Valutazione del "risk of ovarian malignancy algorithm" (ROMA) nella stima del rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio in donne con massa pelvica

Martina Montagnana[1], Elisa Danese[1], Orazio Ruzzenente[1], Silvia Giudici[2], Matteo Gelati[1], Gian Luca Salvagno[1], Massimo Franchi[2], Giuseppe Lippi[3], Gian Cesare Guidi[1]

[1]Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona
[2]Sezione di Ostetricia e Ginecologia, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona
[3]U.O. Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma

Questo lavoro è stato in parte presentato al 42° Congresso Nazionale SIBioC, 5-8 ottobre 2010, Roma, sotto forma di poster (Biochim Clin 2010;34:496), ricevendo, nella persona del suo primo autore (M. Montagnana), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

The "risk of ovarian malignancy algorithm" for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass. The predictive model "risk of ovarian malignancy algorithm" (ROMA) utilizes the combination of human epididymis protein 4 (HE4) and carbohydrate antigen 125 (CA125) values to assess the risk of epithelial ovarian cancer (EOC) in women with a pelvic mass. The aim of our study was to evaluate the performance of this model in comparison to CA125 and HE4 used alone. Preoperative serum concentrations of HE4 and CA125 were measured in 104 women diagnosed with pelvic mass (55 EOC and 49 benign cases) and scheduled to have surgery, along with 49 controls. Separate logistic regression ROMA for pre-menopausal and post-menopausal women were used to categorize patients into low- and high-risk groups for EOC. The sensitivity, specificity, and the area under the ROC curve (AUC) were calculated for HE4, CA125 and ROMA for the diagnosis of EOC. The median CA125 and HE4 serum concentrations were significantly higher in EOC patients than in both healthy females and those with a benign mass. The pre-menopausal group included 36 benign cases [29 of which were classified by ROMA as low-risk, with a specificity of 80.6%, 95% confidence interval (CI): 64.0-91.8%] and 15 EOC (8 of which were classified by ROMA as high-risk, with a sensitivity of 53.3%, 95%CI: 26.6-78.7%). The post-menopausal group included 13 benign cases (11 of which were classified by ROMA as low-risk, with a specificity of 84.6%, 95%CI: 54.6-98.0%) and 40 EOC (33 of which were classified by ROMA as high-risk, with a sensitivity of 82.5%, 95%CI: 67.2-92.7%). In the pre-menopausal group, the AUC was 0.64 (95%CI: 0.44-0.83) for CA125, 0.77 (95%CI: 0.62-0.92) for HE4, and 0.77 (95%CI: 0.63-0.92) for ROMA. In the post-menopausal group, the AUC was 0.84 (95%CI: 0.73-0.94) for CA125, 0.94 (95%CI: 0.88-0.99) for HE4, and 0.92 (95%CI: 0.85-0.99) for ROMA. In conclusion, the ROMA showed good diagnostic performance for the detection of EOC in post-menopausal women, but not in pre-menopausal women. However, the ROMA did not show better performance than HE4 biomarker alone.

INTRODUZIONE

Il tumore epiteliale maligno dell'ovaio costituisce circa il 90% dei tumori ovarici e continua a rappresentare una delle principali cause di morte per neoplasia ginecologica (1). Una delle principali sfide nella pratica clinica ginecologica è costituita dalla diagnosi differenziale delle masse pelviche (2). In questo contesto, l'obiettivo del ginecologo è riuscire a differenziare una massa ovarica benigna da una maligna, che necessita di un trattamento chirurgico e/o chemioterapico più aggressivo.

Nelle donne con patologia maligna, la mortalità è strettamente correlata allo stadio di malattia alla diagnosi: se la diagnosi viene posta in stadio iniziale, la percentuale di sopravvivenza a 5 anni supera il 70%, ma scende drasticamente se la diagnosi viene posta in stadio avanzato (3). È quindi necessario porre diagnosi di carcinoma ovarico il più precocemente possibile, in modo da mettere in atto le procedure terapeutiche più idonee quando risultano ancora in grado di modificare la

Corrispondenza a: Martina Montagnana, Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Piazzale Scuro 10, 37134 Verona. Tel. 0458126698, Fax: 0458027484, E-mail martina.montagnana@univr.it

Ricevuto: 19.11.2010 Revisionato: 25.11.2010 Accettato: 25.11.2010

prognosi delle pazienti. Ad oggi, tuttavia, in quasi il 70% delle pazienti la diagnosi viene posta in stadio III. L'approccio diagnostico basato sulla storia clinica e sull'esame fisico della paziente, sugli esami strumentali e sui dosaggi di laboratorio non fornisce risultati ottimali. La sintomatologia, infatti, è spesso vaga e sovrapponibile a quella delle patologie benigne e il CA125, il biomarcatore più utilizzato, non mostra un'adeguata efficacia diagnostica. Nella maggior parte dei casi la diagnosi definitiva si basa quindi sull'esecuzione di una laparoscopia o di una laparotomia e sull'esame istologico del tessuto prelevato.

Allo scopo di predire la malignità della massa pelvica, 20 anni fa è stato proposto da Jacobs et al. (4) un modello diagnostico, l'indice del rischio di malignità (RMI), basato sulla valutazione combinata di indagine ecografica, stato menopausale e concentrazioni di CA125. Tuttavia, questo strumento si è dimostrato efficace solamente nelle donne in menopausa. Il problema è probabilmente imputabile alla ridotta accuratezza diagnostica del CA125 che, soprattutto nelle donne in premenopausa, aumenta in molte patologie benigne ad elevata incidenza nelle donne giovani, come ad esempio l'endometriosi (5, 6).

Recentemente, è stato introdotto nella pratica clinica un nuovo marcatore, l'"human epididymis protein 4" (HE4) (7, 8). In un lavoro pubblicato nel 2009 abbiamo dimostrato per questo marcatore un'efficienza diagnostica superiore a quella del CA125, sia in termini di sensibilità che di specificità nel predire il rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio in donne con massa pelvica (9). Inoltre, Moore et al. (10, 11) hanno dimostrato che il "risk of ovarian malignancy algorithm" (ROMA), basato sulla combinazione di HE4, CA125 e dello stato menopausale della paziente, mostrava un'efficienza diagnostica migliore rispetto al RMI nel predire il rischio di malignità della massa pelvica.

Gli obiettivi del nostro studio sono stati inizialmente di valutare le concentrazioni di HE4 e CA125 in donne affette da patologie annessiali benigne e maligne e, in secondo luogo, di verificare se la combinazione dei valori dei due marcatori e dello stato menopausale (ROMA) presenti una maggior efficienza diagnostica rispetto all'utilizzo del HE4 da solo.

MATERIALI E METODI

Tra Ottobre 2007 e Febbraio 2010 sono state reclutate presso la Sezione di Ostetricia e Ginecologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona 104 pazienti con diagnosi di massa pelvica annessiale sulla base dell'esame ginecologico ed ecografico, sottoposte successivamente ad intervento chirurgico di rimozione della massa. La diagnosi è stata confermata dall'esame istopatologico del pezzo operatorio (12). La stadiazione dei tumori ovarici epiteliali è stata eseguita sulla base dei criteri proposti dall'"International Federation of Gynecology and Obstetrics" (FIGO) (13).

Tra le 104 pazienti arruolate (51 in premenopausa e 53 in postmenopausa), 55 pazienti (56,9±14,4 anni) erano affette da tumore epiteliale maligno (11 in stadio I, 4 in stadio II, 33 in stadio III e 7 in stadio IV) e presentavano il seguente istotipo: sieroso (69,1%), endometrioide (16,4%), a cellule chiare (3,6%) e mucinoso (10,9%). Le 49 pazienti (42,0±15,5 anni) con patologia ovarica benigna erano affette da cistoadenomi sierici o mucinosi [10 (20,4%)], teratoma cistico [6 (12,2%)], fibroma [5 (10,2%)], cisti semplice dell'ovaio [7 (14,3%)] ed endometrioma ovarico [21 (42,9%)]. Nello studio sono state inoltre incluse 49 donne apparentemente sane (51,2±20,7 anni, 22 in pre- e 27 in post-menopausa), reclutate tra il personale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona. Lo stato menopausale delle donne è stato definito sulla base di dati anamnestici: assenza del ciclo da almeno un anno al momento dell'inclusione nello studio oppure età superiore a 55 anni. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dipartimentale e tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato.

I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti dalle pazienti a digiuno la mattina dell'intervento chirurgico in provette senza coagulante (Vacutainer BD) e centrifugati a 1500xg per 10 min a temperatura ambiente. Il siero così ottenuto è stato congelato e mantenuto a –80 °C fino al momento dell'analisi.

Le concentrazioni sieriche di CA125 sono state determinate sull'analizzatore Triturus EIA (Grifols) con il saggio immunoenzimatico CanAg CA125, che utilizza gli anticorpi monoclonali murini Ov197 e Ov185. I CV intra- e inter-dosaggio per questo metodo sono compresi tra 2,9%-4,4% e 3,1%-4,0%, rispettivamente. Il limite di rivelabilità riportato è 1,5 U/mL. Le concentrazioni sieriche di HE4 sono state misurate con il kit EIA sviluppato da Fujirebio Diagnostic, Inc. sullo strumento Triturus EIA. Il metodo immunoenzimatico è un saggio eterogeneo in fase solida non competitivo, che usa due anticorpi monoclonali murini, 2H5 e 3D8, diretti contro due epitopi nella regione C-WFDC di HE4. Il CV totale risultava <10%. Il limite di rilevabilità del saggio HE4 EIA, come riportato dalla ditta, risultava 2,5 pmol/L. Per discriminare tra malattia benigna e carcinoma ovarico nelle pazienti con massa pelvica, era selezionato il valore corrispondente al 95° percentile della nostra popolazione di controllo (74,2 pmol/L). Per il CA125 era utilizzato il valore di 35 U/mL, largamente accettato in letteratura.

Le pazienti con massa pelvica sono state classificate ad alto o basso rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio applicando le concentrazioni sieriche dei due biomarcatori CA125 e HE4 al ROMA, come riportato nella Tabella 1 (10). Come raccomandato, sono stati utilizzati i livelli decisionali di ROMA $\geq$12,5% e $\geq$14,4%, rispettivamente in donne in pre- e post-menopausa, per identificare soggetti ad alto rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio.

I risultati sono stati riportati come mediana e intervallo valore minimo-valore massimo. Il confronto tra gruppi è stato eseguito mediante esami statistici non parametrici Mann-Whitney e Kruskall-Wallis, mentre la correlazione tra le diverse variabili è stata valutata

Tabella 1
Formule utilizzate per il calcolo del "risk of varian malignancy algorithim" (ROMA)

Donne in pre-menopausa: PI = -12,0 + 2,38*LN[HE4] + 0,0626*LN[CA125]
Donne in post-menopausa: PI = -8,09 + 1,04*LN[HE4] + 0,732*LN[CA125]
Probabilità predittiva (ROMA): exp(PI)/[1 + exp(PI)]*100

PI, indice predittivo; LN, logaritmo naturale; exp, esponenziale.

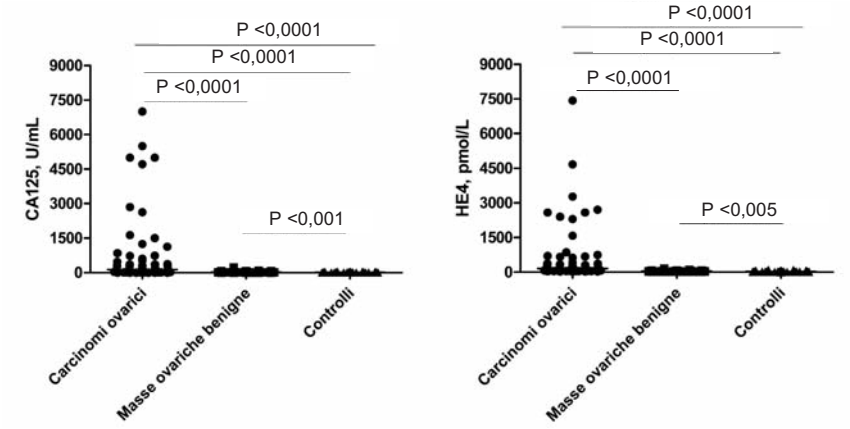


Figura 1
Distribuzione delle concentrazioni sieriche di CA125 e HE4 nei diversi gruppi arruolati per lo studio.

mediante il test di Spearman. L'efficienza diagnostica dei due marcatori CA125 ed HE4 e del modello ROMA è stata valutata mediante analisi delle curve ROC e dell'area sottesa alle stesse (AUC). Il livello di significatività statistica fissato era P <0,05. Tutte le analisi sono state eseguite usando il programma Graphpad Prism (Graphpad Software Inc.).

RISULTATI

Le distribuzioni dei valori di CA125 e HE4 nei diversi gruppi sono riportate nella Figura 1. Nelle pazienti con tumore dell'ovaio le concentrazioni sieriche di CA125 e HE4 risultavano più elevate sia rispetto ai controlli (CA125: 129,0 vs. 9,7 U/mL, P <0,0001; HE4: 150,0 vs. 34,9 pmol/L, P <0,0001) che rispetto alle pazienti con patologia benigna (CA125: 129,0 vs. 17,8 U/mL, P <0,0001; HE4: 150,0 vs. 42,3 pmol/L, P <0,0001). Nei controlli sani, le concentrazioni di HE4 non correlavano con l'età e non erano osservate differenze significative tra donne in pre- e in post-menopausa (34,1 vs. 37,0 pmol/L, P=0,21). I valori di HE4 e CA125 negli stadi avanzati di tumore ovarico epiteliale (FIGO III-IV) risultavano più elevati rispetto a quelli osservati negli stadi iniziali (FIGO I-II) (CA125: 324,8 vs. 18,0 U/mL, P <0,0005; HE4: 266,9 vs. 74,9 pmol/L, P <0,005). Nelle donne con tumore ovarico (n=55), ma non in quelle affette da patologia benigna, CA125 e HE4 mostravano una correlazione positiva (r=0,70, P <0,0001).

Nella Tabella 2 è riportata la valutazione del rischio di tumore epiteliale mediante utilizzo di CA125, HE4 e ROMA nella casistica di pazienti studiate. Il gruppo in pre-menopausa includeva 36 pazienti con patologia benigna (29 delle quali classificate a basso rischio – specificità 80,6%, intervallo di confidenza al 95% (95%CI): 64,0-91,8%) e 15 affette da tumore ovarico epiteliale (8 delle quali classificate ad alto rischio – sensibilità 53,3%, 95%CI: 26,6-78,7%). Il gruppo in post-menopausa includeva 13 casi benigni (11 dei quali classificati a basso rischio – specificità 84,6%, 95%CI: 54,6-98,0%) e 40 tumori epiteliali (33 classificati ad alto rischio – sensibilità 82,5%, 95%CI: 67,2-92,7%) (Tabella 3). La Tabella 4 riporta l'efficienza diagnostica dei parametri valutati nella definizione del rischio di tumore epiteliali maligno dell'ovaio.

DISCUSSIONE

Dal momento che il riscontro durante una visita ginecologica di una massa annessiale è piuttosto frequente tra le donne in peri- e post-menopausa, una diagnosi differenziale accurata tra natura benigna o maligna della massa diventa fondamentale (14). Segni e sintomi possono essere assenti negli stadi iniziali di neoplasia ovarica maligna, mentre in fase avanzata sono spesso aspecifici (dispepsia, gonfiore, senso di sazietà precoce, lombalgia) (15,16). Di conseguenza, in quasi il 70% delle pazienti la diagnosi viene posta in fase avanzata di malattia, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 30% (17). Inoltre, è più probabile che una massa ovarica risulti di origine maligna in pazienti più anziane e benigna in donne in pre-menopausa. È stato infatti dimostrato che nelle donne in pre-menopausa risultano di natura maligna circa il 24% dei casi, mentre questa percentuale sale al 60% nelle donne in menopausa (18-20).

Tabella 2
CA125, HE4 e ROMA per l'individuazione del rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio

	Basso rischio			Alto rischio		
	CA125 <35 U/mL	HE4 <74,2 pmol/L	ROMA <12,5% o <14,4%	CA125 ≥35 U/mL	HE4 ≥74,2 pmol/L	ROMA ≥12,5% o ≥14,4%
Controlli	45/49 (91,8%)	46/49 (93,9%)	45/49 (91,8%)	4/49 (8,2%)	3/49 (6,1%)	4/49 (8,2%)
Pazienti con masse ovariche benigne	38/49 (77,6%)	46/49 (93,9%)	40/49 (81,6%)	11/49 (22,4%)	3/49 (6,1%)	9/49 (18,4%)
Pazienti con tumore epiteliale maligno dell'ovaio	16/55 (29,1%)	13/55 (23,6%)	14/55 (25,5%)	39/55 (70,9%)	42/55 (76,4%)	41/55 (74,5%)

Tabella 3
Accuratezza del ROMA nella valutazione del rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio: analisi dei dati per gruppi separati di pazienti in pre- e post-menopausa

Pre-menopausa	Basso rischio (ROMA <12,5%)	Alto rischio (ROMA ≥12,5%)
Controlli	22/22 (100%)	0/22 (0%)
Pazienti con masse ovariche benigne	29/36 (80,6%)	7/36 (19,4%)
Pazienti con tumore epiteliale maligno dell'ovaio	7/15 (46,7%)	8/15 (53,3%)
Post-menopausa	Basso rischio (ROMA <14,4%)	Alto rischio (ROMA ≥14,4%)
Controlli	23/27 (85,2%)	4/27 (14,8%)
Pazienti con masse ovariche benigne	11/13 (84,6%)	2/13 (15,4%)
Pazienti con tumore epiteliale maligno dell'ovaio	7/40 (17,5%)	33/40 (82,5%)

Tabella 4
Efficacia diagnostica di HE4, CA125 e ROMA, espressa come area sotto la curva (AUC) ROC nella definizione del rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio in donne in pre- e post-menopausa con massa pelvica

Pazienti in pre-menopausa	AUC (95%CI)
CA125	0,64 (0,44-0,83)
HE4	0,77 (0,62-0,92)
ROMA	0,77 (0,63-0,92)
Pazienti in post-menopausa	
CA125	0,84 (0,73-0,94)
HE4	0,94 (0,88-0,99)
ROMA	0,92 (0,85-0,99)

CI, intervallo di confidenza.

L'approccio diagnostico nelle donne con una massa ovarica si basa attualmente su tecniche laparoscopiche o laparotomiche (21). In effetti, le metodiche di screening a disposizione, quali l'esame pelvico, il dosaggio del CA125, l'ecografia transvaginale o la combinazione di questi strumenti diagnostici, non consentono di porre una diagnosi definitiva di carcinoma ovarico, ma possono solo suggerirne la presenza. Oltre ai costi elevati e alla natura invasiva della laparoscopia e della laparotomia, una questione importante è che un'esplorazione chirurgica inadeguata, effettuata da un chirurgo giovane o inesperto, può influenzare negativamente la sopravvivenza della paziente (22, 23), mentre d'altra parte l'identificazione in fase preoperatoria delle pazienti ad alto rischio di tumore epiteliale consentirebbe una migliore preparazione preoperatoria o l'invio delle pazienti ad un centro specializzato. Per tutti questi motivi, negli ultimi anni molti sforzi sono stati fatti allo scopo di sviluppare un metodo pratico e possibilmente economico per stimare il rischio di cancro ovarico in pazienti con massa pelvica (24).

Studi recenti hanno proposto l'utilizzo di pannelli di biomarcatori circolanti nella diagnosi differenziale di una massa pelvica, suggerendo lo sviluppo di modelli diagnostici caratterizzati da più variabili (25-29). Tuttavia, a causa dei costi elevati e della frequente mancanza di risorse umane e tecniche, un approccio diagnostico "multimarker" non è ancora applicabile alla pratica clinica. Un dato interessante, che emerge dai risultati presentati nello studio di Nolen et al. (26), è che, tra i 65 biomarcatori sierici di cui è stata valutata l'efficienza diagnostica, la combinazione di CA125/HE4 risulta essere la più efficace nel definire il rischio di carcinoma ovarico di una massa annessiale.

Sia in questo che in un precedente studio (9) abbiamo dimostrato che HE4 è un indicatore utile nell'approccio diagnostico alle pazienti affette da masse pelviche. In particolare, nella nostra popolazione, abbiamo ottenuto una sensibilità del 76,4% per HE4 e del 70,9% per CA125 nel distinguere una malattia benigna da una forma maligna. È stato precedentemente osservato che fino al 20% dei tumori ovarici, soprattutto i tumori mulleriani a cellule chiare e mucinosi, non esprimono l'antigene CA125 (30).

È stato precedentemente dimostrato che il dosaggio sierico del HE4 mostra dei vantaggi rispetto al CA125 in

termini di specificità, in quanto HE4 risulta aumentato meno frequentemente nelle pazienti con malattie ovariche benigne, quali le cisti endometriosiche (31, 32). Per quanto riguarda questo aspetto, in questo studio abbiamo ottenuto per HE4 e CA125 valori di specificità rispettivamente del 93,9% e del 77,6%. Inoltre, l'efficienza diagnostica del HE4, valutata per mezzo delle curve ROC, appariva superiore a quella del CA125, sia nelle donne in pre- (AUC: 0,77 vs. 0,64) che in quelle in post-menopausa (AUC: 0,94 vs. 0,84), anche se i rispettivi 95%CI tendevano a sovrapporsi, indicando una mancanza di significatività statistica nelle differenze.

Per quanto riguarda il modello predittivo ROMA, abbiamo ottenuto valori di sensibilità e specificità tendenzialmente superiori a quelli osservati per il CA125 (74,5% vs. 70,9% e 81,6% vs. 77,6%), ma inferiori a quelli del HE4 utilizzato da solo (74,5% vs. 76,4% e 81,6% vs. 93,9%). La sensibilità osservata nel nostro studio (74,5%) è risultata inferiore a quella precedentemente riportata da Moore et al. (93,8%) (10). Questa differenza potrebbe essere imputabile a diversi motivi. In primo luogo, il numero di pazienti affetti da neoplasia inclusi nel nostro studio (n=55) è inferiore rispetto a quello di Moore et al. (n=129). Pertanto, il numero più limitato di pazienti inclusi nella nostra indagine potrebbe avere inficiato l'accuratezza dei risultati. Inoltre, dal momento che abbiamo usato una metodica (EIA) diversa rispetto a quella impiegata da Moore et al. (chemiluminescenza potenziata su piattaforma automatizzata Architect Abbott), con un differente livello decisionale di ROMA, i risultati potrebbero essere difficilmente confrontabili. Infine, è anche presente una differenza tra le due casistiche nel numero di soggetti in post-menopausa. Nello studio di Moore et al. solo il 13,9% delle donne con tumore ovarico epiteliale erano in stato di pre-menopausa, mentre la percentuale risulta più elevata nella nostra popolazione (27,3%). Questo potrebbe essere importante perché le prestazioni del ROMA risultano notevolmente diverse nelle donne in pre- e post-menopausa, con una sensibilità abbastanza elevata (82,5%) in post-menopausa, ma sostanzialmente ridotta (53,3%) in pre-menopausa.

In assoluto, la prestazione diagnostica del ROMA, valutata mediante le curve ROC, non sembra migliore di quella del HE4 usato da solo. Questo porterebbe ad affermare che la misura del CA125 per la stima del rischio di tumore ovarico potrebbe non essere necessaria, dal momento che non sembra aggiungere informazioni significative. Un altro limite del modello ROMA è che, ad oggi, è stato validato per il dosaggio del HE4 soltanto in combinazione a due saggi per la determinazione del CA125 (Abbott Architect e CanAg), con due diversi livelli decisionali raccomandati, ma non in combinazione con altri saggi di seconda generazione con prestazioni analitiche altrettanto robuste (33). Infine, dal momento che ad oggi nessun altro studio, tranne quelli del gruppo di Moore (10, 11), ha valutato l'efficienza del ROMA per la stima del rischio di tumore epiteliale maligno dell'ovaio, prima della sua applicazione nella pratica clinica altri studi dovrebbero essere condotti al fine di giudicare correttamente la validità di questo strumento (34).

BIBLIOGRAFIA

1. Ho SM. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. Reprod Biol Endocrinol 2003;1:73.
2. Nolen B, Velikokhatnaya L, Marrangoni A, et al. Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases in patients with an adnexal mass. Gynecol Oncol 2010;117:440-5.
3. Dunleavey R. Importance of early diagnosis in managing ovarian cancer. Nurs Times 2006;102:28-9.
4. Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, et al. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. Br J Obstet Gynaecol 1990;97:922-9.
5. van den Akker PA, Aalders AL, Snijders MP, et al. Evaluation of the Risk of Malignancy Index in daily clinical management of adnexal masses. Gynecol Oncol 2010;116:384-8.
6. Strigini FA, Gadducci A, Del Bravo B, et al. Differential diagnosis of adnexal masses with transvaginal sonography, color flow imaging, and serum CA 125 assay in pre- and postmenopausal women. Gynecol Oncol 1996;61:68-72.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. Cancer Res 2005;65:2162-9.
8. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. Cancer Res 2003;63:3695-700.
9. Montagnana M, Lippi G, Ruzzenente O, et al. The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass. J Clin Lab Anal 2009;23:331-5.
10. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. Gynecol Oncol 2009;112:40-6.
11. Moore RG, Jabre-Raughley M, Brown AK, et al. Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. Am J Obstet Gynecol 2010;203:228.e1-6.
12. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the results of treatment in gynecological cancer. Int J Gynaecol Obstet 2006;95:S161-92.
13. Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. Br J Obstet Gynaecol 1989;96:889-92.
14. Pérez-López FR, Chedraui P, Troyano-Luque JM. Peri- and post-menopausal incidental adnexal masses and the risk of sporadic ovarian malignancy: new insights and clinical management. Gynecol Endocrinol 2010;26:631-43.
15. Kirwan JMJ, Tincello DG, Herod JJO, et al. Effect of delays in primary care referral on survival of women with epithelial ovarian cancer: retrospective audit. Br Med J 2002;324:148-51.
16. Carnino F, Iskra L, Cottini M. Carcinoma of the ovary: initial symptoms and diagnostic problems. New Trends Gynaecol Obstet 1985;1:395-401.
17. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. Semin Surg Oncol 2000;19:3-10.
18. Gillis CR, Hole DJ, Still RM, et al. Medical audit, cancer registration, and survival in ovarian cancer. Lancet 1991;337:611-2.

19. Finkler NJ, Benacerraf B, Lavin PT, et al. Comparison of serum CA 125, clinical impression and ultrasound in the preoperative evaluation of ovarian masses. Obstet Gynecol 1988;72:659-64.
20. Vasilev SA, Schlaerth JB, Campeau J, et al. Serum CA 125 levels in preoperative evaluation of pelvic masses. Obstet Gynecol 1988;71:751-6.
21. Partridge EE, Barnes MN. Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. CA Cancer J Clin 1999;49:297-320.
22. Eisenkop SM, Spirtos NM, Montag TW, et al. The impact of subspeciality on the management of advanced ovarian cancer. Gynecol Oncol 1992;47:203-9.
23. Kehoe S, Powell J, Wilson S, et al. The influence of the operating surgeons specialisation on patient survival in ovarian carcinoma. Int J Cancer 1994;70:1014-7.
24. Davis AP, Jacobs I, Wools R, et al. The adenxal mass: benign or malignant? Evaluation of a risk of malignancy index. Br J Obstet Gynaecol 1993;100:927-31.
25. Bertenshaw GP, Yip P, Seshaiah P, et al. Multianalyte profiling of serum antigens and autoimmune and infectious disease molecules to identify biomarkers dysregulated in epithelial ovarian cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17:2872-81.
26. Nolen B, Marrangoni A, Velikokhatnaya L, et al. A serum based analysis of ovarian epithelial tumorigenesis. Gynecol Oncol 2009;112:47-54.
27. Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. J Clin Oncol 2010;28:2159-66.
28. Nosov V, Su F, Amneus M, et al. Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. Am J Obstet Gynecol 2009;200:639.e1-5.
29. Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. Clin Cancer Res 2008;14:1065-72.
30. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2005;99:267-77.
31. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. Br J Cancer 2009;100:1315-9.
32. Montagnana M, Lippi G, Danese E, et al. Usefulness of serum HE4 in endometriotic cysts. Br J Cancer 2009;101:548.
33. Mongia SK, Rawlins ML, Owen WE, et al. Performance characteristics of seven automated CA 125 assays. Am J Clin Pathol 2006;125:921-7.
34. Plebani M. Il trasferimento delle conoscenze sui nuovi biomarcatori: dalla ricerca all'i-phone. Biochim Clin 2010;6:583-4.