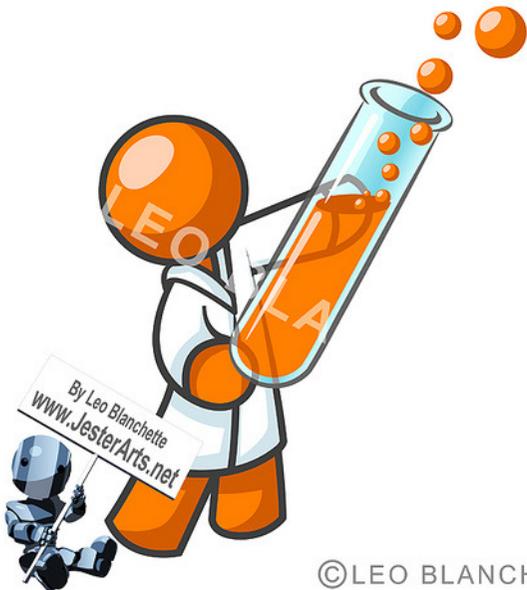


markers tumorali



©LEO BLANCHETTE



13/05/2009

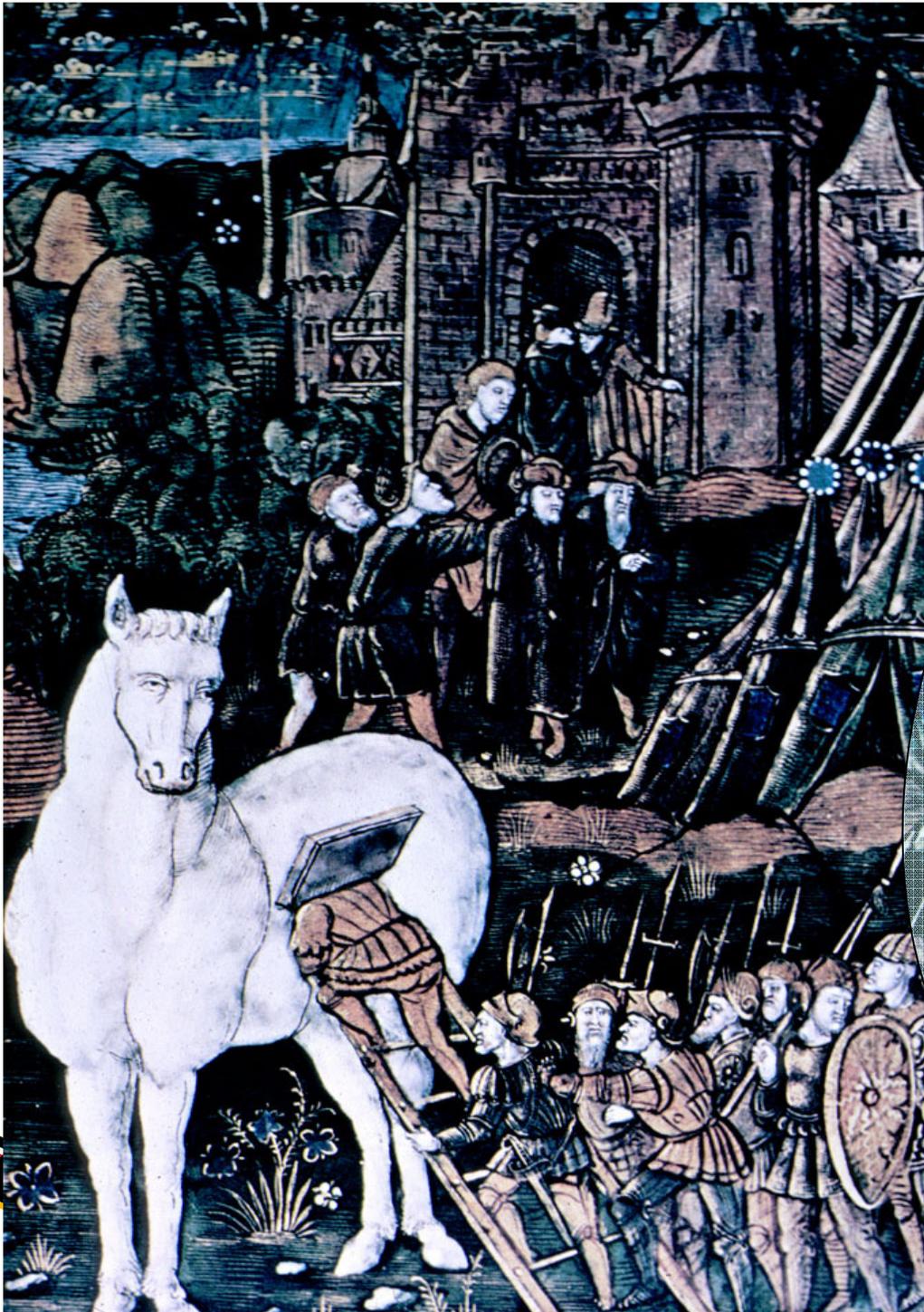


Unilabs

Ticino

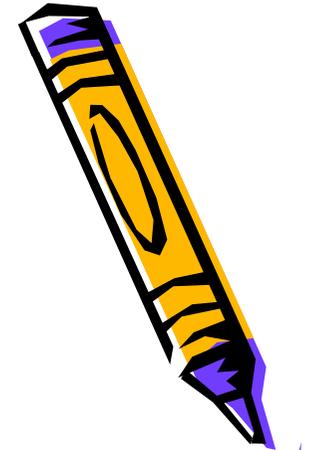
Dott. Luca Germagnoli

1



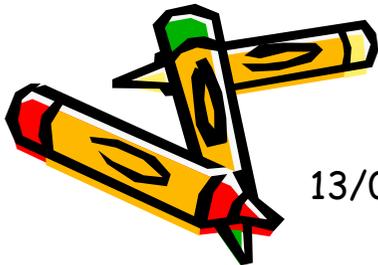
PRE-ANALITICA

La fase preanalitica è importante



Qualitativamente: l'utilità clinica del dato è legata ad un corretto trattamento del campione biologico
Guder WG, Preanalytical factors and their influence on analytical quality specifications. Scand J Clin Lab Invest 1999;59:545-50

Quantitativamente: la preanalisi costituisce il 57% del turnaround time
Godolphin W et al, Automated blood-sample handling in the clinical laboratory, Clin Chem 1990;36:1551-2



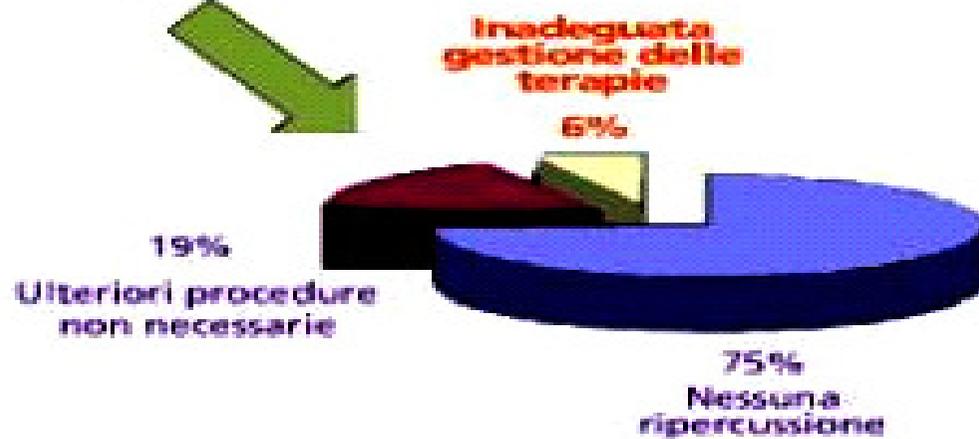
13/05/2009



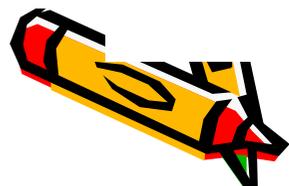
Errori di laboratorio



Conseguenza degli errori



Plebani et al. - Azienda Ospedaliera di Padova



13/05/2009



La fase preanalitica comprende

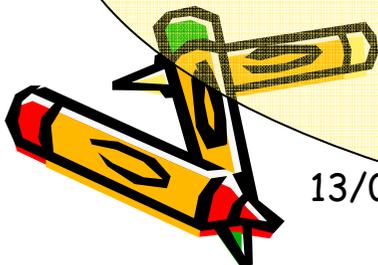
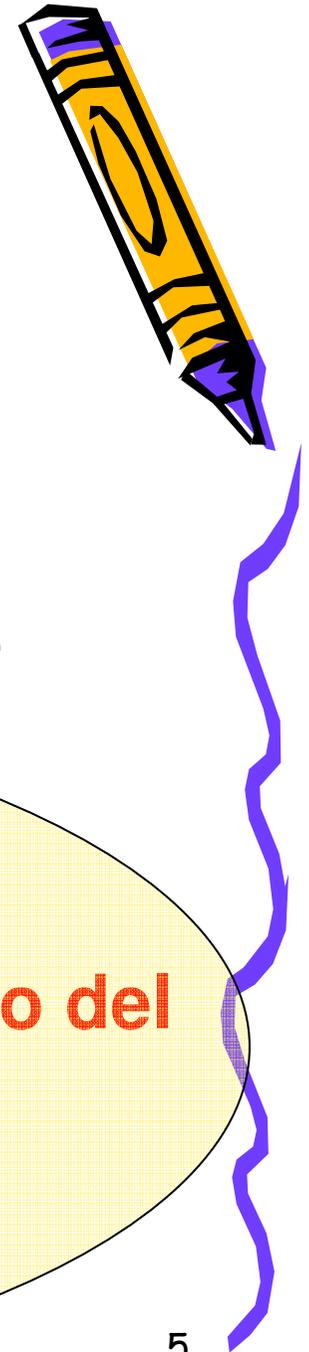
Preparazione del paziente

Scelta del materiale per la raccolta

Raccolta del campione biologico

Conservazione e trasporto del campione

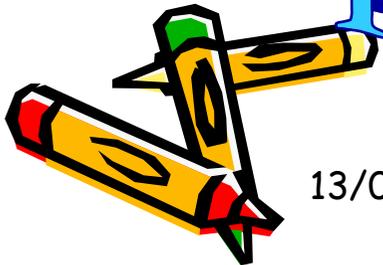
Preparazione del campione per l'analisi
Identificazione, centrifugazione, trasporto del
campione (separazione di matrice)
(congelamento)



13/05/2009



Il prelievo



13/05/2009

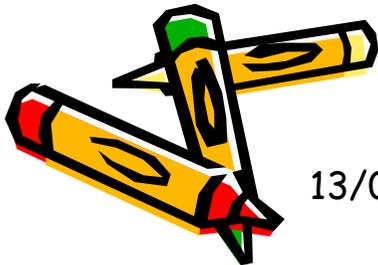
Fase preanalitica

Preparazione del paziente

Il prelievo dei campioni biologici viene effettuato la mattina dopo 8-12 ore di digiuno (valori basali)

Il digiuno è cruciale per ottenere campioni non lipemici (plasma limpido)

Il prelievo ideale deve esser effettuato dopo 15 minuti di assoluto riposo e a posizione seduta



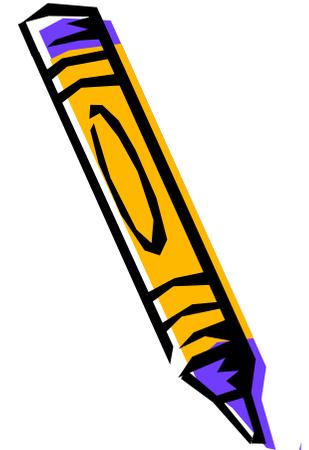
Fase preanalitica

Preparazione del paziente

Il prelievo ideale deve esser effettuato in posizione seduta

Il passaggio da clinostatismo ad ortostatismo può comportare la riduzione fino a 400 mL del volume plasmatico. Tale variazione è importante per alcuni parametri, come l'ematocrito e gli elettroliti.

Occorre perciò considerare la differenza tra la situazione del paziente ospedalizzato e il paziente ambulatoriale.



Fase preanalitica

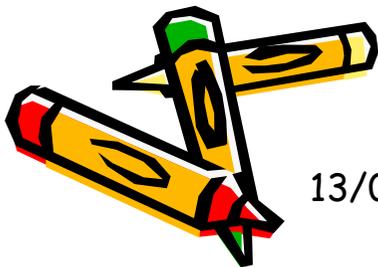
Preparazione del paziente

Utilizzo del laccio



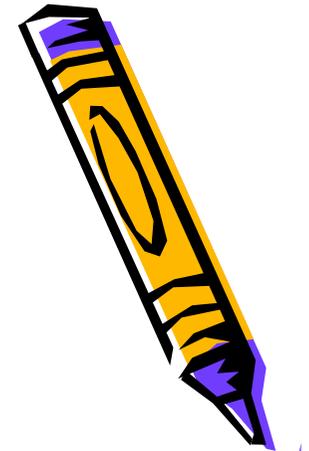
Il laccio emostatico per inturgidire le vene del braccio ed agevolare l'effettuazione del prelievo possono causare variazioni importanti di alcuni parametri come l'ematocrito (emoconcentrazione) e la potassiemia (incremento)

L'uso del laccio deve esser limitato allo stretto necessario



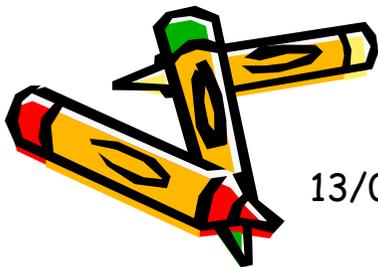
13/05/2009

PREPARAZIONE DEL PAZIENTE



- **FARMACI** l'assunzione di preparati ormonali di sintesi può talvolta interferire direttamente con la determinazione di alcuni ormoni; inoltre può modificare l'assetto ormonale dell'individuo per la loro funzione terapeutica.

Morfina e metildopa aumentano le **catecolamine**



13/05/2009

MODALITA' DI ESECUZIONE DEL PRELIEVO

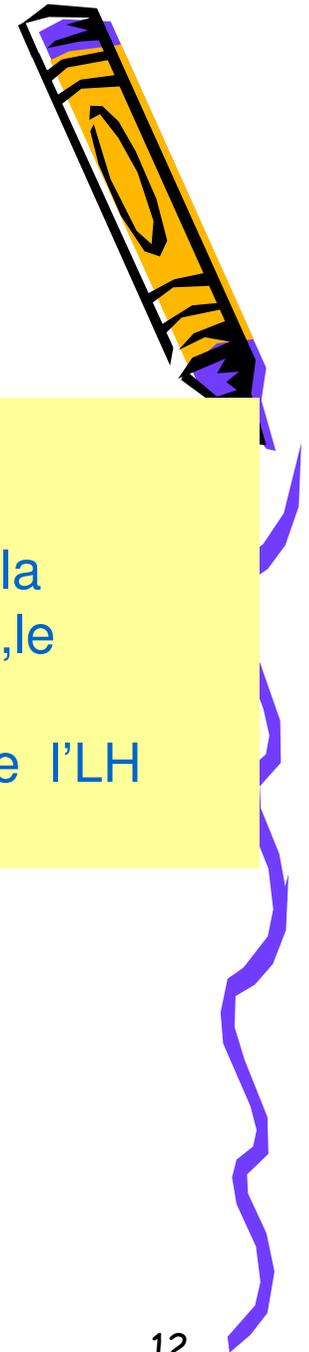


• **STRESS MENTALE** : si raccomanda, ove possibile, di evitare stress psicologici ; il paziente dovrebbe essere rassicurato e reso tranquillo
in taluni casi è necessario effettuare specifici test quali il dosaggio della prolattina in prelievi seriali dopo aver straiato il paziente e aver mantenuto pervio l'accesso venoso mediante una flebo di soluzione fisiologica.

Lo stress provoca aumento delle catecolamine, della vasopressina e della prolattina

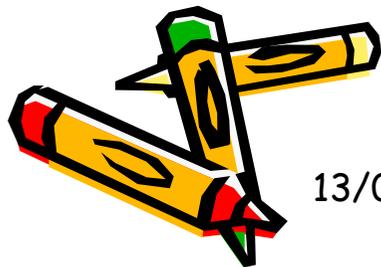


CORRETTE INFORMAZIONI



- **ESERCIZIO FISICO**

L'attività fisica, in particolare quella sportiva, fa aumentare il **cortisolo**, le **catecolamine**, l'**HGH**, l'**ACTH**, il **testosterone**, l'**androstenedione** e l'**LH**

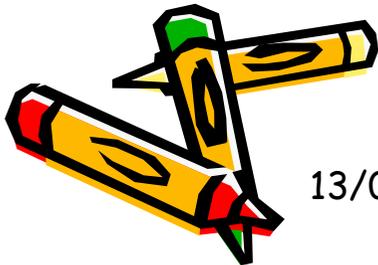
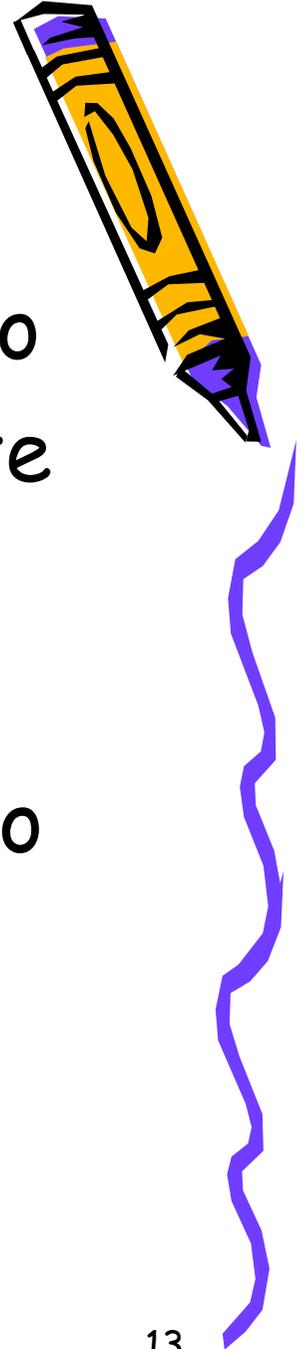


13/05/2009

Criticità tecniche

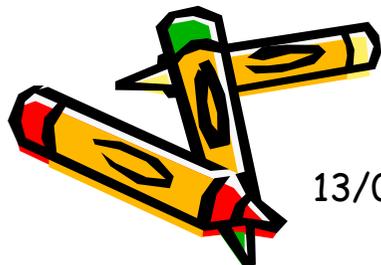
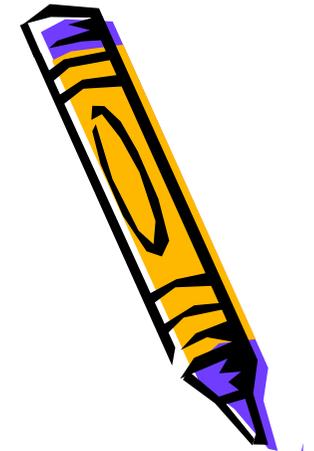
- Sequenza delle provette nel prelievo
- Corretto riempimento delle provette
- Omogeneizzazione del campione

- Tempo per la formazione del coagulo
- Condizioni di centrifugazione
- Conservazione dei campioni



Sequenza di prelievo (NCCLS)

- 1) Flaconi emocolturali
- 2) Provette secche senza additivo
- 3) Provette con citrato per indagini emocoagulative
- 4) Provette con altri additivi (eparina, fluoruro ossalato, ACD, EDTA, VES, ecc.)
- 5) Provette con separatore di siero e/o plasma
- 6) Provette con trombina



Fase preanalitica

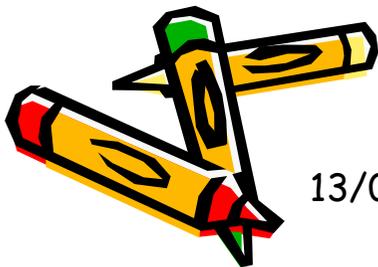
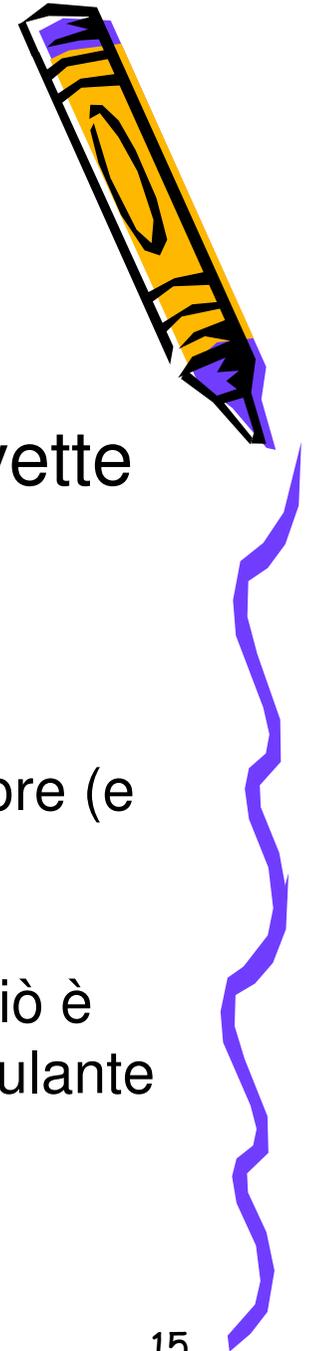
Prelievo di sangue

Usare **sempre** sistema di prelievo chiuso (provette sottovuoto)

Vantaggi:

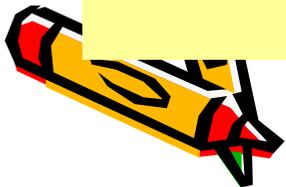
Non esiste possibilità di contatto con il sangue per l'operatore (e per i pazienti)

La quantità di sangue prelevata è fissa e predeterminata: ciò è particolarmente importante per la miscela sangue/anticoagulante

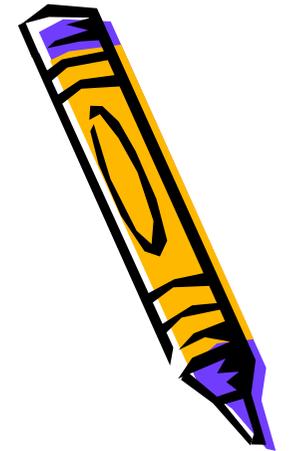


Riempimento delle provette

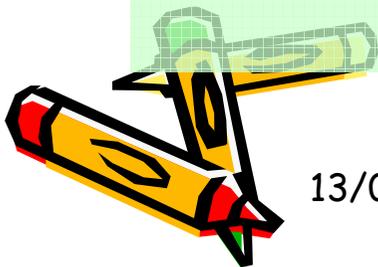
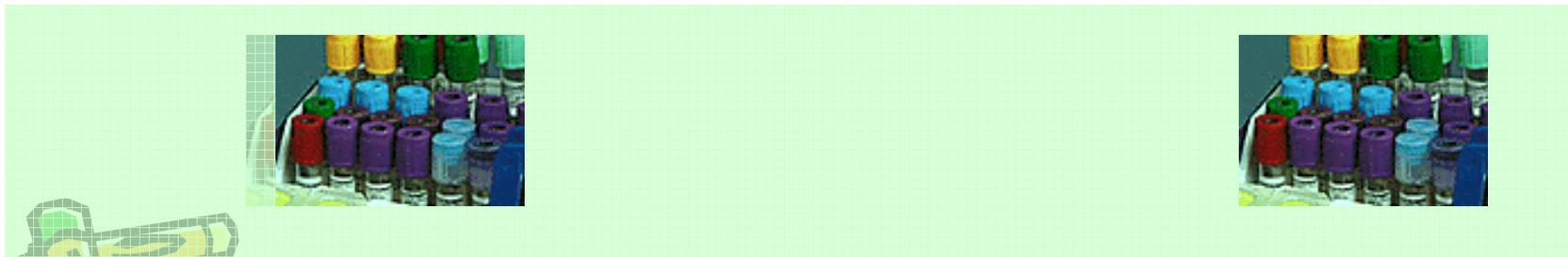
- Le provette sottovuoto hanno un'aspirazione precalibrata all'origine corrispondente al volume nominale dichiarato.
 - In fase di prelievo, una volta che tale volume è raggiunto il flusso ematico si arresta naturalmente
 - L'aspirazione di una quantità di sangue appropriata è importante ai fini di un corretto rapporto sangue:additivo



La fase preanalitica



L'USO DI UN SISTEMA CHIUSO DI PRELIEVO E' ASSOLUTAMENTE NECESSARIO



13/05/2009

Fase preanalitica

Campione da utilizzare:

- E' responsabilità del laboratorio fornire le corrette informazioni relativamente al tipo di tubo da utilizzare per ogni test, assicurando il rispetto delle istruzioni definite dal fornitore,
- Siero o plasma sono generalmente (ma non sempre) ugualmente appropriati. I tubi con gel NON sono generalmente utilizzabili,
- L'agente anticoagulante ethylene- diamine tetraacetic acid (EDTA) può interferire con alcuni metodi analitici con conseguenze fortemente dipendenti dall'analizzatore impiegato.

ATTENZIONE all'utilizzo di aliquote → automatizzare questa fase del processo

ATTENZIONE → modalità di prelievo standardizzate

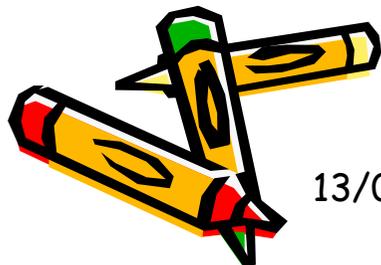
Fase preanalitica



Stabilità dei campioni:

- I marcatori tumorali sono generalmente stabili per diverse ore anche a temperatura ambiente, ma siero e plasma devono essere rapidamente separati dal coagulo e conservati a $+4^{\circ}\text{C}$ (a breve termine) o a -30°C (long-term).
- La stabilità del PSA (totale) e del free PSA è critica, soprattutto nel contesto di programmi di screening e nel monitoraggio dei pazienti sottoposti a interventi di prostatectomia

ACTH (EDTA)	instabile a 25°C	poche ore/ $4-8^{\circ}\text{C}$
Calcitonina	1 ora/ 25°C	poche ore/ $4-8^{\circ}\text{C}$
Catecolamine urinarie	1 ora/ 25°C	
PTH (EDTA)	6 ore/ 25°C	



13/05/2009



CARRY-OVER

Nelle serie analitiche (campioni analizzati in sequenza) è il rischio per ogni campione di contaminazione con il precedente

La problematica si verifica più facilmente in caso di utilizzo del medesimo ago di campionamento o pipetta per differenti campioni → **metodi manuali**

Gli attuali analizzatori automatici sono progettati in modo di minimizzare questo rischio, soprattutto mediante l'utilizzo di **puntali monouso** che vengono sostituiti ad ogni campionamento, ma anche mediante sistemi di **lavaggio** della sonda e di controllo dei **volumi dispensati**.

Le conseguenze dell'eventuale carry-over sono severe nel caso del dosaggio dei marcatori neoplastici e nell'ormonologia (β -HCG), meno (minor impatto clinico) nel caso delle analisi di chimica clinica.

POSSONO ESSERE DI DIFFICILE IDENTIFICAZIONE (ES, dosaggio ormoni tiroidei in gravida, seguito dal dosaggio di β -HCG in non gravida)



/200

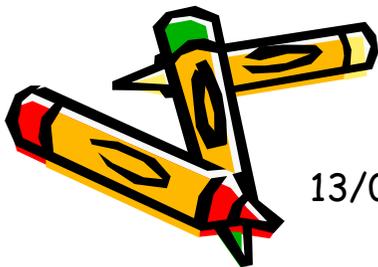


INTERFERENZE ENDOGENE

ANTICORPI ANTI TOPO (HAMA) E ETEROFILI possono agire come interferenti in tutti i test immunochimici; questi anticorpi presentano anche un passaggio transplacentare, come dimostrato per neonati eutiroidei con elevati livelli di TSH allo screening per ipotiroidismo

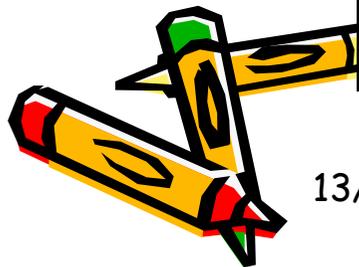
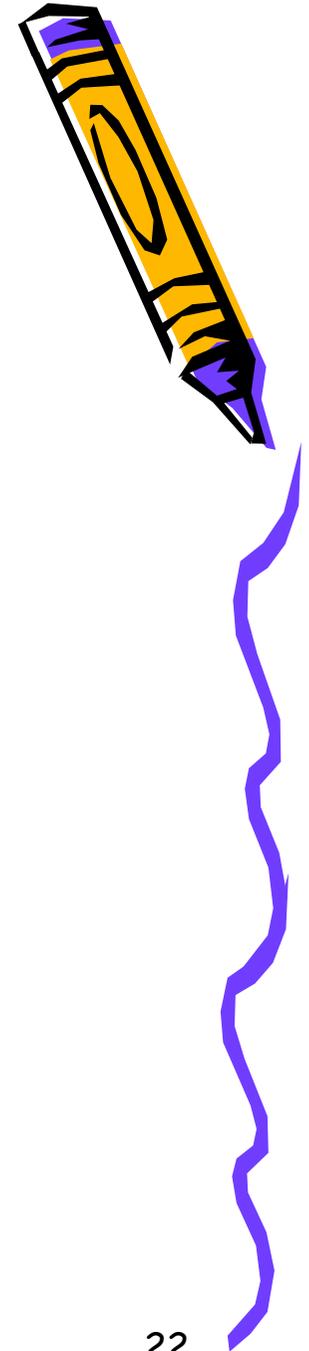
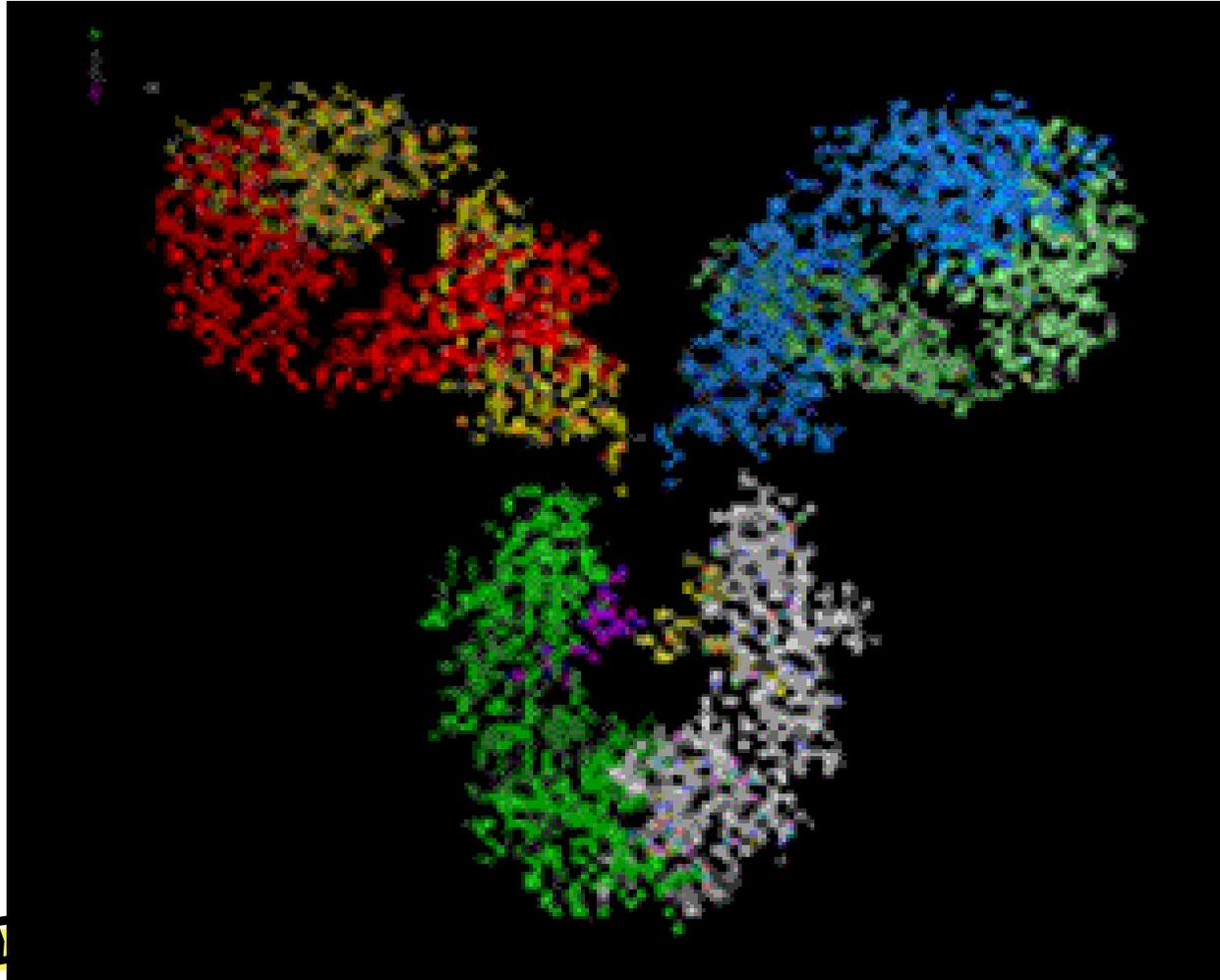
FATTORI REUMATOIDI, costituiti prevalentemente da anticorpi IgM diretti contro il frammento Fc delle IgG umane possono reagire anche con immunoglobuline di altre specie causando intereferenze, specialmente nei test di tipo competitivo.

L'interferenza da fattori reumatoidi è più rara di quella da anticorpi eterofili in quanto la loro affinità per gli anticorpi di topo è più bassa di quella per gli anticorpi umani



13/05/2009

ANTICORPI MONOCLONALI

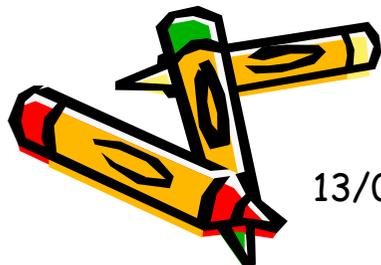
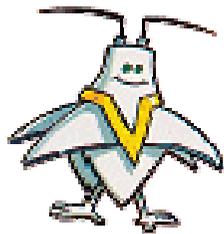
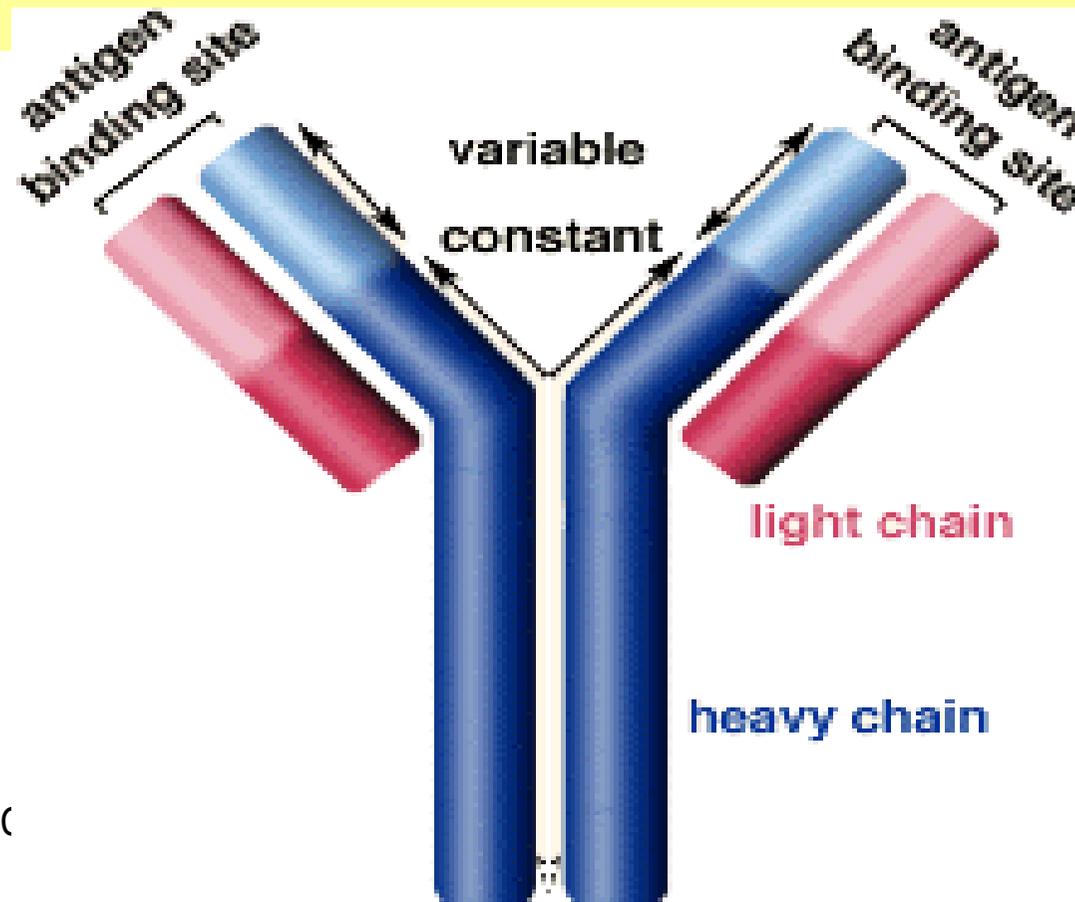


13/05/2009



ANTICORPI :

proteine prodotte da linfociti B aventi una struttura composta da quattro catene polipeptidiche: due catene leggere identiche a basso peso molecolare e due pesanti ad alto peso molecolare. Ai due estremi delle catene c'è un gruppo carbossi-terminale e un gruppo amino-terminale che ha compito di legarsi all'antigene specifico

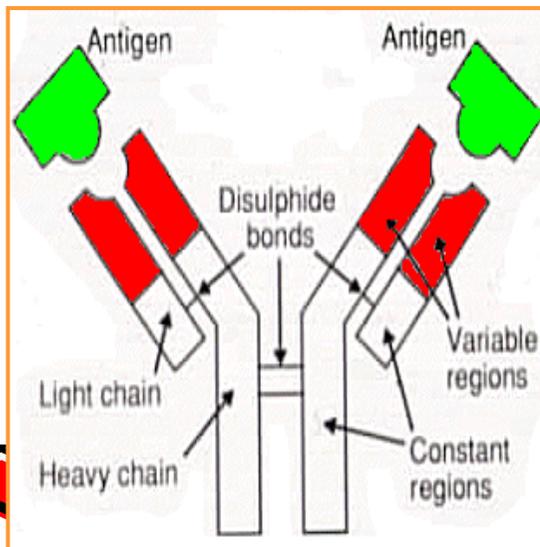


13/05/20

STRUTTURA DELLE IMMUNOGLOBULINE

Consiste in due catene leggere identiche e due pesanti identiche legate insieme da ponti disolfuro.

Le catene leggere sono costituite da un dominio amino-terminale variabile e un dominio carbossi-terminale costante, le catene pesanti sono costituite da un dominio variabile seguito da tre domini costanti. I **domini variabili** non presentano una variabilità uniforme su tutta la loro lunghezza; in particolare tre piccole regioni presentano una variabilità molto più alta del resto della catena; esse sono dette **regioni ipervariabili** o regioni determinanti la complementarità.



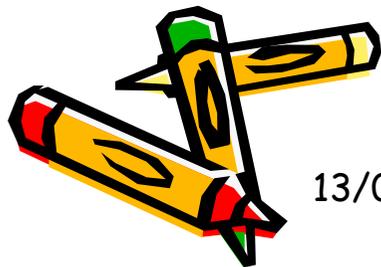
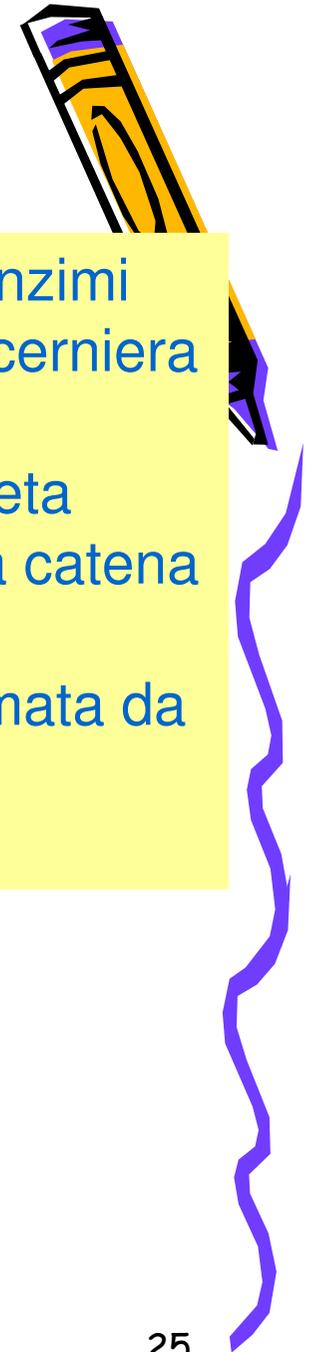
Queste regioni variano sia per dimensioni che per sequenza nelle differenti Ig e sono le regioni che determinano la specificità delle interazioni antigene-anticorpo. I **domini costanti** presentano una significativa identità di sequenza sia l'uno con l'altro sia rispetto ai domini costanti delle catene immunoglobuliniche di differenti classi.

FRAMMENTO Fab

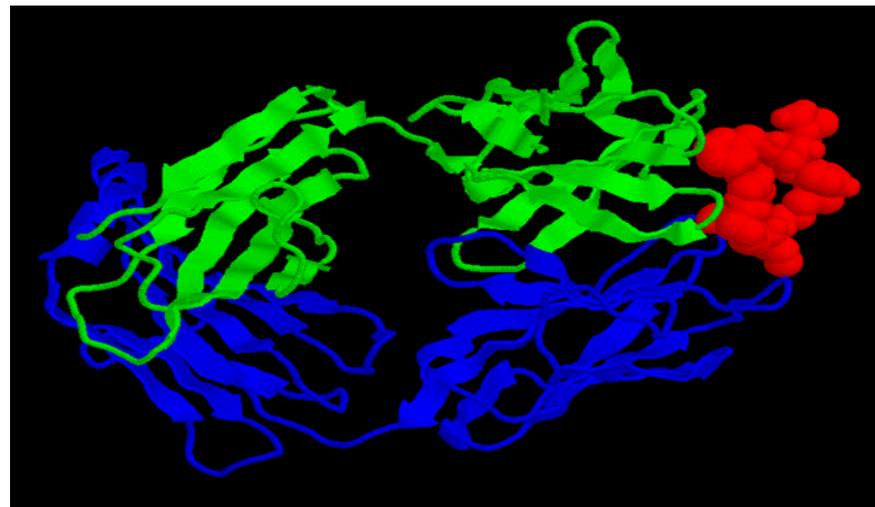
Quando la molecola di Ig viene trattata blandamente con enzimi proteolitici le catene pesanti vengono scisse nella regione cerniera in due frammenti **Fab** identici ed un frammento **Fc**

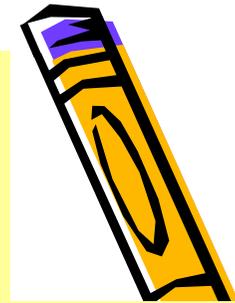
Il frammento **Fab** è costituito da una catena leggera completa legata, mediante un ponte disolfuro, ad un frammento della catena pesante

Il frammento **Fab** consiste in due regioni globulari, una formata da due domini costanti e l'altra formata da due variabili



13/05/2009

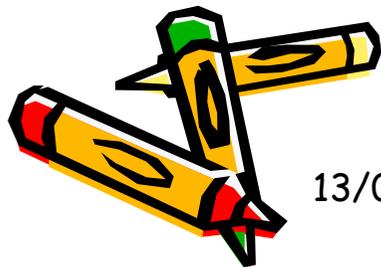
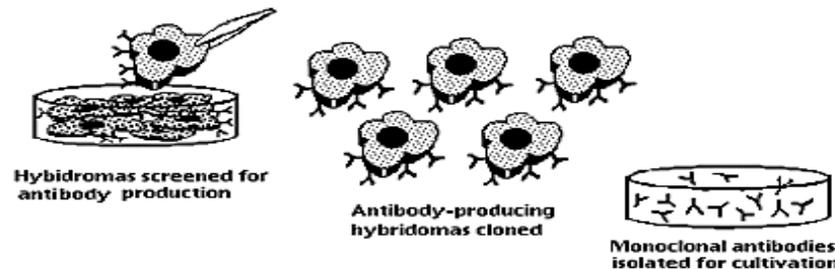
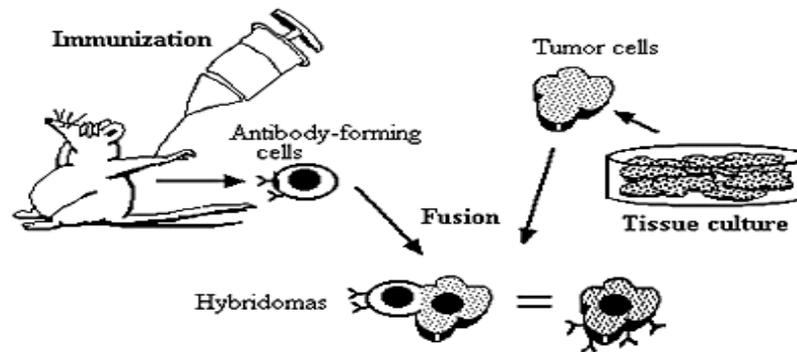
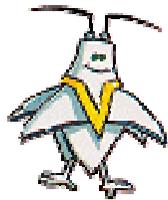




ANTICORPO MONOCLONALE

anticorpo costituito attraverso tecniche di ingegneria genetica avente alta specificità.

Le cellule che producono gli anticorpi monoclonali si chiamano **IBRIDOMI** e sono frutto della fusione in vitro di due cellule: una che conferisce la specificità per l'antigene, l'altra, una cellula tumorale, determina la capacità di crescere illimitatamente



13/05/2

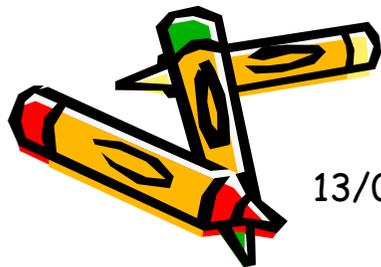
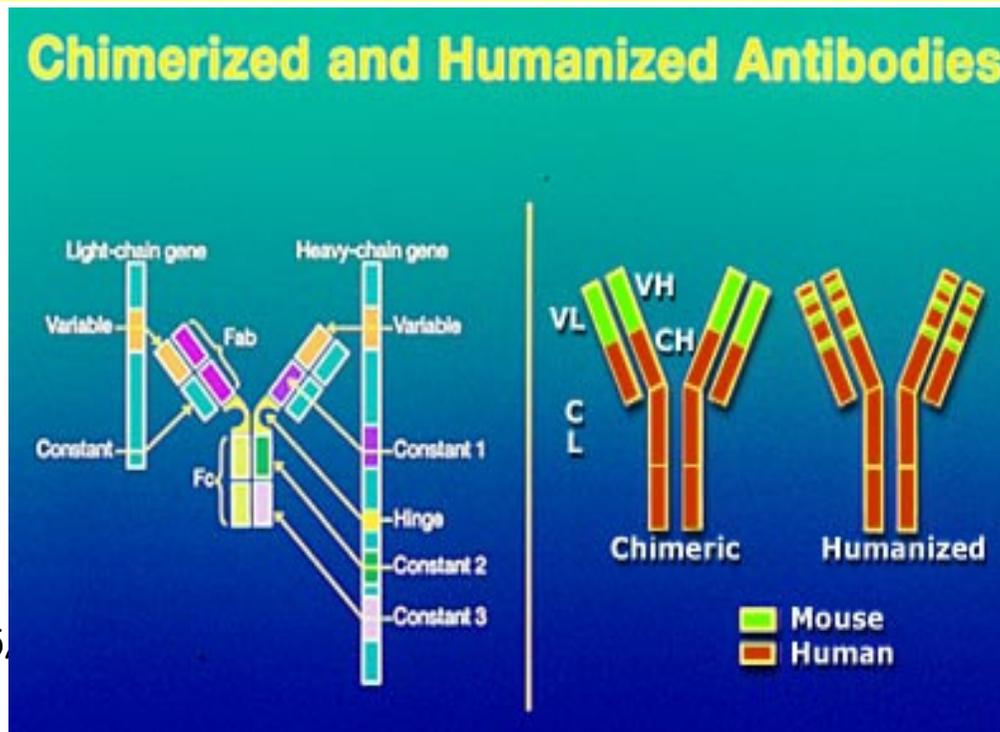
Monoclonal Antibody Production

26



ANTICORPI CHIMERICI sono costituiti dalla fusione di anticorpi non umani con parti di anticorpi umani; generalmente contengono circa il 33% di proteine murine e il 67% di proteine umane. Sono stati sviluppati per ridurre la risposta HAMA indotta dall'uso di anticorpi murini.

ANTICORPI UMANIZZATI sono costruiti geneticamente per avere solo un 5-10% di proteine murine e 90-95% di proteine umane.



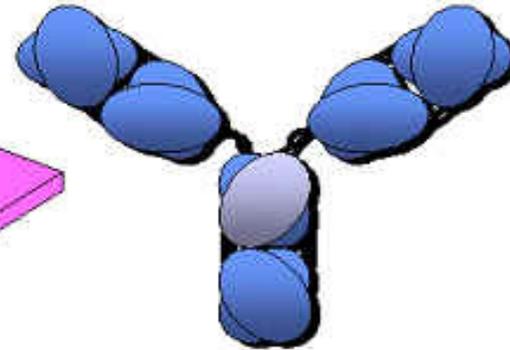
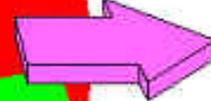
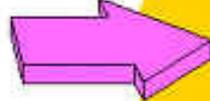
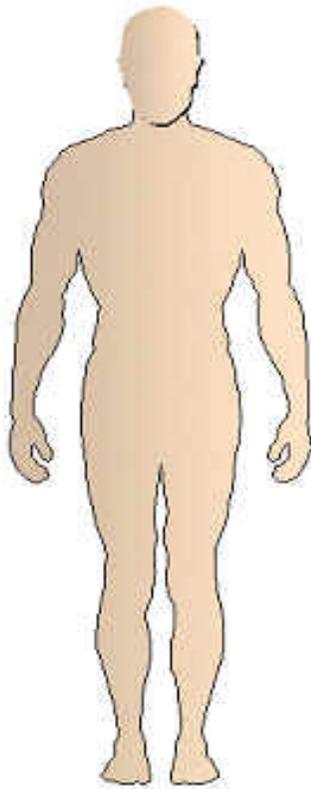
13/05

27

ANTICORPI UMANIZZATI

Gene Transfer

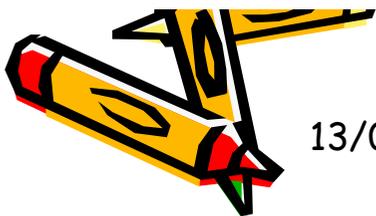
Immunization



mouse with
human Ig genes

human MAb

MEDAREX



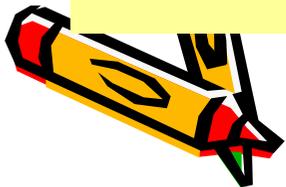
13/05/2009

ANTICORPI MONOCLONALI

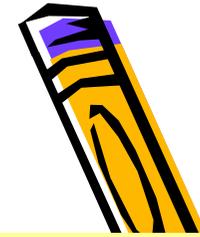
Anticorpi con elevata purezza e specificità capaci di riconoscere e legare uno specifico antigene

Vengono utilizzati

- per misurare proteine e farmaci nel siero
- per tipizzare sangue e tessuti
- per identificare agenti infettivi
- per identificare cluster di differenziazione per la classificazione di linfomi e leucemie
- per identificare antigeni tumorali
- per identificare auto-anticorpi
- per identificare cellule coinvolte nella risposta immune
- **a scopo terapeutico e diagnostico**



REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO



I legami che si formano tra l'antigene e l'anticorpo sono tutti di natura non covalente; questo include i legami ad idrogeno, legami elettrostatici, forze di Van de Waals e legami idrofobici.
E' una **reazione di natura reversibile**

Affinità è la somma delle forze di attrazione e repulsione tra il determinante antigenico ed il sito di combinazione dell'anticorpo.
L'affinità è in equilibrio costante .

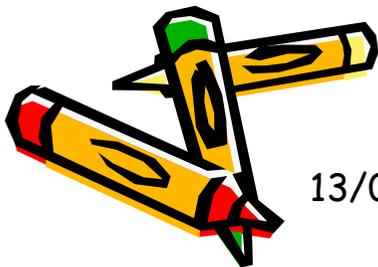
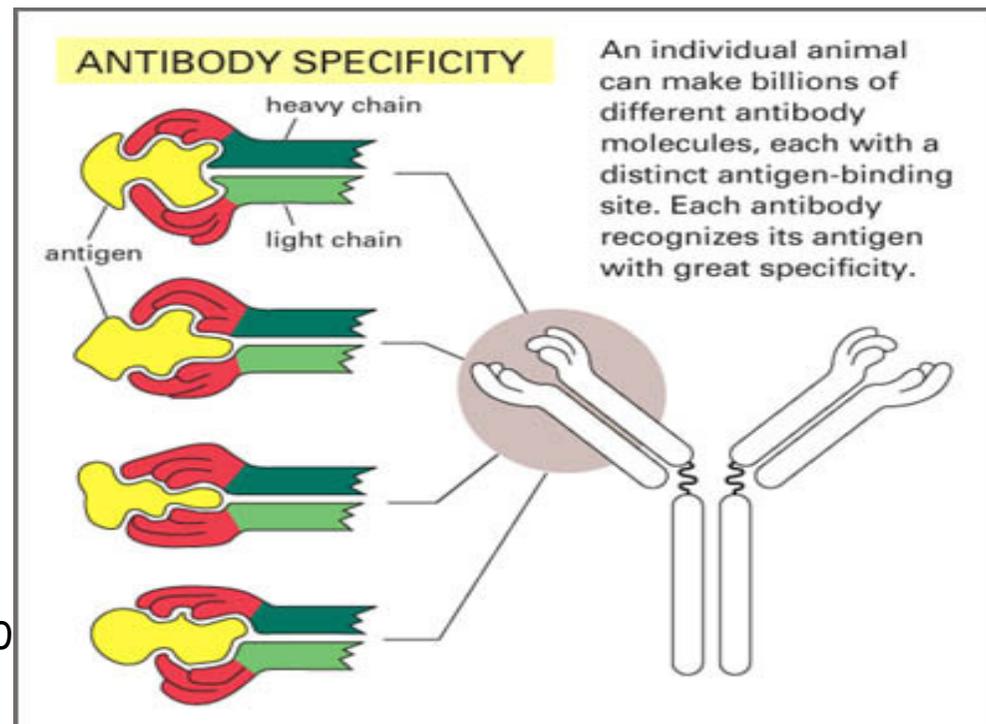
Avidità è la misura della capacità legante di un antigene dotato di molti determinanti antigenici con anticorpi multivalenti.
L'avidità è influenzata da tutte le valenze dell'anticorpo e dell'antigene ed è più della somma delle singole affinità.



Specificità: si riferisce all'abilità di un singolo sito di combinazione di un anticorpo di reagire con un solo determinante antigenico, o all'abilità di una popolazione di anticorpi a reagire con un singolo antigene.

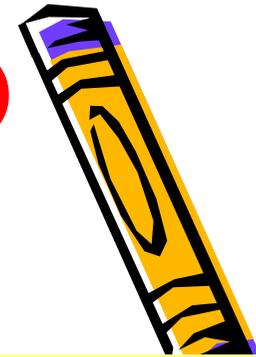
Gli anticorpi possono distinguere differenze:

- nelle forme isomeriche di un antigene
- nella struttura secondaria e terziaria di un antigene
- nella struttura primaria di un antigene



13/05/20

ANTICORPI UMANI ANTI – ANIMALE (HAMA) (anticorpi anti-reattivo)

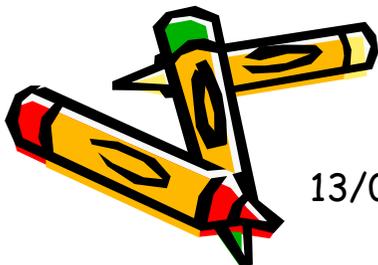


Sono anticorpi di classe IgG, IgA, IgM, IgE

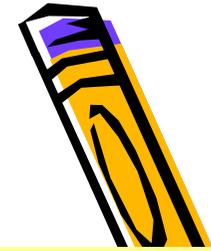
La prevalenza nella popolazione generale varia tra l'1% e l'80%

In alcuni casi sono il risultato di una esposizione ad un antigene definito, ma nella maggioranza dei casi la loro presenza è casuale

Gli anticorpi anti animali devono essere distinti sia dagli anticorpi eterofili a bassa affinità (IgM associate alla mononucleosi), sia da quelli che reagiscono con le emazie di varie specie (Ab di Paul Bunnel)



EZIOPATOGENESI



L'emotrasfusione è associata ad un aumento di incidenza di anticorpi anti-animale in parte spiegabile con l'infusione di preesistenti anticorpi, in parte con l'infusione di antigeni.

Le vaccinazioni possono essere strade attraverso le quali antigeni di origine animale vengono in contatto con il sistema immunitario

L'utilizzo di anticorpi monoclonali a fini terapeutici o per imaging

Il passaggio transplacentale di anticorpi materni al feto

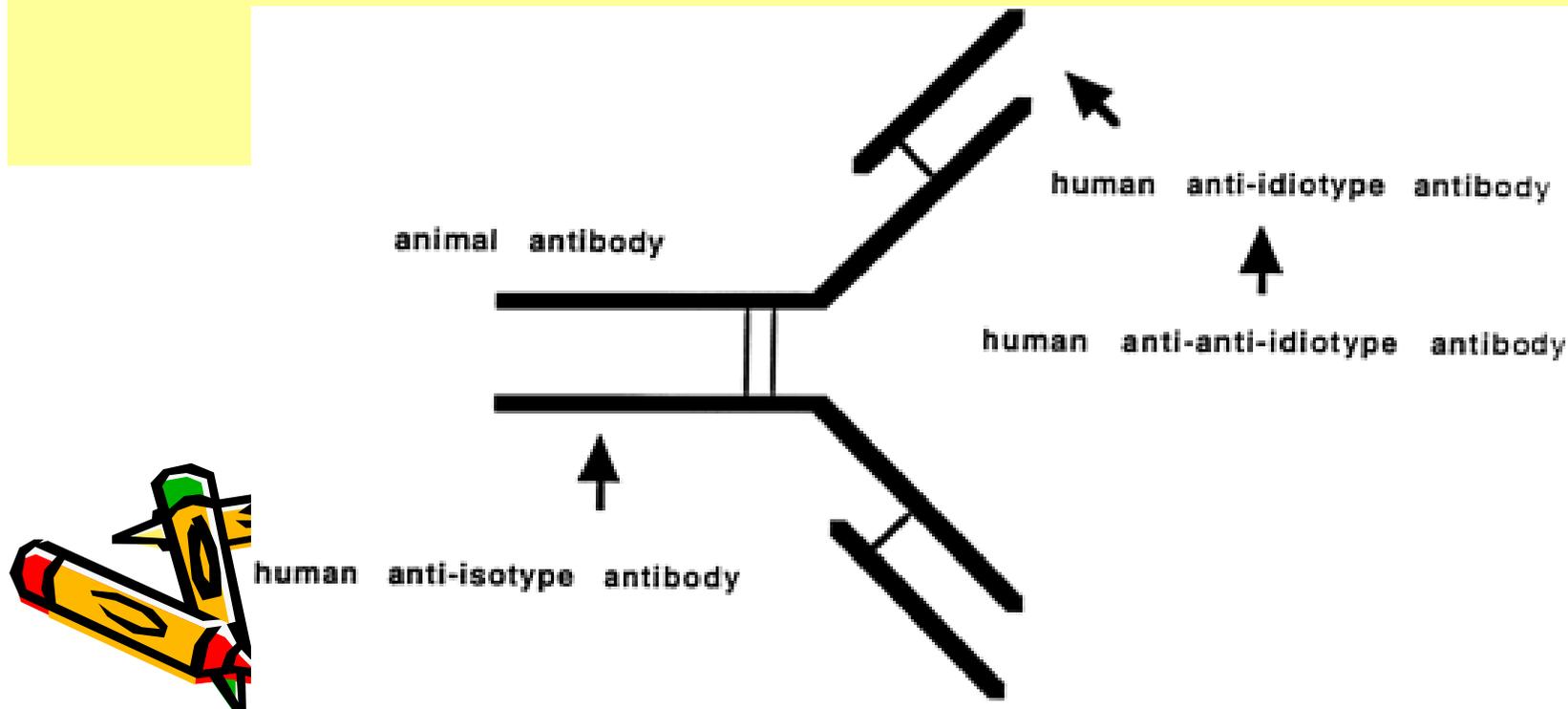
La celiachia o altre patologie infiammatorie gastrointestinali possono determinare il passaggio di antigeni derivati dal cibo attraverso la mucosa intestinale



Gli anticorpi anti-animali reagiscono contro le IgG, le IgA e le IgM, molto raramente contro le IgE, e possono avere specificità anti idiotipo o anti isotipo

ANTICORPI ANTI IDIOTIPO sono diretti contro la zona ipervariabile (20%)

ANTICORPI ANTI ISOTIPO sono rivolti verso la regione costante (80%)



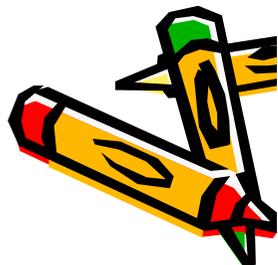
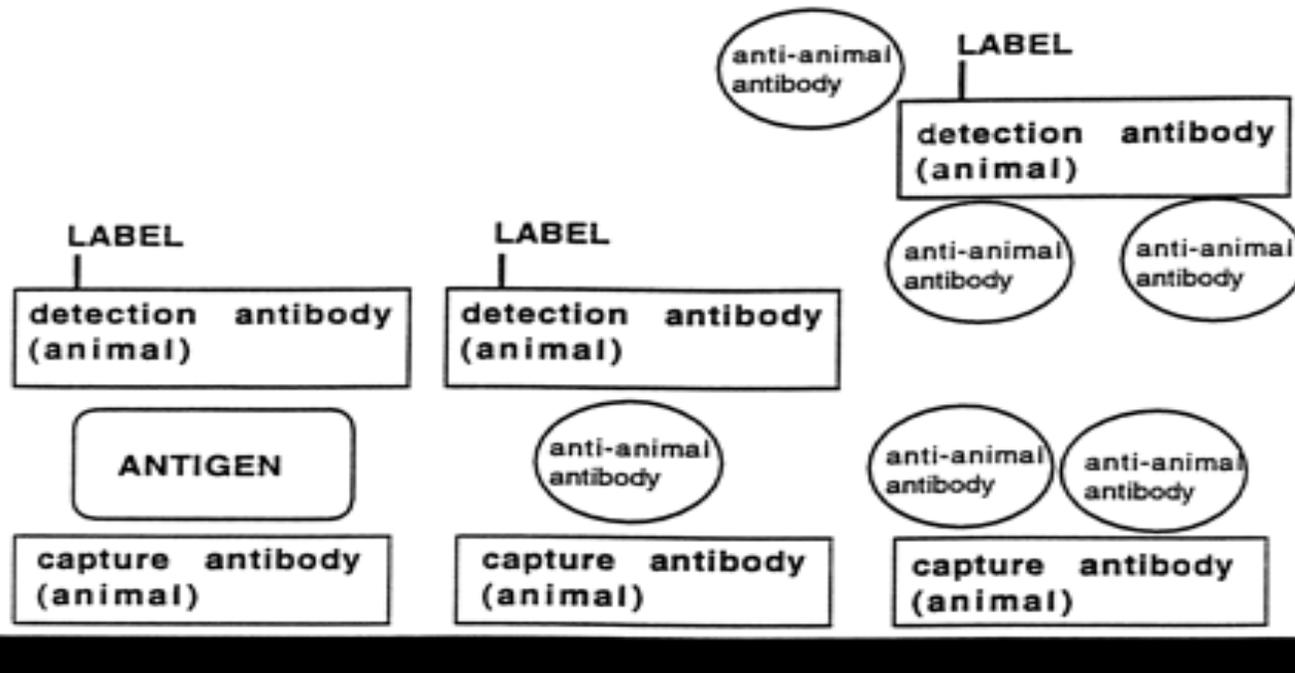
MECCANISMI DI INTERFERENZA



Immunodosaggi “sandwich”

Se gli HAMA si presentano nel campione di siero e interferiscono legandosi tra l'immunoglobulina murina che cattura l'anticorpo e l'immunoglobulina coniugata = **FALSI POSITIVI**

Se gli HAMA reagiscono con uno dei due anticorpi murini prima della reazione = **FALSI NEGATIVI**

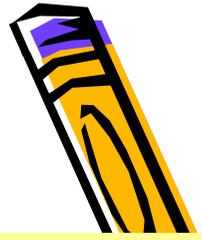


POSITIVE

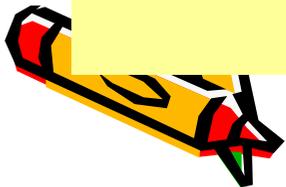
FALSE POSITIVE

FALSE NEGATIVE

ALTRI ANTICORPI ANTI -ANIMALI



- anti coniglio (HARA) terapia immunosoppressiva con IgG anti timociti.
Valori elevati di hCG in una donna di 41 aa
- anti capra valori elevati di CK MB in uomo di 84 aa
- anti pecora valori elevati in un soggetto di alfa fetoproteina
- anti bovini valori alterati di TSH in tre soggetti
- anti maiale si sono riscontrati in soggetti emofiliaci che ricevevano il fattore VIII porcino.
Nessuna interferenza notata



ALTRI ANTICORPI ANTI -ANIMALI

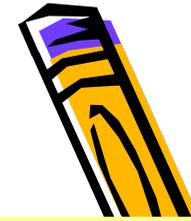
anti ratto riscontrati in 15 pazienti trapiantati di midollo che effettuavano una terapia per la prevenzione della "graft vs host disease".
Nessuna interferenza .

anti cavallo in terapia immunosoppressiva con anticorpi anti timociti.
Nessuna interferenza

anti chimerici umani in pazienti in trattamento per il mieloma.
Nessuna interferenza.

anticorpi con specificità mista

PER ELIMINARE L'INTERFERENZA



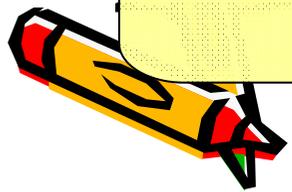
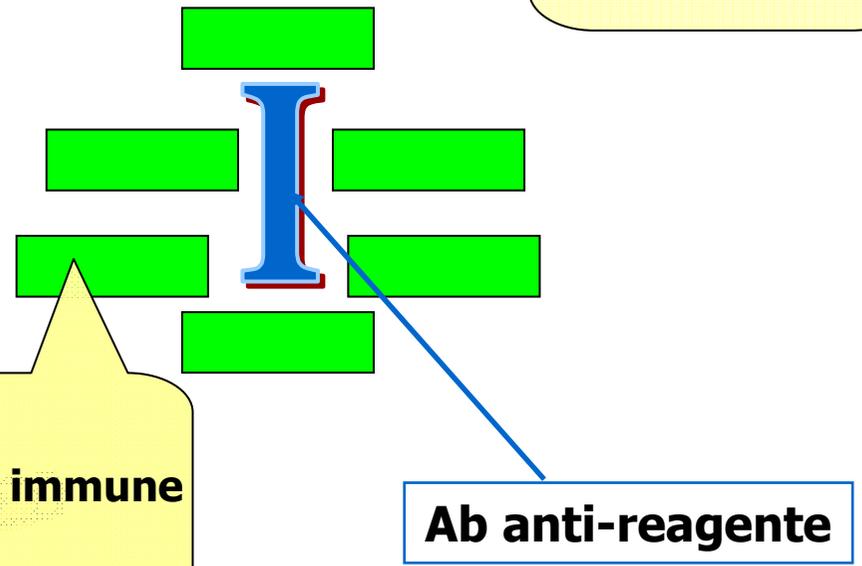
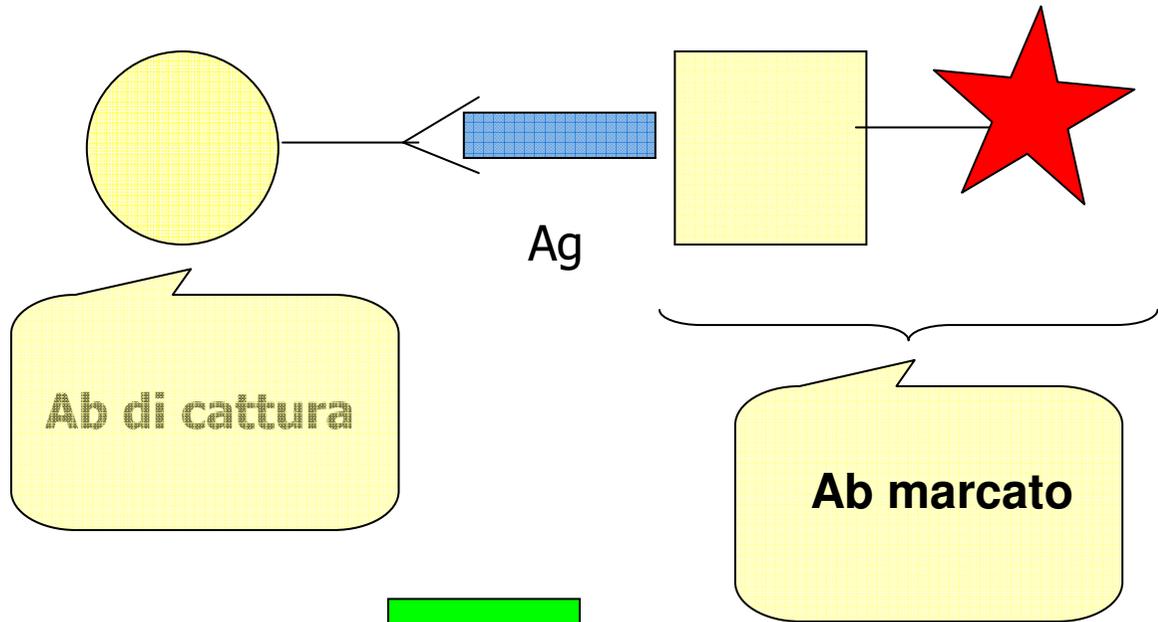
PREVENZIONE:

- terapia immunosoppressiva prima e dopo il trattamento con Ab
- utilizzo di anticorpi privati del frammento Fc, cioè utilizzo dei frammenti Fab (meno immunogenici) e non delle immunoglobuline intere
- utilizzo di anticorpi umanizzati

BLOCCO O RIMOZIONE

- utilizzo di agenti bloccanti nei kit
 - IgG policlonali (un solo MoAb, e secondo Ab policlonale)
 - miscele di anticorpi monoclonali da differenti specie
 - aggiunta di sieri animali non immuni contenenti IgG
- **utilizzo di Heterophilic Blocking Tubes** contenenti specifici agenti bloccanti in forma liofilizzata
- **analisi del campione con metodi alternativi (RIA)**
- **precipitazione con glicole-polietilenico (PEG) [50% v/v di PEG 16%]**





13/05/2009

ANTICORPI ETEROFILI

(anticorpi anti-reattivo)

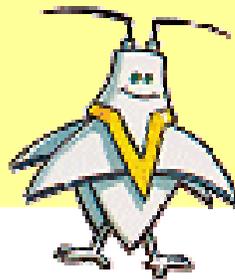
Sono generalmente presenti a minori concentrazioni rispetto a HAMA e presentano minore affinità

Si tratta di Ab poco definiti, causati da immunogeni non chiari e caratterizzati da sostanziale non-specificità

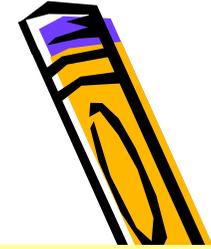
La prevalenza nella popolazione generale appare essere **pari al 40%**

Principalmente riconoscono epitopi sul frammento Fab e sono in grado di formare interazioni Fab-Fab con gli anticorpi reagenti

POSSONO DETERMINARE RISULTATI ERRONEI, come gli HAMA



EZIOPATOGENESI



Stretti contatti con animali per lavoro o per la presenza di animali domestici

La celiachia o altre patologie infiammatorie gastrointestinali possono determinare il passaggio di antigeni derivati dal cibo attraverso la mucosa intestinale

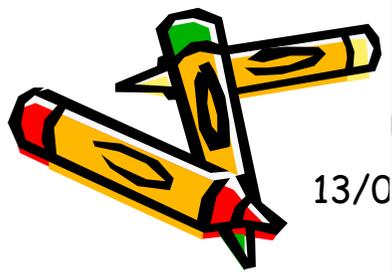
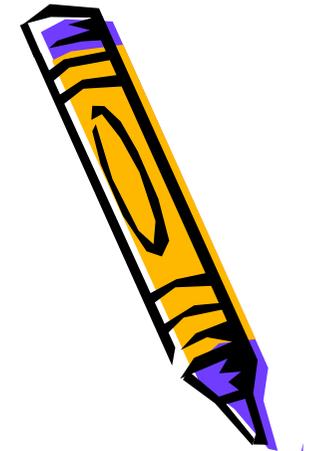
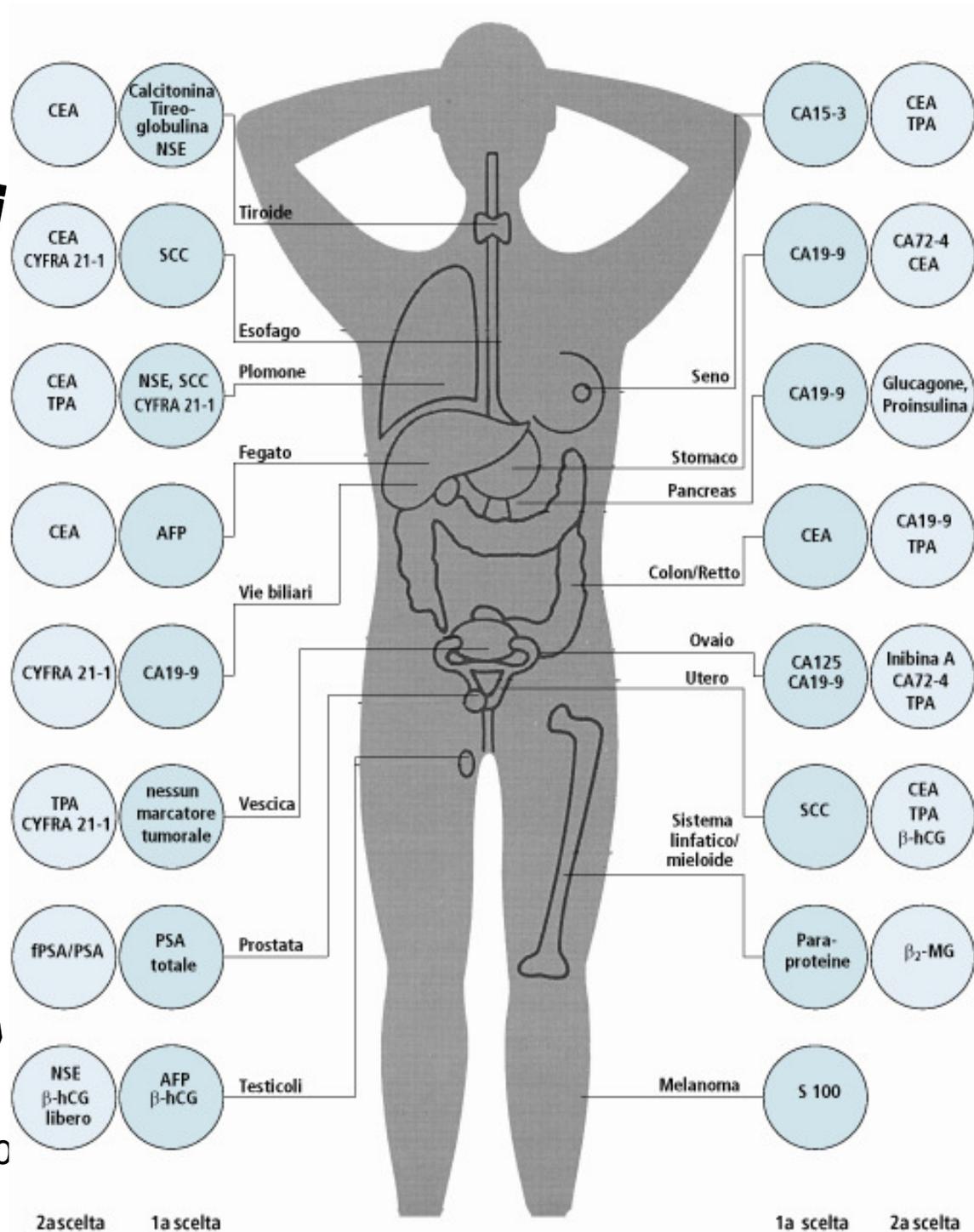
Cause iatrogeniche

Le vaccinazioni, trasfusioni di prodotti ematici, esposizione ad agenti diagnostici e farmaceutici di origine animale

L'utilizzo di anticorpi monoclonali a fini terapeutici o per imaging



marcatori tumorali



13/0

Markers tumorali

CA125

↑ **Benigno**: 1° trimestre della gravidanza fisiologica, patologie ginecologiche benigne (endometriosi, fibroma, malattia pelvica infiammatoria), condizioni infiammatorie delle sierose (peritoneo, pleura, pericardio), ascite, patologie severe a carico del fegato

↑ **Maligno** (>30-35 U/mL): carcinoma epiteliale e mucinoso dell'ovaio. CA 125 NON è specifico, ma può essere elevato anche in presenza di adenoCA della tuba, endometrio, cervice, pancreas, colon, mammella e polmone

- NESSUN effetto riproducibile da parte di farmaci
- in epoca post-menopausa la concentrazione di CA125 è inferiore (<20 U/mL nel 99% delle donne)
- CV % interassay < 15% (NACB), < 10% (EGTM)

NON dovrebbe essere utilizzato per lo screening nella popolazione generale (ridotta sensibilità per malattia in stadio precoce → in stadio I solo il 50% dei casi presenta CA125 elevato)

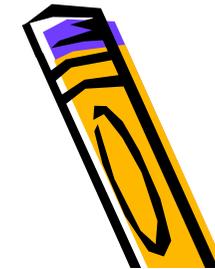


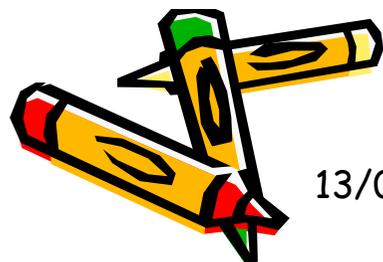
Table 16. Recommendations for use of CA125 as a tumor marker in ovarian cancer by different expert groups.

Use	American College of Physicians (405)	EGTM 2005 (404)	ESMO ^a (406)	NACB and EGTM 2002 (15)	NCCN (639)	NIH Panel (408)	NACB 2008		
							Recommendation	LOE ^b	SOR ^c
Screening—no family history or other risk factors	No	No	None published	No	None published	No	No	III	B
Early detection in hereditary syndromes, with transvaginal ultrasound	No	Yes	None published	Yes	None published	Yes	Yes	III	B
Differential diagnosis—suspicious pelvic mass	None published	Yes (Postmenopausal women only)	None published	Yes (Postmenopausal women only)	Yes	Yes (Postmenopausal women)	Yes (Postmenopausal women)	II/IV	A
Monitoring therapy	None published	Yes	Yes	Yes	Yes	None published	Yes	I/II	A
Detection of recurrence	None published	Yes, in certain situations	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	III	B
Prognosis	None published	No	Yes	Yes	None published	Yes	Yes	III	A/B

^a ESMO, European Society of Clinical Oncology.

^b LOE (120), level 1, evidence from a single, high-powered, prospective, controlled study that is specifically designed to test the marker, or evidence from a meta-analysis, pooled analysis or overview of level II or III studies; level II, evidence from a study in which marker data are determined in relationship to prospective therapeutic trial that is performed to test therapeutic hypothesis but not specifically designed to test marker utility; level III, evidence from large prospective studies; level IV, evidence from small retrospective studies; level V, evidence from small pilot studies.

^c SOR (520), A, high (further research is very unlikely to change the panel's confidence in the estimate of effect); B, moderate (further research is likely to have an important impact on the panel's confidence in the estimate of effect and is likely to change the estimate); C, low (further research is very likely to have an important effect on the panel's confidence in the estimate of effect and is likely to change the estimate); D, very low (any estimate of effect is very uncertain).



Markers tumorali

SCCA (carcinoma cervice)

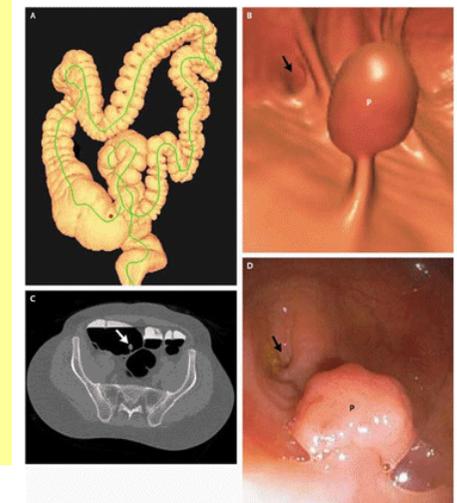
↑ **Benigno**: patologie cutanee, polmonari, patologie autoimmuni severe; ↑ in caso di contaminazione con saliva, sudore e secrezioni respiratorie (contaminazione da cute)

↑ **Maligno**: ↑ in presenza di varie neoplasie a cellule squamose (cute, polmone, collo e testa, esofago, colecisti, pene ed ano)

- NO differenze consistenti tra fumatori e non fumatori
- intervallo di riferimento: il 99% delle donne apparentemente sane presentano concentrazioni $< 1,9 \mu\text{g/L}$
- la concentrazione di SCCA ("squamous cell carcinoma antigen") presenta variazioni medie giornaliere pari al 24% circa → i valori di cut-off devono essere individualizzati

• l'utilizzo di questo marcatore deve essere considerato ancora prevalentemente di ricerca

Altri marcatori biochimici in fase di studio: CEA, hCG e citocheratine (TPA e CYFRA 21-1)



Markers tumorali

CA15-3

CA27.29

↑ **Benigno**: allattamento, condizioni di natura benigna (patologie dermatologiche, epatopatie benigne)

↑ **Maligno**: (>30 U/mL) : carcinoma mammella, carcinoma ovaio, utero, polmone e mieloma multiplo

- NO per screening, prima diagnosi ed in fase di staging (ridotta SENS/SPEC)
- **CA 15-3 è un marker di attività del CA della mammella**, ma non esiste un chiaro consenso circa le modalità di interpretazione dei dosaggi ripetuti in fase di terapia e di follow-up dei pazienti
- Elevate concentrazioni di CA15-3 in pazienti noti indica con elevata probabilità la presenza di metastasi → EGTM raccomanda l'utilizzo del CEA per la precoce rilevazione delle ricorrenze a distanza (scheletro e fegato)
- CV % interassay < 10% (EGTM)
- **CA 27.29: follow-up in pazienti noti con malattia avanzata**

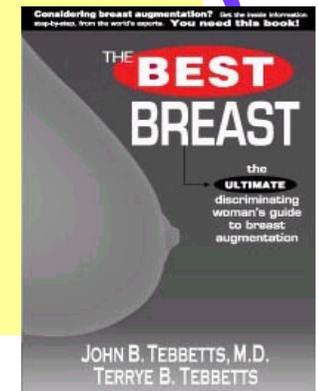




Table 12. Recommendations for use of markers in breast cancer by different expert groups. (Continued from page e48)

Marker(s)	Application	ASCO (242, 243, 375)	EGTM (371)	Joint EGTM/NACB (15)	ESMO ^a (372, 373)	St Gallen Conference (350, 374)	NCCN (621)	NACB 2008	SOR ^b
CA 15-3/ BR27.29	Surveillance following surgery	No	Yes	Yes	No	No ^c	No	May provide lead-time for early detection of metastasis but clinical value of lead-time unclear	C
CA 15-3/ BR27.29	Monitoring therapy in advanced disease	Yes, in selected cases, e.g., in absence of measurable disease	Yes	Yes	Yes, in non easily measurable disease	None published	None published	Yes, especially in patients with non-evaluable disease	C
CEA	Surveillance following surgery	No	Yes	None published	No	No ^c	None published	No	C
	Monitoring therapy in advanced disease	Yes, in selected cases, e.g., in absence of measurable disease	Yes	None published	No	None published	None published	Yes, as per ASCO and EUSOMA	C
BRCA1/ BRCA2	For identifying women at high risk of developing breast cancer	See ref. (324) for general guidelines on genetic testing for cancer susceptibility	None published	None published	None published	Yes	Yes	NACB supports documents of CGSC, ASCO, USPSTF and St Gallen Consensus Group (324, 350, 382–384)	B

^a ESMO, European Society of Clinical Oncology; NR, no recommendation published; CGSC, Cancer Genetics Studies Consortium; USPSTF, US Preventive Services Task Force.
^b SOR (520), A, high (further research is very unlikely to change the panel's confidence in the estimate of effect); B, moderate (further research is likely to have an important impact on the panel's confidence in the estimate of effect and is likely to change the estimate); C, low (further research is very likely to have an important effect on the panel's confidence in the estimate of effect and is likely to change the estimate); D, very low (any estimate of effect is very uncertain).
^c Recommendations state tumor markers without referring to specific markers.



13/05/2009

Markers tumorali

CEA (carcinoma colon-retto)

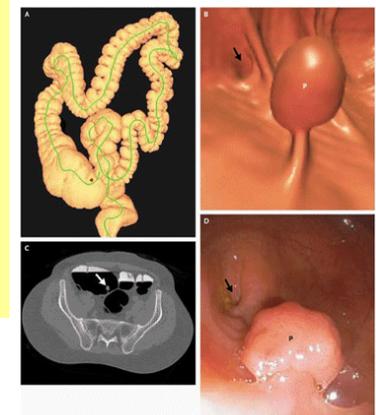
↑ **Benigno**: fumo (generalmente modesto incremento), epatite, cirrosi, pancreatite, malattie autoimmuni; ↑ in caso di contaminazione con saliva

↑ **Maligno**: CEA è considerato il marcatore di elezione (SENS/SPEC!!)

- NO per screening e per prima diagnosi a causa dell'elevato rate di FP
- ruolo primario è nel management dei pazienti noti come adiuvante nella stadiazione prognostica, nel monitoraggio di ricorrenza e nell'assessment di risposta alla terapia (ASCO, EGTM, NACB), ma:
 - incrementi del CEA si manifestano generalmente SOLO nei pazienti con malattia avanzata,
 - NON tutti i pazienti con CA ricorrente presentano elevazioni del CEA
 - elevate concentrazioni si possono avere in condizioni non correlate al CA
 - Le terapie citotossiche possono determinare transitori aumenti di concentrazione

- CV % interassay < 10% (EGTM)

13/05/2009



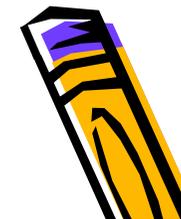
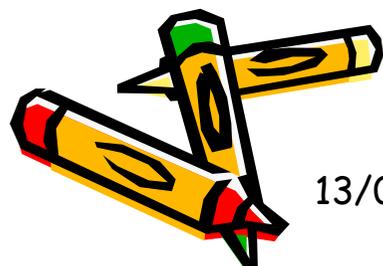


Table 9. Currently available markers for CRC.

Cancer marker	Proposed use/uses	Phase of development	LOE ^a	References
Blood-based markers				
CEA	Determining prognosis	Preoperative levels may provide prognostic information but this is rarely used for clinical purposes	III	(239–241)
	Surveillance following curative resection	In clinical use, usually in combination with radiology and clinical history	I	(251–255)
	Monitoring therapy in advanced disease	In clinical use, usually in combination with radiology and clinical history	III	(239–241)
CA19.9	Determining prognosis	Undergoing evaluation	III	(264–269)
	Surveillance following curative resection and monitoring therapy in advanced disease	Undergoing evaluation	IV	(262, 263)
CA 242	Determining prognosis	Undergoing evaluation	III	(270, 271)

Table 9. Currently available markers for CRC. (Continued from page e36)

Cancer marker	Proposed use/uses	Phase of development	LOE ^a	References
Fecal markers				
FOBT	Screening asymptomatic populations	Shown in randomized trials that screening with FOBT reduced mortality from CRC. Used for ad hoc CRC screening. Feasibility screening trials underway in a number of countries. Lacks sensitivity for early CRC and advanced adenomas and gives rise to many false-positive results	I	(300, 302–306)



13/05/2009





Markers tumorali

Neoplasie del Polmone

- La prognosi usualmente scadente di questi pazienti e la mancanza di effettiva terapia in caso di ricorrenza limitano notevolmente l'utilizzo dei marcatori biochimici
- EGTM ne indica l'utilizzo in diagnosi differenziale (se non è possibile giungere ad una diagnosi istologica – circa 20% dei casi) e nel monitoraggio di risposta alla terapia
- NO per screening nella popolazione generale e a rischio (fumatori) per la mancanza di sensibilità e di specificità di organo e di patologia
- NSE (enolasi neurone specifica – $\alpha\gamma$ isoenzima): \uparrow anche in neuroblastomi, carcinoidi intestinali; per SCLC (small cell lung carcinoma)
- CYFRA 21-1 (citocheratina 19): è il marcatore più specifico per NSCLC (carcinoma a cellule squamose, adenoCA, large cell carcinoma)
- CEA
- SCCA

In fase iniziale di utilizzo in routine: ProGRP (“pro-gastrin releasing peptide”) per SCLC



ISTOLOGIA	Marcatore baseline
Adenocarcinoma	CYFRA-21-1 CEA, SCCA
Carcinoma a cellule squamose	CYFRA-21-1, SCCA
Carcinoma a grandi cellule	CYFRA-21-1 CEA, SCCA
Carcinoma a piccole cellule	CYFRA-21-1 NSE
Sconosciuta	CYFRA-21-1 CEA, NSE

- NSE supporta la diagnosi di SCLC
- SCCA supporta la diagnosi di NSCLC ed in particolare di carcinoma a cellule squamose
- In generale CYFRA 21-1 ha la maggiore sensibilità per il carcinoma polmonare
- NSE è presente negli RBC, non utilizzare campioni emolizzati e separare rapidamente dal coagulo
- Contaminazione con cute e saliva per SCCA
- ↑ di CYFRA e SCCA in caso di insufficienza renale

I markers elevati alla baseline sono probabilmente i maggiormente rilevanti nel monitoraggio



Markers tumorali

PSA (Prostata)

- L'antigene prostatico specifico (PSA) è attualmente il marcatore di elezione nella valutazione della neoplasia prostatica
- La fosfatasi acida prostatica (PAP) NON apporta informazioni clinicamente significative ed il suo impiego NON è più indicato nelle linee-guida internazionali
- PSA è associato quasi esclusivamente alla patologia prostatica, ma non è specifica per la presenza di carcinoma e può essere in concentrazione aumentata anche nell'iperplasia prostatica benigna (BPH) e nelle prostatiti
- la mancanza di specificità e l'incapacità di predire l'aggressività della neoplasia rappresentano le principali limitazioni all'utilizzo clinico del PSA: non esiste un valore di cut-off applicabile a tutta la popolazione → circa il 25% dei pazienti con ca presenta normali valori di PSA e circa il 50% dei pazienti con patologia benigna ha elevate concentrazioni.
Un recente studio svizzero indica che un'elevata percentuale di carcinomi è diagnosticata con valori di PSA nell'intervallo 1-3 ng/mL
- l'intervallo di riferimento convenzionale è 0-4 ng/mL





Markers tumorali

PSA (Prostata)

- in fase di diagnosi (screening) il PSA non dovrebbe essere utilizzato da solo, ma con la procedura di esplorazione rettale (DRE) (NACB, EGTM, ACS)
- NACB, ma non EGTM, incoraggia l'utilizzo di intervalli di riferimento specifici per età e razza
- l'utilizzo del free-PSA è raccomandato come ausilio nel differenziare la patologia neoplastica da BPH in presenza di concentrazioni di PSA_t pari a 4-10 ng/mL → BPH è associata a maggiori concentrazioni di free-PSA ed il suo impiego può ridurre il numero di biopsie non necessarie in zona grigia (PSA_t 4-10 ng/mL)

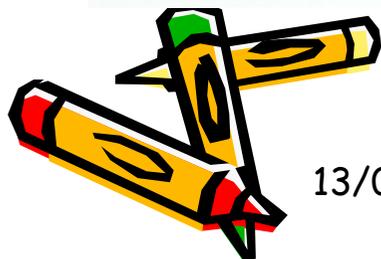
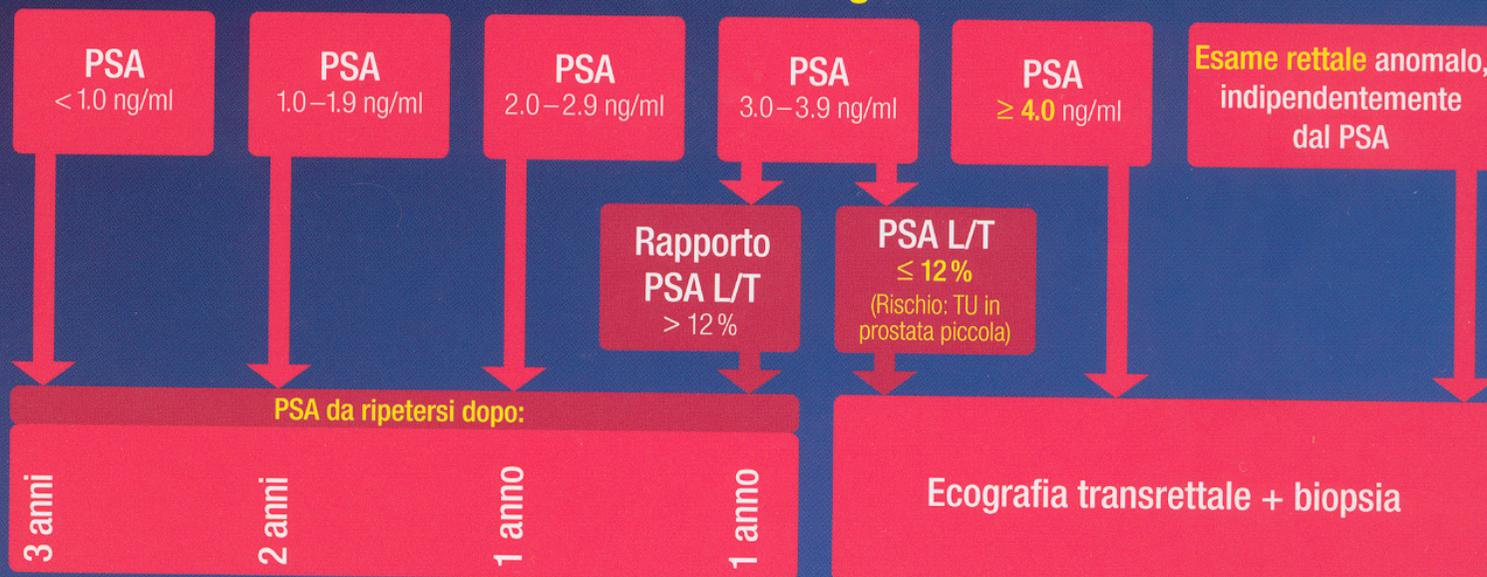
NACB raccomanda:

- il prelievo deve essere eseguito prima di ogni tipo di manipolazione della prostata, dopo 24 ore da un'eiaculazione in caso di dosaggio del free-PSA e parecchie settimane dopo la risoluzione di un episodio di prostatite
- i campioni devono essere centrifugati entro 3 ore dal prelievo ed il siero posto rapidamente a 4-8 °C; se il dosaggio viene differito oltre le 24 ore, il campione deve essere conservato a -20 °C (-70 °C per lunghi periodi di tempo)
- se viene impiegato un metodo ultrasensibile, il laboratorio deve indicare la minore concentrazione rilevabile



II. Accertamenti raccomandati se il paziente acconsente al programma di diagnosi precoce (informed consent)

1. PSA (incl. PSA libero)
2. Esame digito rettale



13/05/2009

I. Diagnosi precoce: decisione clinica individuale

→ Colloquio medico di famiglia – paziente

Fascia di età

- Senza anamnesi familiare positiva: 50 – 70 anni
- Con anamnesi familiare positiva: 45 – 70 anni (aspettativa di vita > 10 anni)

Indicazione di rischio

- Tumore più frequente (8 %)
- Seconda causa di morte di origine maligna (3 – 4%)

Beneficio

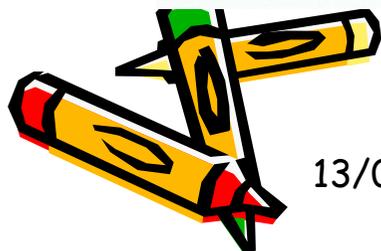
- Evidence Level A e B: vantaggio di sopravvivenza

Effetti collaterali

- Prostatectomia (DE: 35 – 70 % immediata postoperazione; incontinenza urinaria: 5 %)
- Radioterapia (DE: 35 – 70 % differita dopo 2 – 4 anni gastrointestinali: 5 – 8%, incontinenza d'urgenza: 5 %)

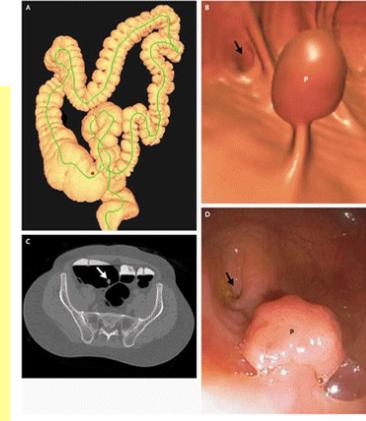
Consenso alla prevenzione

- PSA incl. PSA libero (iniziale) più esplorazione della prostata



Markers tumorali

CA19.9

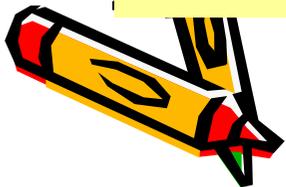


Benigno: pancreatite, epatite, cirrosi, malattie autoimmuni
Maligno (>37 U/L): carcinoma del pancreas, carcinoma del tubo gastroenterico, carcinoma epatico

CA50 e CA72.4 simili a CA19.9

Calcitonina

Maligno: carcinoma midollare tiroide, carcinoide, carcinoma bronchiale, feocromocitoma



Markers tumorali

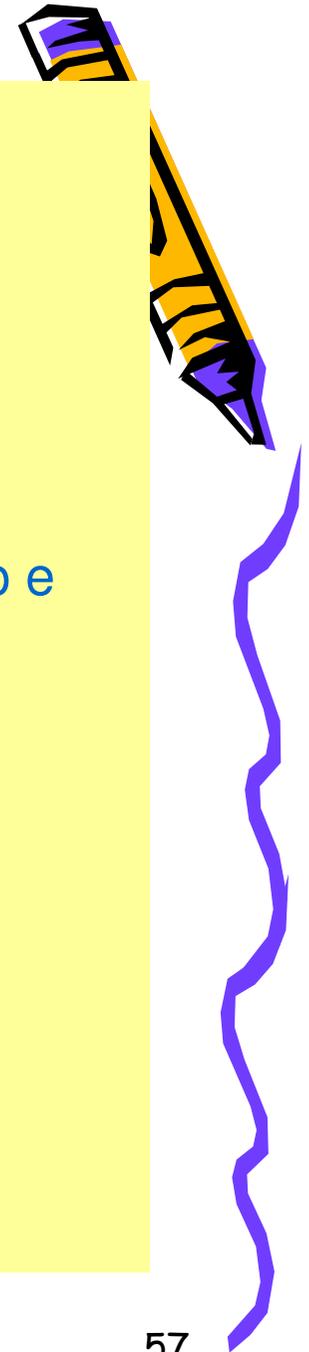
ACTH

↑Benigno: adenoma ipofisario

↑Maligno: carcinoma bronchiale, timoma, carcinoma pancreatico e midollare tiroideo

La sua secrezione è molto sensibile allo stress (con grandi variazioni indotte anche solo dal prelievo ematico, per cui un singolo valore va interpretato con grande cautela

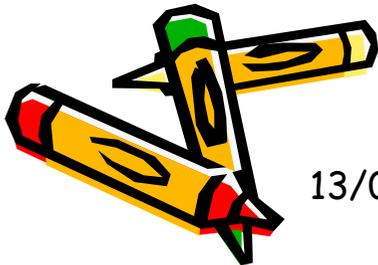
La molecola è instabile a temperatura ambiente (poche ore), degradata da enzimi circolanti, aderisce a vetro e superfici plastiche.



La fase preanalitica

Alcune molecole di interesse endocrinologico presentano una intrinseca fragilità che porta alla frammentazione da parte di enzimi proteolitici nel siero. Tali molecole, come **l'ACTH**, il glucagone, gli ormoni gastrointestinali, vanno conservati in EDTA in acqua ghiacciata fino alla separazione del plasma. E' certamente utile l'aggiunta di un antiproteolitico come l'aprotinina.

BREVE INTERVALLO ANALITICO



13/05/2009

Fase preanalitica

condizioni cliniche concomitanti

Generally liver and renal disease as well as inflammation and infection may cause elevated tumor marker concentrations. Benign diseases of tumor marker producing tissues also frequently cause elevated concentrations.

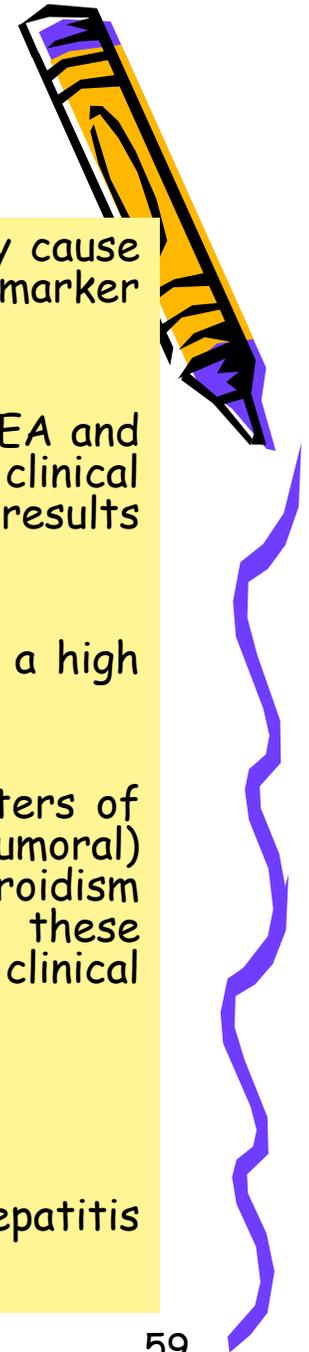
Renal failure is most likely to cause inappropriately elevated results for CEA and cytokeratins. For patients in this category this should be noted on the clinical report. Impaired renal clearance has also been reported to cause such results for hCG (36).

HCG may be persistently raised in menopausal women and/or women with a high normal level.

CA125 may be mildly elevated in endometriosis and the first two trimesters of pregnancy, and markedly raised in any patient with benign (non-tumoral) ascites. Levels >1000 kU/L have been reported in a patient with hypothyroidism and ascites. Careful interpretation of results for patients with these conditions is essential, and their implications should be noted on the clinical report.

CA125 may be markedly elevated in patients with heart failure.

CA125 may be elevated in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis [35% and 10% of patients respectively in one study].



Fase preanalitica

condizioni cliniche concomitanti



MUC-1 antigens (e.g. CA-15.3 and BR27.29) may be increased in some non-breast pathologies - both malignant (e.g. ovary, lung, myeloma) and non-malignant (e.g. dermatological conditions, colitis, benign hepatitis).

Markedly elevated levels of CA125 may be associated with recurrent ischemic strokes in patients with metastatic cancer.

Urinary tract infections and prostatitis may increase PSA markedly, and confirmatory specimens should be taken following successful antibiotic treatment.

CA19.9 may be increased in common benign gynecologic diseases including endometriosis and leiomyoma.

Cholestasis may markedly increase CA19.9 concentrations. For patients in this category this should be noted on the clinical report.

Transient increases in tumor marker concentrations may occur following chemotherapy.

Cannabis may transiently increase hCG.

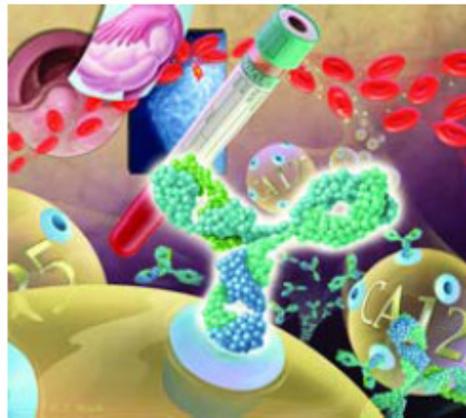
Smoking may slightly increase apparent CEA levels in some immunoassays.

Salivary contamination can markedly increase apparent concentrations of CEA, CA19.9 and tissue polypeptide specific antigen (TPS). If contamination is suspected a repeat specimen should be requested. [Where procedures are fully automated this is unlikely to be a problem.]



Serum Tumor Markers

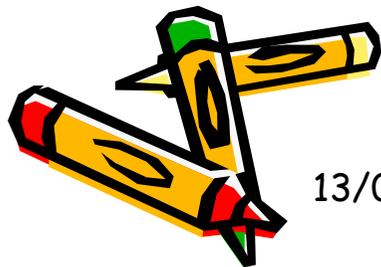
GREG L. PERKINS, M.D., EVAN D. SLATER, M.D., GEORGANNE K. SANDERS, M.D.,
and JOHN G. PRICHARD, M.D., Ventura County Medical Center, Ventura, California



SEPTEMBER 15, 2003 / VOLUME 68, NUMBER 6

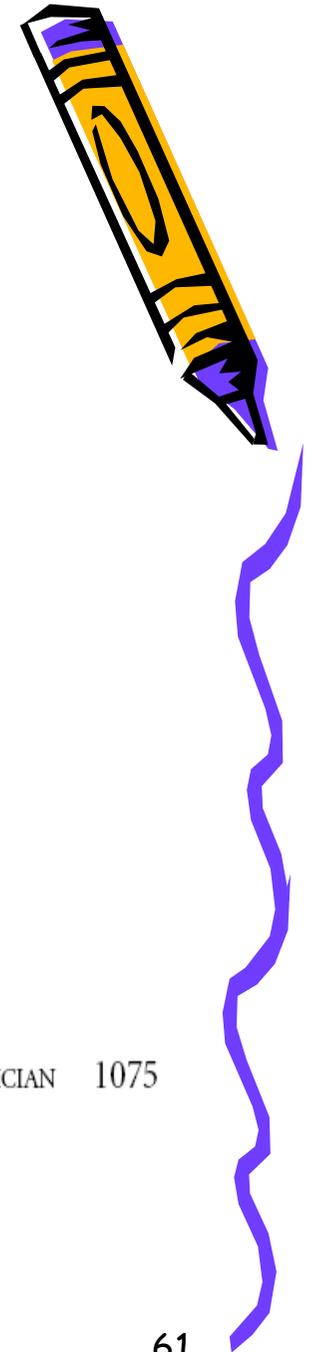
www.aafp.org/afp

AMERICAN FAMILY PHYSICIAN 1075



13/05/2009

61



National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Clinical Practice: Quality Requirements*

Catharine M. Sturgeon,^{1*} Barry R. Hoffman,² Daniel W. Chan,³ Soo-Ling Ch'ng,⁴ Elizabeth Hammond,⁵
Daniel F. Hayes,⁶ Lance A. Liotta,⁷ Emmanuel F. Petricoin,⁷ Manfred Schmitt,⁸ O. John Semmes,⁹
György Söletormos,¹⁰ Elena van der Merwe,² and Eleftherios P. Diamandis²

Clinical Chemistry 54:12
e11–e79 (2008)

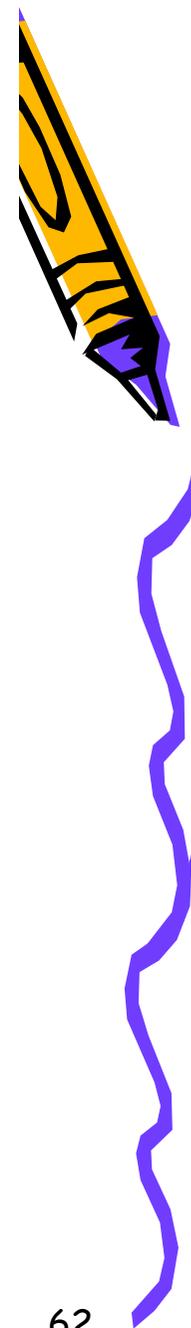
Special Report

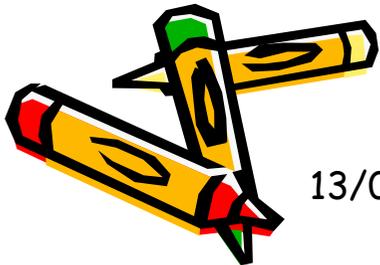
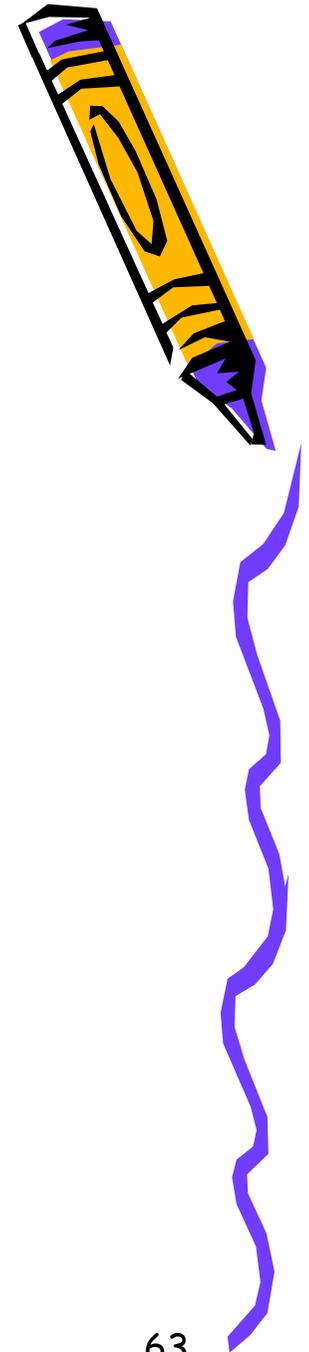
National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers

Catharine M. Sturgeon,^{1*} Michael J. Duffy,² Ulf-Håkan Stenman,³ Hans Lilja,⁴ Nils Brünner,⁵ Daniel W. Chan,⁶
Richard Babaian,⁷ Robert C. Bast, Jr.,⁸ Barry Dowell,⁹ Francisco J. Esteva,¹⁰ Caj Haglund,¹¹ Nadia Harbeck,¹²
Daniel F. Hayes,¹³ Mads Holten-Andersen,⁵ George G. Klee,¹⁴ Rolf Lamerz,¹⁵ Leendert H. Looijenga,¹⁶
Rafael Molina,¹⁷ Hans Jørgen Nielsen,¹⁸ Harry Rittenhouse,¹⁹ Axel Semjonow,²⁰ Ie-Ming Shih,⁶ Paul Sibley,²¹
György Söletormos,²² Carsten Stephan,²³ Lori Sokoll,⁶ Barry R. Hoffman,²⁴ and Eleftherios P. Diamandis²⁴

NACB SUB-COMMITTEE MEMBERS

Testicular Cancer: Ulf-Håkan Stenman, *Chair*; Rolf Lamerz; and Leendert H. Looijenga; *Prostate Cancer:*
Hans Lilja, *Chair*; Richard Babaian; Barry Dowell; George G. Klee; Harry Rittenhouse; Axel Semjonow;
Paul Sibley; Lori Sokoll; and Carsten Stephan; *Colorectal Cancer:* Nils Brünner, *Chair*; Michael J. Duffy;
Caj Haglund; Mads Holten-Andersen; and Hans Jørgen Nielsen; *Breast Cancer:* Michael J. Duffy, *Chair*;
Francisco J. Esteva; Nadia Harbeck; Daniel F. Hayes; and Rafael Molina; *Ovarian Cancer:* Daniel W. Chan,
Chair; Robert C. Bast, Jr.; Ie-Ming Shih; Lori J. Sokoll; and György Söletormos





13/05/2009