interferenze con il metodo di dosaggio da parte di sostanze presenti nel campione.

Cause cliniche

Il fatto che i biomarcatori siano espressi e rilasciati anche da tessuti e organi non neoplastici ha come conseguenza che le concentrazioni circolanti di numerosi di essi possano variare indipendentemente dalla presenza di una neoplasia. Le ragioni cliniche di un possibile incremento delle concentrazioni dei marcatori dipendenti da eventi non legati alla patologia oncologica possono essere schematicamente divise in tre categorie:

1. eventi fisiologici e abitudini di vita,
2. patologie non oncologiche,
3. cause iatrogene.

Eventi fisiologici e abitudini di vita

La Tabella 4 riassume le condizioni finora conosciute che possono provocare variazioni aspecifiche dei biomarcatori.

Patologie non oncologiche

La Tabella 5 riassume le principali patologie benigne che possono provocare variazioni spurie dei biomarcatori circolanti. È importante notare che spesso i marcatori sono elevati nelle patologie benigne dell'organo o del distretto per le quali si chiederebbe al marcatore di essere d'aiuto nella diagnosi differenziale verso il tumore. Questo limita di molto le possibilità di impiego dei marcatori come strumento diagnostico specialmente nel caso di neoplasie iniziali nelle quali, data la massa ancora limitata del tumore, i livelli del marcatore sono relativamente contenuti.

Tabella 3
Isoforme della hCG

Isoforma	Nomenclatura (IFCC)	PM approssimato (kDa)	SI (WHO)
Molecola intatta hCG	hCG	36,7	IRR 99/688
"Nicked" hCG	hCGn	36,7	IRR 99/642
Subunità β hCG libera	hCGβ	22,2	IRR 99/650
Subunità β "nicked" hCG	hCGβn	22,2	IRR 99/692
Frammento β core hCG	hCGβcf	12	IRR 99/708
Peptide carbossi-terminale di hCGβ	hCGβCTP	ND	ND
Subunità α hCG libera	hCGα	14,5	IRR 99/720
Subunità α hCG mutante	---	ND	ND
Subunità α hCG grande	---	16	ND
Eterogeneità ammino-terminale	---	Variabile	ND
Eterogeneità della parte carboidratica	---	Variabile	ND

IRR, International Reference Reagent; ND, non disponibile.

Tabella 4
Eventi fisiologici e abitudini di vita che possono causare un incremento delle concentrazioni dei marcatori

Marcatore	Condizione
AFP	Gravidanza
CA 125	Ciclo mestruale, gravidanza
CA 15.3	Gravidanza
CEA	Fumo, abuso di alcool
hCG	Gravidanza, uso di cannabis
PSA	Uso della bicicletta, attività fisica pesante, attività sessuale[a]
SCCA	Fumo, abuso di alcol
Tg	Fumo, gravidanza

[a] L'eiaculazione può avere effetti diversi sul PSA (aumento nei soggetti anziani, riduzione nei giovani).

Va peraltro ricordato che, accanto all'aspetto negativo (valori falsamente positivi da un punto di vista oncologico), esiste anche un potenziale ritorno positivo di questo fenomeno. Da più parti si sta infatti valutando la possibilità di usare alcuni marcatori come indicatori biochimici di danno d'organo o tessuto per il monitoraggio di malattie benigne (Tabella 6). Nell'endometriosi e nell'ipertrofia prostatica benigna i marcatori sono a volte utilizzati come marcatore d'organo per il monitoraggio della terapia (CA 125 nell'endometriosi) o per la previsione della probabilità delle complicanze (PSA nell'ipertrofia prostatica benigna).

Cause iatrogene

Tra le cause di variazione non dovute al tumore, quelle correlate a manovre o interventi diagnostici o terapeutici riassunte nella Tabella 7 meritano una disamina più dettagliata. Infatti, proprio i trattamenti finalizzati alla diagnosi e al controllo della neoplasia possono in alcuni casi provocare variazioni paradosse delle concentrazioni ematiche di alcuni marcatori. Questo comportamento, anche se si verifica in un numero limitato di pazienti, deve essere conosciuto per evitare interpretazioni fuorvianti del dato.

Manovre diagnostiche. È stato dimostrato che alcune manovre diagnostiche cruente o invasive sono causa di elevazioni aspecifiche di certi marcatori. Gli esempi più noti sono l'incremento di PSA dopo biopsia prostatica, che può essere consistente (fino a 50 volte il valore di partenza) e persistente (fino a 2 mesi dalla manovra bioptica).

Chirurgia. Ai fini di eventuali decisioni cliniche è essenziale che sia noto il problema degli incrementi del CA 125 secondari a interventi chirurgici sull'addome, conseguenza del traumatismo sul tessuto peritoneale. Tali incrementi si riscontrano in percentuali variabili di casi (dal 20% al 75% nei diversi studi in relazione alla patologia di partenza). La durata di questo fenomeno è variabile, con ritorno ai valori basali in un periodo che va da poche settimane a tre mesi. È stato riportato che l'incremento non è legato alla patologia preesistente, in quanto si osserva per interventi all'addome condotti sia per patologia benigna che maligna. In questo ultimo caso il fenomeno si verifica sia per neoplasie della sfera genitale che per neoplasie del tratto gastroenterico.

Chemioterapia citotossica. Durante il trattamento con chemioterapia citotossica di una neoplasia metastatica possono verificarsi incrementi paradossi di marcatori in pazienti che rispondono al trattamento. Questo fenomeno è segnalato nel carcinoma mammario metastatico per CA 15.3 e CEA e nel cancro del testicolo per AFP e hCG e sembra sia dovuto a citolisi neoplastica conseguente alla terapia antiblastica. Tale comportamento si verifica quando il prelievo viene effettuato durante o subito dopo la somministrazione dei farmaci citotossici e può essere facilmente evitato se il campionamento del sangue viene

Tabella 5
Malattie non oncologiche che possono causare un incremento delle concentrazioni dei marcatori

Marcatore	Condizione morbosa
AFP	Epatopatia cronica, cirrosi epatica
CA 125	Endometriosi, sierositi, polmonite, pancreatite acuta, epatopatia cronica, cirrosi epatica, epatite acuta, insufficienza cardiaca congenita, versamenti, malattie reumatiche e autoimmuni, insufficienza renale cronica, ittero
CA 15.3	Patologia mammaria benigna, epatopatia cronica, cirrosi epatica, epatite acuta, infezioni delle vie urinarie, malattie reumatiche e autoimmuni, ittero
CA 19.9	Pancreatite acuta, pancreatite cronica, colelitiasi, colecistite, ittero[a], malattie reumatiche e autoimmuni, diabete, nefropatia diabetica, epatopatia cronica, cirrosi epatica, epatite acuta, patologia benigna del polmone
CEA	Epatopatia cronica, cirrosi epatica, patologia benigna del polmone, insufficienza renale cronica, malattie respiratorie croniche, ittero
CgA	Patologia benigna del tratto gastroenterico, ipertensione essenziale, patologie cardiovascolari, patologia surrenalica
Ct	Iperparatiroidismo, tiroidite autoimmune, insufficienza renale cronica, morbo di Paget, tiroidite linfatica cronica
Inibina	Sindrome dell'ovaio policistico, mola idatiforme, sindrome di Down
LDH	Infarto del miocardio, infarto polmonare, epatite, cirrosi epatica, anemia (megaloblastica ed emolitica), lesioni muscolari, sindrome acuta respiratoria severa, infarto renale
NSE	Infarto cerebrale, insufficienza renale cronica
PSA	Ipertrofia prostatica benigna, prostatite, infarto prostatico, ritenzione urinaria acuta
SCCA	Psoriasi, insufficienza renale cronica
Tg	Malattie benigne della tiroide, insufficienza renale cronica

[a] *In caso di ittero si possono verificare incrementi delle concentrazioni del CA 19.9 dell'ordine di centinaia o migliaia di volte, compatibili quindi con una neoplasia avanzata.*

Tabella 6
Condizioni in cui i marcatori sono stati proposti come possibili indicatori per il monitoraggio di malattie non oncologiche

Malattia	Marcatore
Endometriosi	CA 125
Psoriasi	SCCA
Prostatite	PSA
Ipertrofia prostatica benigna	PSA
Fibrosi cistica	CA 19.9

effettuato prima di ogni nuovo ciclo di chemioterapia.

La chemioterapia può inoltre influire sulla funzionalità epatica e renale; pertanto, essa può causare incrementi non correlati al tumore di alcuni marcatori, verosimilmente interferendo con i meccanismi di metabolismo e di escrezione degli stessi. In pazienti con carcinoma del colon-retto sono stati segnalati valori falsamente elevati di CEA durante le prime 4-6 settimane di trattamento con regimi di chemioterapia anche precauzionale contenenti 5-fluorouracile o oxaliplatino.

Farmaci non antitumorali. Numerosi farmaci influenzano le concentrazioni circolanti dei marcatori. Si segnalano, per le possibili implicazioni cliniche, la finasteride e la dutasteride, i fattori di crescita per i granulociti e gli inibitori della pompa protonica.

La finasteride e la dutasteride, inibitori della α-reduttasi utilizzati nel trattamento dell'ipertrofia prostatica benigna, provocano una riduzione del PSA che, mediamente, per la finasteride si aggira intorno al 50% del valore di partenza. Numerosi Autori suggeriscono di misurare comunque il PSA durante il trattamento con finasteride e di moltiplicare per 2 il valore trovato, asserendo che tale valore "derivato" può essere considerato la "vera" concentrazione del PSA che il paziente avrebbe in assenza di trattamento. Altri studi mostrano tuttavia un'importante variabilità nell'entità dell'effetto della finasteride sul PSA, che può indurre variazioni variabili dal 20% al 80% rispetto al valore di partenza da caso a caso. Pertanto, non si consiglia di applicare la regola del "moltiplica per 2" e si consiglia invece, qualora si intenda valutare il PSA in corso di terapia con finasteride, di eseguire comunque una determinazione basale pre-terapia. Alcuni studi suggeriscono che, qualora il paziente venga seguito anche con il PSA durante il trattamento con finasteride, riduzioni del PSA inferiori al 50% dovrebbero indurre ad una sorveglianza più attenta.

Alcuni studi segnalano che l'utilizzo di fattori di crescita stimolanti i granulociti può causare incrementi spuri del CA 15.3 in donne in contemporaneo trattamento con chemioterapia. Tali possibili variazioni devono essere tenute presenti prima di valutare eventuali incrementi del marcatore come indicatori di non risposta.

Gli inibitori della pompa protonica inducono incrementi anche considerevoli delle concentrazioni circolati di CgA. Tali variazioni spurie devono essere

Tabella 7
Manovre diagnostiche o interventi terapeutici responsabili di possibili variazioni dei marcatori

Manovra o farmaco	Marcatore	Effetto
Esplorazione rettale	PSA	↑
Cateterismo vescicale	PSA	↑
Ospedalizzazione	PSA	↓
Cardiochirurgia con circolazione extracorporea	PSA	↑
Agobiopsia prostatica	PSA	↑↑
Finasteride o dutasteride	PSA	↓
Statine	PSA	↓
Allopurinolo	PSA	↑
Agobiopsia tiroidea	Tg	↑
Inibitori della pompa protonica	CgA	↑↑
Traumatismo chirurgico sul peritoneo	CA 125	↑
Fattori di crescita per i granulociti	CA 15.3	↑
Chemioterapia (farmaci diversi)	CEA, hCG, AFP	↑
Aspirina, alcol etilico, imipramina, levodopa, inibitori delle monoammino-ossidasi, eparina, isoniazide, metildopa, antidepressivi triciclici	5-HIAA	↓
Acetaminofene, caffeina, efedrina, diazepam, nicotina, gliceril-guaiacolato, fenobarbital	5-HIAA	↑

conosciute e considerate per evitare interpretazioni fuorvianti in pazienti affetti da neoplasie neuroendocrine, ma in contemporaneo trattamento con questi farmaci.

Meno importanti per il possibile impatto nel processo decisionale sono la riduzione del PSA conseguente al trattamento con le statine, riportata in numerosi recenti studi, o l'incremento del PSA dovuto al trattamento con allopurinolo.

Note per la pratica clinica

È importante ricordare che tutte le informazioni relative a variazioni dei marcatori non legate alla presenza o alla progressione di un tumore derivano da segnalazioni aneddotiche, spesso emerse all'interno di studi finalizzati ad altri obiettivi. È pertanto possibile che numerosi altri fattori (fisiologici, patologici o iatrogeni) possano provocare variazioni non specifiche di marcatori. Si consiglia quindi di:

1. *considerare (e ricercare con attenzione) eventuali variabili potenzialmente confondenti nella valutazione del risultato di un marcatore, specie se esso non è coerente con il quadro clinico;*
2. *eseguire il prelievo del campione di sangue per il dosaggio dei marcatori prima di ogni altra manovra diagnostica invasiva o cruenta;*
3. *ottenere sempre un valore basale del marcatore prima di qualsiasi intervento terapeutico;*
4. *eseguire la determinazione seriale di marcatori prima di ogni ciclo di terapia.*

Cause analitiche (valori spuri di marcatori per interferenze con il sistema analitico)

Le condizioni riportate nel paragrafo precedente provocano variazioni reali nelle concentrazioni misurabili dei marcatori circolanti attraverso meccanismi fisiologici o patologici di controllo della sintesi o del rilascio da parte dei tessuti che li producono.

Altri meccanismi sono invece responsabili di interferenze con i metodi di dosaggio tali da causare determinazioni inaccurate del marcatore. In altre parole, i valori misurati non esprimono la reale concentrazione del marcatore nel campione, ma rappresentano una misura fittizia. Spesso l'entità dell'interferenza è metodo dipendente. Le situazioni più comuni sono riportate nella Tabella 8.

Tabella 8
Cause analitiche di variazioni spurie di marcatori

Causa	Marcatore
Autoanticorpi anti-tireoglobulina	Tg
Somministrazione parenterale di anticorpi monoclonali	CEA, CA 125 (e altri analiti determinati con anticorpi monoclonali)
Anticorpi eterofili	Marcatori diversi
Effetto gancio (concentrazioni molto elevate di antigene)	Marcatori diversi

Autoanticorpi antitireoglobulina e dosaggio della tireoglobulina

La presenza di AbTg può interferire nella determinazione della Tg. L'interferenza è diversa a seconda del sistema di dosaggio utilizzato. Nei metodi immunometrici competitivi la presenza nel campione di AbTg causa generalmente una sovrastima dei livelli di Tg, anche se sono stati descritti effetti di sottostima. Nei metodi immunometrici non competitivi, l'interferenza da AbTg è in genere causa di sottostima dell'antigene.

L'entità dell'interferenza è difficilmente prevedibile. Ciò è dovuto a diversi fattori metodologici e biologici, fra i quali è critica la diversa specificità degli autoanticorpi per gli epitopi presenti nelle sei regioni antigeniche identificate sulla molecola di Tg. Nessuno dei metodi disponibili è comunque esente dal rischio di interferenze da AbTg, che presentano fra l'altro una spiccata variabilità individuale. Nemmeno utilizzando metodi che usano anticorpi specifici per epitopi della Tg che non sembrerebbero coinvolti nella formazione di autoanticorpi, si evita il rischio di interferenze.

Gli AbTg possono dare indicazioni cliniche? Le concentrazioni ematiche preoperatorie di AbTg non hanno dimostrato relazioni con le caratteristiche cliniche o patologiche della neoplasia. Tuttavia, la determinazione dei livelli di AbTg su campioni seriati nel "follow-up" postoperatorio può dare informazioni cliniche, in quanto valori persistenti o in aumento di AbTg sono associati con una maggior probabilità di malattia attiva (residua o progressiva). Gli AbTg possono pertanto essere usati come marcatore surrogato nei casi in cui l'interferenza da essi prodotta impedisca un affidabile impiego del dosaggio della Tg.

Il problema degli anticorpi eterofili

Gli anticorpi eterofili reagiscono con epitopi diversi, scarsamente definiti, con bassa affinità e attività multi-specifica. In alcuni casi si possono evidenziare delle specificità definite come la produzione di anticorpi umani anti-immunoglobulina murina conseguente alla somministrazione di anticorpi monoclonali murini per tecniche diagnostiche (immunoscintigrafia) o per immunoterapia; tali procedure possono infatti indurre una reazione immune verso gli anticorpi iniettati. La presenza nel sangue di questi anticorpi comporta il rischio di risultati aberranti quando vengono eseguiti esami *in vitro* basati su anticorpi monoclonali. Questa interferenza è già stata descritta per CEA, CA 125, hCG e TSH, ma può verificarsi anche per altri analiti che vengono dosati impiegando anticorpi monoclonali. La presenza di anticorpi anti-immunoglobulina murina può essere responsabile di risultati falsi positivi e falsi negativi. Ciò è dovuto al fatto che la reazione immune genera anticorpi mirati contro diverse parti della immunoglobulina murina, sia cioè contro determinanti isotipici e allotipici che contro determinanti idiotipici.

Gli anticorpi anti-isotipo o allotipo sono orientati verso determinanti situati sul frammento FC o sui frammenti Fab, ma lontano dal sito anticorpale. Questi anticorpi, se presenti nel sangue, formano un ponte fra i due anticorpi del saggio (di cattura e di segnale) simulando la presenza di antigene nel campione. Con tale meccanismo possono essere causa di valori falsamente positivi. Non essendo diretti al sito anticorpale, possono inoltre creare interferenze crociate (ad es., anticorpi monoclonali murini anti-CA 125 possono indurre anticorpi umani contro immunoglobuline murine che crossreagiscono sia con il saggio per misurare il CA 125 che con quelli per misurare il CEA o il TSH). Questi anticorpi vengono propriamente chiamati "human anti-mouse monoclonal antibodies" (HAMA). Per ridurre questo tipo di interferenza sono state proposte numerose soluzioni tecniche, fra le quali la più utilizzata è l'aggiunta di siero o di immunoglobuline murine ai reagenti o al campione in esame. Va comunque considerato che non sempre l'addizione di siero o di immunoglobuline di topo è sufficiente ad eliminare l'interferenza dovuta agli HAMA.

Gli anticorpi anti-idiotipo sono invece diretti contro determinanti localizzati nella zona ipervariabile della immunoglobulina. Quando gli anticorpi si legano *in vitro* all'anticorpo monoclonale murino utilizzato nel dosaggio ne deformano il sito di legame e, rendendo difficoltoso il riconoscimento dell'antigene, possono essere causa di risultati falsi negativi. In questo caso, sembra che l'uso di metodi "a due passaggi" (incubazione siero-primo anticorpo, lavaggio del siero in eccesso, seconda incubazione con l'anticorpo tracciante) riduca le interferenze e fornisca risultati affidabili.

La Tabella 9 riassume le interferenze dovute a HAMA. Marginalmente, va segnalato che quantità misurabili di HAMA possono essere rilevate in soggetti non trattati con anticorpi monoclonali. Il riscontro di HAMA non indotti in concentrazioni sufficienti da causare falsi positivi è molto infrequente nei soggetti sani e nei

Tabella 9
Interferenze dovute a HAMA nei dosaggi che usano anticorpi monoclonali

Tipo di interferenza	Meccanismo	Determinante sul monoclonale	Specificità della interferenza	Rimedio
Falso positivo	Ponte fra i due monoclonali del kit	Isotipico o allotipico	Possibili interferenze crociate con altri monoclonali	Aggiunta al campione o ai reattivi di siero o immunoglobuline murine
Falso negativo	Interferenza sterica con il sito di legame	Idiotipico	Specifica per il monoclonale iniettato	Utilizzo di dosaggi con due incubazioni

pazienti affetti da neoplasia (2-3% dei casi), mentre è sensibilmente più frequente (25% dei casi) in pazienti affetti da malattie reumatiche con fattore reumatoide positivo. Questo va tenuto in considerazione nell'interpretazione di valori di marcatori positivi in disaccordo con la situazione clinica. In questi casi il dosaggio degli HAMA nel campione può chiarire il quadro.

Note per la pratica clinica

Nel caso di pazienti monitorizzati per malattie oncologiche nei quali si ritengano opportuni interventi diagnostici o terapeutici con anticorpi monoclonali è necessario:

1. *considerare nel bilancio delle scelte diagnostico-terapeutiche la probabile eventualità di perdere l'informazione fornita dal marcatore per un periodo che va da pochi mesi a oltre un anno dall'ultima somministrazione di anticorpi monoclonali;*
2. *utilizzare per il dosaggio dei marcatori tumorali kit protetti per gli HAMA (con reagenti addizionati di immunoglobuline o siero murino) e con architettura a due incubazioni;*
3. *dosare il tasso di HAMA o conservare il sangue per questa indagine. Infatti, il grado di interferenza (falsi positivi) è direttamente proporzionale alla concentrazione di HAMA nel campione.*

La presenza di HAMA va sospettata e ricercata anche in pazienti non sottoposti a somministrazione diagnostica o terapeutica di anticorpi monoclonali, qualora si riscontrino livelli circolanti elevati di uno o più marcatori senza apparenti giustificazioni cliniche.

L'effetto gancio: un'importante causa di falsi negativi

L'effetto gancio descrive un comportamento paradosso per cui in campioni con concentrazioni estremamente elevate di antigene vengono misurate concentrazioni falsamente basse dello stesso. Il fenomeno si può verificare in metodi di dosaggio immunometrico tipo *"sandwich"* ed è dovuto a meccanismi complessi non ancora del tutto chiariti.

L'effetto gancio è meno probabile quando si adottino metodi "a due passaggi" che prevedono un'incubazione del siero con il primo anticorpo seguito da una fase di lavaggio prima dell'aggiunta del secondo anticorpo, che dovrebbe eliminare o ridurre significativamente l'eccesso di antigene presente nel campione. Nemmeno l'adozione di metodiche di questo tipo esclude, tuttavia, completamente il rischio che il fenomeno si possa verificare.

Qualora il valore di un marcatore risulti incongruente perché troppo elevato oppure troppo basso rispetto alla situazione clinica, si dovrebbero sospettare interferenze di tipo analitico. Infatti, un valore molto basso potrebbe essere dovuto all'effetto gancio, mentre un valore falsamente positivo potrebbe essere il risultato dell'interferenza da anticorpi eterofili. In questi casi è opportuno ridosare il campione dopo diluizione con una matrice adeguata. Se l'interferenza è dovuta all'effetto gancio, dopo la diluizione si nota un incremento anziché un'ulteriore riduzione dei livelli di antigene; nel caso della presenza di anticorpi eterofili il valore della determinazione rientra nella norma.

Note per la pratica clinica

Le concentrazioni sieriche di un marcatore sono soggette a numerose variabili. Pertanto, per produrre un referto valutato correttamente in relazione alla plausibilità clinica è necessario:

1. *conoscere la condizione morbosa indagata;*
2. *conoscere le terapie in corso o pregresse;*
3. *conoscere l'esistenza di possibili cause non neoplastiche di incremento delle concentrazioni ematiche del marcatore;*
4. *conoscere i fattori analitici che possono essere causa di valori spuri;*
5. *confermare sempre con un successivo prelievo un valore considerato patologico prima di eventuali decisioni cliniche.*