

Proteina 4 dell'epididimo umano (HE4) e diagnosi di cancro dell'ovaio

Simona Ferraro, Federica Braga, Mauro Panteghini

Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi, Milano

Il presente contributo è stato selezionato fra i poster presentati in occasione del 18° Simposio Ligand Assay 2012 per l'assegnazione del premio ELAS Italia

RIASSUNTO *Una recente revisione sistematica della letteratura ha dimostrato la superiorità della determinazione nel siero della proteina 4 dell'epididimo umano (HE4) rispetto a quella del CA125 nella capacità di identificare il cancro dell'ovaio, incoraggiandone l'introduzione nella pratica clinica. Quindi, nonostante anche le più recenti linee guida considerino ancora il CA125 come marcatore di riferimento e suggeriscano l'aggiunta del dosaggio di HE4 solo per migliorarne la specificità diagnostica, si avverte attualmente una carenza di dati a supporto dei benefici che la valutazione combinata dei due marcatori potrebbe fornire. La possibile introduzione di HE4 come unico marcatore di riferimento richiede tuttavia una certa cautela. Infatti, la qualità delle evidenze disponibili è fortemente condizionata da importanti limiti riconducibili al disegno degli studi, all'eterogeneità delle casistiche considerate e ad alcune problematiche metodologiche. In particolare, non sono disponibili dati che confrontino i differenti metodi di dosaggio e, di conseguenza, consentano di definire, nei vari studi, quanto le soglie diagnostiche adottate per HE4, dipendano dal metodo. E' quindi assolutamente necessaria una robusta valutazione della confrontabilità tra i metodi di dosaggio al fine di permettere o meno di generalizzare le evidenze disponibili e attribuire a HE4 un reale valore clinico. Infine, lo studio della variabilità biologica del marcatore potrà da un lato permetterne l'applicazione ottimale in clinica, attraverso la definizione dei traguardi analitici della sua misura, e dall'altro suggerire adeguati modelli interpretativi della variazione delle concentrazioni del marcatore nel siero in caso di valutazioni longitudinali nel singolo individuo.*

Parole Chiave: *Evidenza; Soglia decisionale; Cancro dell'ovaio; Biomarcatore*

ABSTRACT *Human epididymis protein 4 (HE4) and ovarian cancer diagnosis. A recent systematic review has shown the highest capability of determination of human epididymis protein 4 (HE4) vs carbohydrate antigen 125 (CA125) in serum to rule ovarian cancer (OC) in, thus suggesting the introduction of HE4 in clinical practice. Although current guidelines yet recommend CA125 as reference marker for OC detection, recommending in case its combined measurement with HE4 to increase the diagnostic specificity, several authors disagree on the cost-effectiveness of CA125 and HE4 co-detection. On the other hand, the definitive clinical implementation of HE4 still requires some caution in relation to the quality of available researches, threatened by important gaps related to the design of studies, to the heterogeneity of enrolled populations and to some analytical issues. In particular, a cautionary interpretation of study results due to wide differences in the performance of employed assays and in adopted diagnostic thresholds for HE4 is advised. As a consequence, aspects concerning assay comparability and the possibility to harmonize decision thresholds across various assays should be considered to improve the quality of the evidence and to assign a definitive clinical role to HE4. Finally, the study of biological variability of HE4 is central for assuring an objective establishment of analytical goals for the optimal clinical application of the marker measurement and to aid in selecting adequate interpretation strategies of marker concentration changes in the individual.*

Key-words: *Evidence; Decisional threshold; Ovarian cancer; Biomarker*

INTRODUZIONE

Il cancro dell'ovaio (CO) costituisce la prima causa di morte per tumore ginecologico, essendo diagnosticato in ~3/4 dei casi in stadio avanzato, con un associato tasso di sopravvivenza del 15-20%¹. I dati epidemiologici recenti, dimostrando un tasso di sopravvivenza negli stadi precoci del CO molto più alto (80-90%), hanno fatto emergere la necessità di introdurre nella pratica clinica nuovi biomarcatori, che, rispetto al marcatore tradizionale, il CA125), siano caratterizzati da una migliore accuratezza diagnostica tale da consentire una precoce identificazione del tumore nelle pazienti con evidenza di massa pelvica².

Nell'ampio spettro di biomarcatori in corso di valutazione³, numerosi studi hanno recentemente dimostrato che il dosaggio nel siero della proteina 4 dell'epididimo umano (*Human Epididymis protein 4*, HE4) è caratterizzato da una specificità diagnostica significativamente superiore a quella del CA125, tale da ipotizzare un miglioramento clinicamente rilevante nell'identificazione della malignità⁴⁻¹⁹. Il proliferare degli studi è stato, almeno in parte, conseguente alla disponibilità del dosaggio in automazione su alcune comuni piattaforme analitiche e anche allo sviluppo di nuovi algoritmi diagnostici basati su entrambi i marcatori²⁰. Sulla scorta di questi dati si è andata rafforzando l'ipotesi di introdurre la determinazione di HE4 nel laboratorio clinico, affiancandola al dosag-

gio del CA125²¹. Questo sta portando a una diffusione del dosaggio di HE4 e all'impiego del marcatore in contesti clinici, sebbene le problematiche di interpretazione del test (identificazione e utilizzo corretto dell'algoritmo diagnostico o definizione del limite decisionale ottimale) non siano ancora state del tutto risolte.

DATI CONSOLIDATI

Recentemente abbiamo effettuato una revisione sistematica (RS) e una meta-analisi della letteratura disponibile, volte a confrontare le prestazioni diagnostiche di CA125 e HE4²². I risultati dello studio hanno senza dubbio evidenziato la necessità di iniziare a considerare seriamente l'introduzione del dosaggio di HE4 nel laboratorio clinico, affrontando gli aspetti metodologici, oltre che quelli interpretativi del test. Infatti, al di là della valutazione cumulativa e oggettiva dell'accuratezza diagnostica dei due marcatori, resa possibile dalla metodologia meta-analitica, il lavoro ha messo in luce i limiti delle evidenze disponibili in letteratura (in termini sia di forza che di livello), attribuibili sia al disegno degli studi che a problematiche di tipo metodologico (es. definizione e uniformità dei limiti decisionali almeno a livello dello stesso metodo, mancanza di dati sulla confrontabilità dei risultati ottenuti con i metodi disponibili).

Nella RS sono stati selezionati 16 articoli su un totale di 252 disponibili nelle banche dati fino a gennaio 2012, eleggibili per il confronto tra le prestazioni diagnostiche dei due marcatori. La selezione ha utilizzato criteri stringenti, quali indipendenza della diagnosi dal risultato del marcatore, confronto delle prestazioni diagnostiche rispetto a un *gold standard* indipendente e rappresentatività della popolazione indagata (donne con sospetto CO in un contesto di patologia ginecologica). La qualità degli studi è stata preliminarmente valutata in accordo ai criteri del QUADAS II²³, volti a identificare le possibili fonti di *bias* nella selezione delle pazienti, nella somministrazione dei test e dello standard di riferimento, così come le relative problematiche di applicabilità. La qualità delle evidenze è stata poi caratterizzata sulla base dei criteri GRADE²⁴. Il risultato principale dello studio, ottenuto con il calcolo dei rapporti di verosimiglianza positivo (LR+) e negativo (LR-), che combinano sensibilità e specificità del marcatore, ha permesso di definire che non solo HE4 ha una specificità significativamente maggiore di CA125, come concludono praticamente tutti gli studi individuali pubblicati, ma soprattutto il peso che questa specificità assume nella diagnosi clinica. Dal confronto tra LR+ dei due marcatori è emersa la netta superiorità della misura di HE4 [LR+13,0 (95% IC:8,2-20,7) vs 4,2 (95% IC:3,1-5,6) per il CA125], dando sufficiente rilevanza diagnostica per il CO al solo HE4 e confermando la scarsa potenzialità in fase diagnostica del CA125. D'altra parte, entrambi i marcatori mostravano LR- relativamente alti, indicando una scarsa capacità di escludere la presenza di OC, almeno in un *setting* di secondo livello (paziente ad alto rischio). In questo contesto è importante considerare che circa il 10% dei CO non è di origine epiteliale e di conseguenza non è diagnosticabile né con il dosaggio di CA125 né con quello di HE4, per cui la ricerca di marcatori addizionali

dovrebbe anche essere finalizzata alla rilevazione di questa frazione residua³.

Nonostante le superiori potenzialità di HE4 nell'identificazione della malignità suggeriscano la sua eventuale implementazione nella pratica clinica in termini di sostituzione di CA125 e non una valutazione combinata dei due test, attualmente non è ancora stata considerata una revisione delle raccomandazioni in tal senso. In particolare, l'indicazione di effettuare in fase diagnostica la determinazione simultanea di entrambi i marcatori, mantenendo CA125 come marcatore di riferimento e/o includendo entrambi in algoritmi diagnostici, non solo non sembra *evidence-based*, ma si pone in antitesi con gli obiettivi di costo-efficacia. Una recente simulazione statistica ha valutato quali possano essere i requisiti minimi di un biomarcatore utile nella diagnosi precoce del CO (intesa come diagnosi di tumore di piccolo volume)²⁵. Il modello matematico utilizzato ha dimostrato che per identificare una massa tumorale dell'ordine di 1 mm, il marcatore deve essere caratterizzato da elevata specificità oppure deve essere determinabile con metodi a elevata sensibilità analitica²⁵. Queste conclusioni incoraggiano l'eventuale introduzione di HE4 come marcatore diagnostico di riferimento nella diagnosi di CO, anche se attualmente mancano dati clinici sulla sua efficacia diagnostica negli stadi precoci. D'altro canto, questi risultati suggeriscono di approfondire la valutazione delle prestazioni metodologiche degli immunodosaggi per HE4 e definire gli obiettivi analitici, prima di consolidare l'utilizzo clinico del marcatore. E' utile ricordare che sia la *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB) americana che il Gruppo Europeo dei Marcatori Tumorali (EGTM) hanno rilasciato una serie di raccomandazioni relative agli aspetti metodologici che devono essere affrontati nel caso di impiego di marcatori tumorali nella pratica clinica, quali stabilità dei reagenti, interferenze sul dosaggio, programmi di controllo di qualità, adozione di livelli decisionali appropriati e impiego di protocolli adeguati per il confronto tra metodi da effettuare prima del passaggio a un saggio alternativo^{26,27}.

INTRODUZIONE DI HE4 NELLA PRATICA CLINICA: COME E QUANDO

Per poter adeguatamente rispondere a queste domande, dobbiamo innanzitutto considerare le valutazioni relative a qualità e applicabilità dei risultati dei singoli studi esaminati nella RS²². Infatti, nello studio sono emerse importanti limitazioni che dovrebbero essere risolte prima di considerare l'eventuale applicazione dell'esame nei diversi contesti clinici (screening, diagnostica di primo o secondo livello). La RS ha evidenziato limiti qualitativi nei disegni degli studi, nella metodologia della ricerca e nella formulazione degli obiettivi, spesso non in grado di rispondere a importanti quesiti clinici, quali valutazione dell'efficacia di HE4 negli stadi precoci del tumore e nelle donne in post-menopausa. Ulteriori limiti, sia qualitativi che di applicabilità dei risultati, sono stati poi ricondotti a problematiche metodologiche (mancanza di dati sulla confrontabilità dei metodi, definizione dei limiti decisionali), che si riflettono sull'interpretazione clinica delle concentrazioni sieriche del marcatore.

Qualità della ricerca e quesito clinico

Oltre a importanti differenze nel disegno degli studi [studi retrospettivi trasversali (n=9), caso-controllo (n=4) e studi prospettici (n=3)], si è osservata una certa eterogeneità tra le casistiche considerate, sostanzialmente ascrivibile al contesto clinico da cui sono state reclutate le pazienti (Dipartimenti di Ginecologia-Ostetricia o di Ginecologia Oncologica) e ai criteri di selezione²². Tale eterogeneità implica che le popolazioni valutate siano caratterizzate da probabilità pre-test anche molto differenti, come risulta dall'ampio intervallo di valori assunto dalla prevalenza del CO nei vari studi (da 15% a 63%), che a sua volta si ripercuote sulla stima delle prestazioni diagnostiche di HE4, che risultano ampiamente variabili nell'ambito degli studi considerati, e non ultimo aumenta il rischio di sovrastima delle capacità diagnostiche del marcatore. Una ulteriore fonte di *bias* è poi associabile alla distribuzione non uniforme di pazienti caratterizzati da diverso stato ormonale, stadio tumorale e tipo istologico. Vi è quindi una necessità primaria di studi prospettici che rafforzino le evidenze, che, seppur buone, al momento rimangono preliminari.

Come anticipato, migliorare il disegno dello studio non è tuttavia sufficiente se gli obiettivi non rispondono all'esigenza clinica di identificare precocemente il tumore. In tal senso, il quesito clinico a cui gli studi dovrebbero rispondere è se l'introduzione del nuovo marcatore possa significativamente ridurre il numero di diagnosi tardive²⁸. Nonostante i buoni risultati relativi all'efficacia diagnostica di HE4 e sulla sua applicabilità clinica, non sono ancora disponibili evidenze sufficienti e robuste relative ai soli stadi precoci del tumore²². Relativamente al CA125 è noto che concentrazioni sieriche al di sopra della soglia decisionale sono osservabili in ~50% dei CO in stadio I e ~90% dei CO in stadio II²⁹. Per HE4 non è ancora possibile derivare un dato definitivo dagli studi disponibili, stante il numero esiguo di soggetti arruolati, né è possibile cumulare i dati dei singoli studi data l'eterogeneità del disegno, le differenze nei saggi utilizzati e nelle soglie decisionali applicate (Tab. 1)^{6,16,18}.

Un altro aspetto da definire è quello relativo alle pre-

stazioni diagnostiche del marcatore nel sottogruppo di donne in post-menopausa, per le quali sia il rischio di CO che le concentrazioni di HE4 sono maggiori rispetto a quanto descritto per l'età fertile³⁰. Numerose valutazioni di HE4 riferite allo stato menopausale sono disponibili, ma la maggior parte di esse non ottempera i criteri di qualità precedentemente discussi. Ad oggi, solo 7 studi hanno caratteristiche di base idonee per dare indicazioni in proposito anche se, ancora una volta, i risultati devono essere interpretati con una certa cautela a causa delle eterogeneità delle fonti (Tab. 2)^{5,7,12,18,21,31,32}.

Prestazioni analitiche e confrontabilità dei risultati

Il laboratorio ha un ruolo fondamentale nell'orientare in maniera corretta l'impiego clinico degli indicatori biochimici di neoplasia, in termini di adeguatezza metodologica, appropriatezza della richiesta e interpretazione dei risultati^{33,34}. Innanzitutto, il laboratorio deve affrontare e discutere una serie di aspetti metodologici, possibilmente prima che un nuovo marcatore venga introdotto nella pratica clinica. Nell'era della riferibilità metrologica, una prima informazione deve riguardare il grado di confrontabilità e di equivalenza tra i risultati ottenuti con i saggi commercialmente disponibili, con lo scopo finale di indicare al clinico la dipendenza o meno dell'accuratezza diagnostica del marcatore dal suo metodo di misura^{35,36}. Conseguire l'armonizzazione dei metodi risponde agli scopi delle linee guida, che hanno come prerogativa l'adozione di limiti di riferimento e livelli decisionali comuni ai vari metodi, al fine di ottenere un'applicazione efficace delle raccomandazioni^{37,38}. La mancanza di dati di confronto tra saggi non permette di "correggere", nel tentativo di renderli omogenei e quindi universalmente utilizzabili, i risultati del marcatore estratti da studi che hanno utilizzato metodi differenti, con perdita dell'esperienza clinica accumulata. Per il CA125 è stata dimostrata una comparabilità abbastanza buona tra i risultati ottenuti con vari metodi commerciali, cosa che ha portato a impiegare un unico livello decisionale (35 kU/L) per tutti i saggi³⁹.

Tabella 1

Studi che hanno valutato le prestazioni di HE 4 nella diagnosi di cancro dell'ovaio (CO) in stadio precoce (stadio I e II secondo la Federazione Internazionale di Ginecologia e Obstetricia).

Autori (riferimento bibliografico)	No. di pazienti (CO stadio precoce vs malattie ginecologiche benigne)	Metodi	Livello decisionale	Sensibilità (95% IC)	Specificità (95% IC)	LR+ (95% IC)	LR- (95% IC)
Escudero et al. (6)	24 vs 289	Abbott Architect	140 pmol/L	0,58 (0,37-0,78)	0,99 (0,96-1,00)	42,2 (15,0-118,1)	0,42 (0,26-0,68)
Abdel-Azeez et al. (16)	13 vs 24	Fujirebio ELISA manuale	72 pmol/L	0,85 (0,55-0,98)	0,75 (0,53-0,90)	3,4 (1,6-7,0)	0,21 (0,06-0,75)
Nolen et al. (18)	63 vs 158	Luminex multiplexed ELISA	18421 pmol/L	0,84 (0,73-0,92)	0,70 (0,62-0,77)	2,8 (2,1-3,7)	0,23 (0,13-0,40)

IC, intervallo di confidenza; LR+, rapporto di verosimiglianza positivo; LR-, rapporto di verosimiglianza negativo.

Tabella 2

Studi che hanno valutato le prestazioni di HE 4 nella diagnosi di cancro dell'ovaio (CO) in donne in post-menopausa

Autori (riferimento bibliografico)	No. di pazienti (CO vs MGB)	Metodi	Livello decisionale	Sensibilità (95% IC)	Specificità (95% IC)	LR+ (95% IC)	LR- (95% IC)
Nolen et al. (18)	169 vs 140	Luminex multiplexed ELISA	18421 ng/L	0,83 (0,77-0,89)	0,84 (0,77-0,90)	5,3 (3,6-7,8)	0,20 (0,14-0,28)
Bandiera et al. (5)	87 vs 96	Abbott Architect	140 ng/L	0,78 (0,68-0,86)	0,99 (0,94-1,00)	75,0 (10,6-528,9)	0,22 (0,15-0,33)
Molina et al. (7)	84 vs 59	Abbott Architect	150 ng/L	0,85 (0,75-0,91)	0,95 (0,86-0,99)	16,6 (5,5-50,3)	0,16 (0,10-0,27)
Van Gorp et al. (12)	119 vs 86	Fujirebio ELISA manuale	150 ng/L	0,53 (0,44-0,61)	0,92 (0,84-0,97)	6,5 (3,1-13,5)	0,51 (0,42-0,63)
Karlsen et al. (21)	203 vs 279	Abbott Architect	140 ng/L	0,82 (0,76-0,87)	0,90 (0,85-0,93)	7,9 (5,5-11,2)	0,20 (0,15-0,27)
Novotny et al. (31)	21 vs 256	Abbott Architect	140 ng/L	0,71 (0,48-0,89)	0,88 (0,83-0,91)	5,7 (3,8-8,7)	0,33 (0,17-0,64)
Chan et al. (32)	43 vs 53	Abbott Architect	112 ng/L	0,53 (0,38-0,69)	0,98 (0,90-1,00)	28,4 (4,0-201,5)	0,47 (0,34-0,65)

IC, intervallo di confidenza; LR+, rapporto di verosimiglianza positivo; LR-, rapporto di verosimiglianza negativo.

Per definire accettabili per l'applicazione clinica le prestazioni analitiche di un metodo, è indispensabile identificare preliminarmente gli obiettivi analitici della misura. E' importante per esempio considerare che, se un metodo ha un *bias* analitico che non rientra nei limiti di accettabilità, questo può produrre una variazione sistematica dei risultati del marcatore, che può influenzare radicalmente il percorso clinico del paziente, riflettendosi anche sui costi assistenziali⁴⁰. Esiste oggi un accordo ampio sul fatto che lo studio della variabilità biologica dell'analita, con definizione dei relativi parametri (variabilità intra- e inter-individuale, indice di individualità), rappresenti l'approccio più obiettivo e praticabile per derivare gli obiettivi analitici della misura e per definire, con riferimento all'indice di individualità, l'applicabilità degli intervalli di riferimento e delle soglie decisionali. Dati sulla variabilità biologica di HE4 non sono ancora disponibili, mentre ci sono informazioni per quella del CA125⁴¹⁻⁴³.

Strategie per l'interpretazione dei risultati

L'ottimizzazione delle soglie decisionali di HE4 rappresenta uno degli obiettivi principali per conseguire un reale miglioramento del percorso clinico della paziente mediante l'impiego di questo marcatore. Da quanto è emerso dalla RS, i livelli decisionali di HE4 adottati nei diversi studi possono ampiamente differire anche quando si impieghi lo stesso metodo di dosaggio²². Anche facendo riferimento solamente ai livelli decisionali raccomandati dalle ditte produttrici e riportati nelle metodiche

per i rispettivi kit, si confermano ampie differenze, che persistono anche quando i saggi impieghino gli stessi anticorpi monoclonali e differiscano soltanto nella tecnica di rilevazione della reazione antigene-anticorpo. Un altro degli aspetti emersi nella RS è quello che soltanto alcuni autori considerano livelli decisionali differenziati per stato ormonale²². In tal senso, non ci sono raccomandazioni specifiche, nonostante sia noto da tempo l'effetto dello stato ormonale sul marcatore, con concentrazioni di HE4 quasi raddoppiate nella post-menopausa rispetto all'età fertile^{30,44}.

Un concetto emerso recentemente è quello relativo ai limiti intrinseci all'impiego della valutazione trasversale dei risultati degli indicatori di neoplasia impiegando soglie decisionali prestabilite, sia in fase diagnostica che di monitoraggio del tumore⁴⁵. Del resto la letteratura ha dato ampia dimostrazione della limitata (per non dire nulla) utilità di CA125 nella diagnosi di CO, soprattutto quando si consideri il test positivo/negativo sulla base del limite decisionale^{46,47}. Già in un contesto di screening, la valutazione dell'andamento longitudinale di CA125, definito mediante dosaggi seriat, ha significativamente aumentato sia la sensibilità che la specificità diagnostica del marcatore^{48,49}. La valutazione delle cinetiche plasmatiche del marcatore non può tuttavia essere considerata affidabile nel monitoraggio delle pazienti in chemioterapia con derivati del platino: in questo caso un andamento in ascesa non riflette la resistenza al trattamento, ma semplicemente la somministrazione del farmaco, così come flessioni estemporanee di andamenti ascendenti possono esclusivamente riflettere l'attività del

trattamento ormonale con tamoxifene⁴⁷.

I limiti degli approcci interpretativi fin'ora descritti hanno costituito il razionale alla base dello sviluppo e validazione di algoritmi diagnostici, che includessero le concentrazioni di CA125 e HE4, o in alternativa le rispettive variazioni, insieme a una serie di dati biologici e strumentali (età, parametri ultrasonografici), e che fossero applicabili ai diversi contesti diagnostici (screening, diagnostica di primo/secondo livello)^{49,50}. Al momento dell'introduzione del dosaggio di HE4, alcune ditte produttrici di kit hanno raccomandato l'interpretazione del marcatore in accordo con un algoritmo di rischio per CO, il cosiddetto *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* (ROMA™) da utilizzare nelle pazienti con massa pelvica⁵⁰. Nonostante l'impiego dell'algoritmo ROMA sia stato autorizzato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) americana, la sua validazione clinica è stata ampiamente criticata, evidenziando risultati discrepanti e controversi relativamente alla sua accuratezza diagnostica quando confrontata con il singolo dosaggio dei marcatori CA125 e HE4^{12,51,52}. Una recente RS ha riportato per l'algoritmo ROMA un'accuratezza diagnostica superiore a quella del dosaggio di CA125, evidenziando inoltre una sensibilità diagnostica superiore a quella della determinazione isolata di HE4⁵³. Tuttavia, questi risultati dovrebbero essere considerati con una certa cautela alla luce delle numerose limitazioni dei singoli studi inclusi nella meta-analisi. In particolare, la maggior parte di questi studi ha adottato soglie decisionali differenti per HE4 o, comunque, ha impiegato un solo limite decisionale per tutta la popolazione indipendentemente dallo stato ormonale. Quindi, il rischio di sottostimare l'efficacia diagnostica di HE4 era elevato.

In aggiunta al ROMA, lo sviluppo di nuovi e più complessi algoritmi, che considerano le variazioni nelle concentrazioni dei biomarcatori a partire da dosaggi seriati, è stato incoraggiato dalla promettente associazione riscontrata tra valutazione dell'andamento longitudinale dei biomarcatori e anticipazione diagnostica. Risultati preliminari dimostrano che algoritmi basati su una interpretazione longitudinale del marcatore possono avere un'accuratezza diagnostica superiore a quelli che più semplicemente incorporano il dato dicotomico, definito sulla base di una soglia decisionale⁴⁹.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'introduzione nell'impiego clinico di nuovi biomarcatori per la diagnosi di CO deve fare i conti con una serie di requisiti, che derivano dalla bassa prevalenza della patologia e dalla difficoltà nel dimostrare, soprattutto a breve termine, benefici in termini di sopravvivenza. In particolare, per il marcatore candidato è necessario dimostrare, al di là della prestazione diagnostica superiore a quella del marcatore tradizionale, un valore informativo addizionale che sia rilevante ai fini di migliorare significativamente la rilevazione del CO. Inoltre, anche l'eterogeneità istologica del CO può condizionare la scelta dei biomarcatori, privilegiando quelli in grado di identificare gli istotipi più aggressivi, ad elevato tasso di mortalità, come i CO sierosi ad alto grado. E' stato riportato che, sebbene questo istotipo esprima preferenzialmente

CA125, il dosaggio sierico di questo marcatore non permette di riconoscere con sufficiente accuratezza la patologia in uno stadio precoce, quando il trattamento risulterebbe maggiormente efficace. Al di là della scarsa sensibilità, è tuttavia la bassa specificità del CA125 che limita fortemente la capacità del marcatore di identificare la malignità, costringendo, a causa dell'elevato numero di risultati falsi positivi, a incrementare il numero di indagini strumentali di secondo livello con esito poi negativo.

Tra tutti i nuovi marcatori recentemente proposti, solo il dosaggio sierico di HE4 ha consentito di ottenere risultati che si sono dimostrati superiori a quelli del CA125²². Essendo espresso dagli stessi istotipi tumorali che esprimono CA-125, il dosaggio di HE4 mostra tuttavia una sensibilità diagnostica simile a quest'ultimo e la determinazione congiunta dei due marcatori non sembra aumentare in maniera significativa il numero di CO identificati⁵¹.

In questo lavoro, abbiamo cercato di focalizzare i più importanti aspetti che rimangono da chiarire: le prestazioni diagnostiche di HE4 negli stadi precoci della neoplasia e nelle donne in post-menopausa, come anche, al fine di assicurare l'inferenza dei risultati, un'evidenza che sia valida per tutti i metodi di dosaggio ed estensibile a tutti i laboratori e ai relativi contesti clinici per i quali sarebbe appropriata la valutazione del marcatore. Quindi, se da una parte è irrinunciabile procedere a un miglioramento del disegno e della metodologia degli studi, dall'altra il laboratorio deve dare risposta ai quesiti metodologici ancora insoluti e fortemente condizionanti livello e forza delle evidenze scientifiche. Una maggior attenzione deve essere rivolta alla valutazione delle prestazioni dei metodi, alla confrontabilità o meno dei risultati, così come alla definizione di strategie più appropriate per interpretare le concentrazioni del marcatore. Rispetto al CA125, a favore di HE4 sta la caratterizzazione completa della struttura della proteina, fondamentale premessa per individuare e risolvere le possibili limitazioni metodologiche (stabilità degli anticorpi, sensibilità analitica, mancanza di armonizzazione dei metodi). Lo studio della variabilità biologica di HE4, oltre che stabilire gli obiettivi analitici per il corretto impiego clinico del marcatore, permetterà di meglio definire gli approcci interpretativi più appropriati.

E' evidente che, come sempre accade nel momento dell'introduzione di un nuovo esame, il laboratorio assume un ruolo centrale, che si estende dal controllo dell'appropriatezza della richiesta, attraverso la scelta della metodologia analitica adeguata, fino alla corretta interpretazione del risultato. E' in questa prospettiva che riteniamo sia importante "pensare" l'introduzione di HE4. Facendo riferimento a un percorso di governo clinico, è necessario non dimenticare che il rapporto costo-beneficio associato all'impiego di un biomarcatore coinvolge diverse componenti (oncologi, medici di medicina generale, laboratoristi, pazienti, amministratori), che ordinano, eseguono, interpretano, beneficiano e definiscono il rimborso dell'esame⁵⁴. E' importante ricordare che a volte l'introduzione di un nuovo marcatore ha modificato non solo il percorso clinico, ma anche i modelli di rimborso. Tuttavia, perché questo avvenga è necessario produrre evidenze cliniche sufficientemente robuste da essere incluse in linee guida e raccomandazioni⁵⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. **Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al.** GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 2010. <http://globocan.iarc.fr> (Accessed May 2012)
2. **Fountain J, Trimble E, Birrer MJ.** Summary and discussion of session recommendations. *Gynecol Oncol* 2006;103:S23-25
3. **Su Z, Graybill WS, Zhu Y.** Detection and monitoring of ovarian cancer. *Clin Chim Acta* 2013;415:341-5
4. **Park Y, Kim Y, Lee EY, et al.** Reference ranges for HE4 and CA-125 in a large Asian population by automated assays and diagnostic performances for ovarian cancer. *Int J Cancer* 2012;130:1136-44
5. **Bandiera E, Romani C, Specchia C, et al.** Serum human epididymis protein 4 and risk for ovarian malignancy algorithm as new diagnostic and prognostic tools for epithelial ovarian cancer management. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:2496-506
6. **Escudero JM, Auge JM, Filella X, et al.** Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem* 2011;57:1534-44
7. **Molina R, Escudero JM, Augé JM, et al.** HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biol* 2011;32:1087-95
8. **Holcomb K, Vucetic Z, Miller MC, et al.** Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:358.e1-6
9. **Chang X, Ye X, Dong L, et al.** Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:852-8
10. **Ruggeri G, Bandiera E, Zanotti L, et al.** HE4 and epithelial ovarian cancer: comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm. *Clin Chim Acta* 2011;412:1447-53
11. **Jacob F, Meier M, Caduff R, et al.** No benefit from combining HE4 and CA-125 as ovarian tumor markers in a clinical setting. *Gynecol Oncol* 2011;121:487-91
12. **Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, et al.** HE4 and CA-125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer* 2011;104:863-70
13. **Montagnana M, Danese E, Ruzzenente O, et al.** The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful? *Clin Chem Lab Med* 2011;49:521-5
14. **Yip P, Chen TH, Seshiah P, et al.** Comprehensive serum profiling for the discovery of epithelial ovarian cancer biomarkers. *PLoS One* 2011;6:e29533
15. **Modarres-Gilani M, Ghaemmaghami F, Mousavi A, et al.** Simultaneous measurement of two serum markers (CA-125 and HE-4) while diagnosing malignant ovarian epithelial tumors. *Pak J Med Sci* 2011;27:858-61
16. **Abdel-Azeez HA, Labib HA, Sharaf SM, et al.** HE4 and mesothelin: novel biomarkers of ovarian carcinoma in patients with pelvic masses. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11:111-6
17. **Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, et al.** HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol* 2010;31:113-9
18. **Nolen B, Velikokhatnaya L, Marrangoni A, et al.** Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases inpatients with an adnexal mass. *Gynecol Oncol* 2010;117:440-5
19. **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
20. **Karlsen MA, Sandhu N, Høgdall C, et al.** Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2012;127:379-83
21. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE): Guidance. Ovarian cancer: the recognition and initial management of ovarian cancer. National Collaborating Centre for Cancer (UK). Cardiff, UK: National Collaborating Centre for Cancer, 2011
22. **Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, et al.** Serum human epididymis protein 4 vs. carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. *J Clin Pathol* 2013;66:273-81
23. **Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, et al.** QUADAS-2 Group. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 2011;155:529-36
24. **Balshem H, Helfand M, Schünemann HJ, et al.** GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *J Clin Epidemiol* 2011;64:401-6
25. **Hori SS, Gambhir SS.** Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. *Sci Transl Med* 2011;3:109-16
26. **Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, et al.** National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clin Chem* 2008;54:e1-10
27. European Group for Tumor Markers (EGTM): Consensus recommendations. *Anticancer Res* 1999;19:2785-820
28. **Konforte D, Diamandis EP.** Is early detection of cancer with circulating biomarkers feasible? *Clin Chem* 2013;59:35-7
29. **Carlson KJ, Skates SJ, Singer DE.** Screening for ovarian cancer. *Ann Intern Med* 1994;121:124-32

30. **Bolstad N, Oijordsbakken M, Nustad K, et al.** Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumour Biol* 2012;33:141-8
31. **Novotny Z, Presl J, Kucera R, et al.** HE4 and ROMA index in Czech postmenopausal women. *Anticancer Res* 2012;32:4137-40
32. **Chan KK, Chen CA, Nam JH, et al.** The use of HE4 in the prediction of ovarian cancer in Asian women with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2013;128:239-44
33. **Panteghini M, Piazza E, Dolci A, et al.** Strategie per l'impiego ottimale dei biomarcatori in oncologia: raccomandazioni e protocolli operativi. *Biochim Clin* 2006;30:210-23
34. **Dolci A, Scapellato L, Panteghini M.** Valutazione dell'efficacia di raccomandazioni aziendali sulle strategie per l'impiego ottimale dei biomarcatori in oncologia a un anno dalla loro introduzione. *Biochim Clin* 2008;32:181-5
35. **Ferraro S, Mozzi R, Panteghini M.** Reevaluating serum ferritin as a marker of body iron stores in the traceability era. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1911-6
36. **Infusino I, Dolci A, Panteghini M.** Determinazione dell'epcidina: ma cosa stiamo "misurando"? *Biochim Clin* 2013;37:135-7
37. **Klee GG.** Clinical interpretation of reference intervals and reference limits. A plea for assay harmonization. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:752-7
38. **Sturgeon CM.** Tumor markers in the laboratory: closing the guideline-practice gap. *Clin Biochem* 2001;34:353-9
39. **Mongia SK, Rawlins ML, Owen WE, et al.** Performance characteristics of seven automated CA 125 assays. *Am J Clin Pathol* 2006;125:921-7
40. **Klee GG.** Definizione dei traguardi di prestazione analitica sulla base dell'"outcome" clinico. *Biochim Clin* 2011;35:254-61
41. **Trapé J, Perez de Olaguer J, Buxó J, et al.** Biological variation of tumor markers and its application in the detection of disease progression in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Chem* 2005;51:219-22
42. **Browning MCK, McFarlane NP, Horobin JM, et al.** Objective interpretation of results for tumour marker. *J Nucl Med Allied Sci* 1990;34(suppl):89s-91s
43. **Tuxen MK, Sölétormos G, Petersen PH, et al.** Assessment of biological variation and analytical imprecision of CA 125, CEA, and TPA in relation to monitoring of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999;74:12-22
44. **Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr.** Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-53
45. **Gion M, Trevisiol C, Pregno S, et al.** Guida all'uso clinico dei biomarcatori in oncologia: le prospettive. *Biochim Clin* 2012;36:40-5
46. **Jacobs IJ, Skates S, Davies AP, et al.** Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA 125 concentration: A prospective cohort study. *Br Med J* 1996;313:1355-8
47. **Rustin GJ.** Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer has major implications for treatment outcome and trial performances and should not be routinely performed. *Ann Oncol* 2011;22 Suppl 8:viii45-8
48. **Menon U, Kalsi J, Jacobs I.** The UKCTOCS experience--reasons for hope? *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22 Suppl 1:S18-20
49. **Drescher CW, Shah C, Thorpe J, et al.** Longitudinal screening algorithm that incorporates change over time in CA125 levels identifies ovarian cancer earlier than a single-threshold rule. *J Clin Oncol* 2013;31:387-92
50. **Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al.** The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108:402-8
51. **Jacob F, Meier M, Caduff R, et al.** No benefit from combining HE4 and CA125 as ovarian tumor markers in a clinical setting. *Gynecol Oncol* 2011;121:487-91
52. **Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, et al.** Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstet Gynecol* 2011;118:280-8
53. **Li F, Tie R, Chang K, et al.** Does risk for ovarian malignancy algorithm excel human epididymis protein 4 and CA125 in predicting epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2012;12:258
54. **Cohen DJ, Reynolds MR.** Interpreting the results of cost-effectiveness studies. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:2119-26
55. **Horvath AR, Kis E, Dobos E.** Guidelines for the use of biomarkers: principles, processes and practical considerations. *Scand J Clin Lab Invest* 2010;242:109-16

Per corrispondenza:

Dott.ssa Simona Ferraro
 Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche
 Ospedale 'Luigi Sacco'
 Via G.B. Grassi 74, Milano.
 Tel.: 0239042743 - Fax: 0250319835
 e-mail ferraro.simona@hsacco.it