

Determinazione con un sistema automatizzato e significato clinico-diagnostico dell'alfafetoproteina (AFP)

A. Mariano, R. Pedicini, D. Terracciano, A. Di Carlo, V. Macchia

Cattedra di Patologia clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Federico II, Napoli

Premessa. Nel campo della diagnostica oncologica di laboratorio, parallelamente alla individuazione di nuovi indicatori tumorali, sono state messe a punto negli ultimi anni metodiche sempre più sensibili e specifiche alternative ai dosaggi radioimmunologici. In questa ottica si è studiata la validità clinica e metodologica di un nuovo sistema, completamente automatizzato (Sistema Architect della Abbott) per la misura di uno dei più noti indicatori di neoplasia: l'alfafetoproteina (AFP).

Metodi. Per la determinazione dell'AFP sul sistema Architect sono stati analizzati 702 campioni di sangue prelevati da donne in gravidanza, 365 liquidi amniotici prelevati da donne sottoposte ad amniocentesi, 100 campioni di sangue prelevati da soggetti con patologie epatiche ed infine 50 soprannatanti preparati da tessuti neoplastici umani ottenuti in sala operatoria. Su tali campioni biologici l'AFP era stata già precedentemente determinata con kits commerciali radioimmunologici o alternativi.

Risultati. I dati ottenuti, per quanto riguarda la sensibilità, la riproducibilità e l'affidabilità di questo sistema, sono stati molto soddisfacenti. Per quanto, invece, concerne la convalida clinica non solo è stata confermata l'utilità della determinazione dell'AFP per la diagnosi delle patologie neoplastiche epatiche attraverso determinazioni su sieri e su soprannatanti dei tessuti ma sono stati riportati anche numerosi dati sul significato dell'AFP in gravidanza su siero e su liquido amniotico. Quest'ultimo è risultato un ottimo indicatore per il monitoraggio della gravidanza.

Conclusioni. Sulla base dei dati ottenuti è possibile affermare che l'utilizzo del sistema completamente automatizzato dell'Abbott per la determinazione dell'AFP permette di ottenere risultati validi da un punto di vista tecnico e perfettamente corrispondenti alle attese cliniche. Inoltre, questo sistema non solo può essere utilizzato con liquidi biologici come siero e liquido amniotico ma anche con altri tipi di materiali biologici quale il soprannatante dei tessuti provenienti da soggetti con patologie benigne e maligne.

Introduzione

Attualmente il cancro rappresenta la seconda principale causa di decesso dopo le malattie cardiovascolari ed inoltre, poiché la vita media della popolazione va aumentando in tutto il mondo, per alcuni tumori, quali quelli della prostata nell'uomo e della mammella nella donna, si prevede nel prossimo futuro un incremento di tali neoplasie. Pertanto, in questi ultimi anni, l'attenzione di molti studiosi è stata rivolta alla ricerca di una strategia adeguata capace di ridurre almeno l'alta mortalità delle malattie neoplastiche. In questa strategia hanno assunto un ruolo fondamentale i tentativi di individuare nuovi indicatori biochimici che permettano di: 1) evidenziare il più precocemente possibile la presenza di un tumore e 2) indicare l'evoluzione della malattia neoplastica e possibilmente in corso di terapia monitorare l'efficacia del trattamento. Allo stato attuale si conoscono numerosi indicatori biochimici indicati più comunemente "marcatori neoplastici" ma purtroppo nessuno di questi risponde alle esigenze fondamentali su accennate. Infatti i maggiori problemi attuali relativa-

mente all'utilità diagnostica del marcatore tumorale sono dovuti al fatto che non si conoscono ancora marcatori specifici per ciascun tumore ed inoltre per la mancanza di una differenza chiaramente definita tra tessuto normale e tessuto neoplastico spesso un indicatore biochimico utilizzabile nella diagnostica di alcune neoplasie può essere presente in circolo anche in situazioni di patologie benigne (1, 2). Inoltre in questi ultimi anni sono stati messi a punto per la determinazione dei vari indicatori di neoplasie nuove metodiche, alternative ai dosaggi radioimmunologici, altamente sensibili e specifiche.

Nel presente lavoro si è studiata la validità clinica e metodologica di un nuovo sistema completamente automatizzato (Sistema Architect della Abbott Roma, Italia) per la determinazione di uno dei vari indicatori di neoplasie previsti dall'apparecchio ed i risultati ottenuti vengono qui discussi.

Caratteristiche dei marcatori tumorali

I marcatori tumorali sono sostanze o prodotte dalle cellule neoplastiche o dalla cellula ospite in risposta al tumore o prodotte normalmente dalle cellule nor-

mali che, in seguito alla trasformazione neoplastica, sono quantitativamente e a volte anche qualitativamente differenti. I marcatori tumorali sono di varia natura chimica, localizzati a livello dei diversi componenti cellulari e secreti dalle cellule nel torrente circolatorio dove più frequentemente vengono dosati. Tuttavia, i marcatori tumorali oltre che nei liquidi biologici (siero, urine, liquidi bronchiali, liquidi amniotici,) possono essere anche dosati nei soprannatanti dei tessuti e nei mezzi di coltura di cellule trasformate che li producono. Il marcatore tumorale da noi studiato nel presente studio è stato l'alfafetoproteina (AFP). L'alfafetoproteina (AFP) è una glicoproteina con peso molecolare di circa 70 Kd ed una mobilità elettroforetica compresa tra le α 1-globuline e l'albumina. L'AFP strutturalmente e geneticamente simile all'albumina, è sintetizzata dal fegato fetale e dal sacco vitellino (3 - 5). Nel siero fetale l'AFP raggiunge il picco massimo tra la 13ma e la 15ma settimana di gravidanza e poi gradualmente diminuisce. La diffusione dell'AFP attraverso la placenta consente il trasferimento dell'AFP fetale al circolo materno, dove il valore massimo si ottiene tra la 30ma e la 35ma settimana di gestazione (6, 7). In definitiva, l'AFP si ritrova nel siero materno, nel siero fetale e nel liquido amniotico e la sua concentrazione in tali liquidi dipende dall'età gestazionale (8). Alla nascita cessa la sintesi di AFP e la sua concentrazione rapidamente si abbassa infatti da valori osservati nel feto di 100-200 mg/L si arriva a valori che a partire dall'ottavo mese di vita neonatale si aggirano a 10-20 mg/L (9). Nell'adulto sano la concentrazione sierica di AFP è molto bassa ma in soggetti con neoplasie epatiche primarie (10 - 13) ed in soggetti con tumori a carico del testicolo (14) si eleva notevolmente. Concentrazioni elevate di AFP si osservano nei liquidi amniotici di gestanti il cui feto è affetto da alterazioni congenite (15) e nel siero materno in caso di morte endouterina del feto (16). Sempre nel siero materno la concentrazione di AFP è elevata in caso di alterazioni del tubo neurale del feto quali anencefalia e spina bifida. Viceversa, nel siero della donna in gestazione quando il feto è affetto da sindrome di Down la concentrazione di AFP è più bassa di quella riscontrata per lo stesso periodo di gestazione nel siero della donna con feto normale (17 - 23).

Caratteristiche del Sistema Architect

Il Sistema Architect della Ditta Abbott è uno strumento di nuova generazione completamente automatizzato per dosaggi immunologici in chemiluminescenza.

Materiali e Metodi

Per la valutazione dell'AFP sul Sistema Architect sono stati analizzati 702 campioni di sangue prelevati da donne in gravidanza, 365 liquidi amniotici

prelevati da donne sottoposte ad amniocentesi, 100 campioni di sangue prelevati da soggetti con patologie epatiche ed infine 50 soprannatanti preparati da tessuti neoplastici umani ottenuti in sala operatoria. Tutti i campioni sono stati prelevati in provette senza anticoagulante, centrifugati e quindi i sieri separati, congelati e conservati a -20°C fino al momento del dosaggio. Per i campioni di sangue delle gestanti, all'epoca del prelievo, veniva registrata l'età gestazionale della donna, attraverso la biometria ultrasonografica e la misura del diametro biparietale. Sono stati anche raccolti campioni di sangue di donne che avevano avuto un aborto spontaneo o che, sottoposte ad amniocentesi, presentavano un feto con anomalie cromosomiche o con altri difetti di malformazione. I campioni di sangue di soggetti con patologie neoplastiche provenivano dai Reparti di Chirurgia dell'Azienda Policlinico Federico II e venivano raccolti prima che i pazienti fossero sottoposti ad intervento chirurgico. Dopo circa un'ora dal prelievo il sangue venoso, raccolto in un vacutainer senza anticoagulante, veniva centrifugato ed il siero conservato a -20°C fino al momento della determinazione del marcatore. I campioni di liquido amniotico sono stati ottenuti in seguito ad amniocentesi, ecograficamente guidata, su donne al secondo trimestre di gravidanza. Per la preparazione dei soprannatanti dei tessuti patologici si è seguito il seguente schema analitico: i tessuti tumorali, ottenuti in sala operatoria da pazienti sottoposti ad intervento chirurgico, venivano immediatamente portati in laboratorio e congelati a -80°C . Successivamente i tessuti venivano omogenizzati in un potter teflon/vetro con un tampone isotonic a pH 7,4 e centrifugati per 10 minuti a 1500 g. Il soprannatante veniva ulteriormente centrifugato per 30 minuti a 105000 g. Eliminato il sedimento, il soprannatante veniva congelato a -20°C per essere successivamente utilizzato per il dosaggio dell'AFP e per il dosaggio delle proteine con la metodica di Bradford (24).

Risultati

Caratteristiche del sistema Architect per l'alfafetoproteina (AFP)

La sensibilità analitica, intesa come la più bassa concentrazione di analita che il metodo è in grado di rivelare, è stata calcolata sulla media + 2 D.S. di 40 determinazioni dello Standard zero fornito dal kit. La sensibilità è risultata di 0,03 ng/mL. La riproducibilità del dosaggio è stata determinata su 3 pool di sieri a bassa, media ed alta concentrazione di AFP (L, M, H) e su un pool di liquidi amniotici ad elevata concentrazione dell'analita. Il numero di determinazioni intra-serie ed inter-serie con le relative medie \pm D.S. ed i coefficienti di variazioni (C.V.), espressi in percentuale, sono riportati in Tabella I e

Tabella II rispettivamente. Dall'analisi dei dati si osserva che con i 3 pool di sieri il C.V. intra-serie è risultato non superiore al 5,2% e quello inter-serie non superiore al 5%. Molto buoni anche i coefficienti di variazione intra ed inter-serie con il pool di liquido amniotico a concentrazione elevata dell'analita (C.V. intra-serie 4,5% e C.V. inter-serie 4%) (Tabella II).

L'affidabilità del metodo è stata valutata mediante test di diluizione. Per tutti e 3 i campioni di liquidi amniotici ad elevate concentrazioni dell'analita è stata osservata un'ottima linearità di risposta (Tabella III).

Convalida clinica e metodologica del Sistema Architect per la determinazione dell'AFP nel siero e nel liquido amniotico di donne con gravidanze a rischio

La determinazione sierica dell'AFP è richiesta nelle donne in gravidanza, a partire dal secondo trimestre, per evidenziare precocemente i difetti del tubo neurale a carico del feto. Infatti durante la gravidanza normale, il sangue materno contiene minime quanti-

tà di AFP ed i valori aumentano progressivamente con l'età gestazionale. Quando il tubo neurale del feto non si chiude perfettamente, l'AFP, presente nel feto in concentrazioni molto elevate, passa nel liquido amniotico e di qui nel sangue materno, dove raggiunge elevate concentrazioni. Inoltre, poiché in gestanti con feto Down i valori di AFP sono più bassi di quelli riscontrati in gestanti con feto sano, la determinazione di tale analita è inserita nelle indagini biochimiche per la evidenziazione del rischio Down. Pertanto ai fini della convalida clinica del sistema Architect è sembrato molto interessante determinare con tale Sistema l'AFP su un gruppo di sieri di donne sottoposte a screening per la sindrome di Down e su un gruppo di liquidi amniotici provenienti da donne sottoposte ad amniocentesi per eventuali gravidanze a rischio. Su tutti questi campioni il dosaggio dell'AFP era già stato effettuato con un kit radioimmunologico. Si è quindi determinata l'AFP su un gruppo di 691 sieri di donne di età compresa tra i 21 ed i 40 anni tra la 15ma e la 20ma settimana di gestazione. Dal precedente dosaggio con kits radioimmunologici nessuna di queste donne era risultata positiva al test biochimico per la sindrome di Down o per difetto del tubo neurale.

In Tabella IV sono riportati la media, la mediana ed i corrispondenti valori minimi e massimi di AFP ottenuti con il sistema Architect e divisi per settimana di gestazione. Dall'analisi dei dati si osserva che i valori medi di AFP variano a seconda delle settimane di gestazione e che da un valore di 33 ± 12 ng/mL in 15ma settimana si passa a valori di 71 ± 20 ng/mL in 20ma settimana. Tali concentrazioni non sono dissimili da quelle da noi osservate con kits commerciali radioimmunologici (25). In questo studio sono stati compresi anche 11 sieri di donne con feti patologici (Tabella V). Dall'analisi dei dati si osserva che 6 donne presentavano un indice di rischio Down superiore al valore soglia (1/400) da noi precedentemente definito (25) e di queste: 2 con trisomia del cromosoma 21, 1 con mielomeningocele che presentava anche un indice di rischio per difetto del tubo neurale molto elevato, 1 con traslocazione 3-22, 1 con traslocazione di Robertson ed 1 con me-

Tabella I. Riproducibilità analitica dell' AFP eseguita su 3 sieri di controllo

Camp.	Determ. n.	AFP ng/mL media \pm DS	C.V. % interserie
L	10	21,1 + 1,1	5,2
M	10	74,4 + 1,4	1,8
H	10	169 + 5,8	3,4

Camp.	Determ. n.	AFP ng/mL media \pm DS	C.V. % interserie
L	24	21,9 \pm 0,94	4,2
M	24	74,4 \pm 2,9	3,8
H	24	171 \pm 8,7	5,0

Tabella II. Prova di deriva con Pool A (liquido amniotico) a concentrazione elevata di AFP

Determ. n.	AFP (ng/mL) media \pm DS	C.V. % intraserie	C.V. % interserie
15	9060 \pm 408	4,5	-
40	9215 \pm 376	-	4,0

Tabella III. Risultati del test di diluizione

Camp.n.	AFP ng/mL	Retta regressione	r
2553	23.677	1,0x - 475	0,99
2637	123.500	1,0x - 6262	0,99
2647	352.490	1,0x - 5035	0,99

Tabella IV. Concentrazione sierica di AFP in gestanti con feto normale

Settimana gestazione	Campioni n.	AFP ng/ml			
		Media \pm DS	Mediana	Min	Max
15	169	33 \pm 12	31	13	67
16	244	40 \pm 14	35	15	86
17	117	47 \pm 20	42	19	113
18	73	50 \pm 16	45	16	92
19	56	57 \pm 19	51	30	109
20	32	71 \pm 20	70	37	112

Tabella V. Concentrazione sierica di AFP in gestanti con feto Down o con difetti del tubo neurale (NTD)

Sett. gest.	Patologia	AFP ⁽¹⁾ ng/mL	AFP ⁽²⁾ ng/mL	Rischio Down	Rischio NTD
18	Trisomia 21	43	34	60	7800
16	Anencefalia	692	417	3700	6
16	Trasl.3-22	42	36	340	6900
17	Trasl.Robertson	64	60	120	2700
20	Meningocele	202	185	270	17
18	Spina bifida	124	107	11000	370
16	Anencefalia	200	213	7400	6
19	Trisomia 21	155	156	300	4200
20	Meckel gruber	437	428	690	2
15	Mielomening.	138	139	9	6
18	Dandy Walzer	70	60	16000	4600

⁽¹⁾ AFP Architect⁽²⁾ AFP RIA**Tabella VI.** Concentrazione di AFP nei liquidi amniotici di gestanti con feto normale

Settimana gestazione	Campioni n.	AFP ng/mL			
		Media \pm DS	Mediana	Min	Max
15	16	14.500 \pm 4.831	15.000	6.100	23.800
16	79	15.894 \pm 7.042	15.200	5.400	49.900
17	135	12.902 \pm 3.931	12.000	2.400	21.800
18	92	11.519 \pm 2.685	11.400	6.100	17.600
19	28	9.625 \pm 2.872	9.050	5.900	22.100
20	12	9.216 \pm 5.465	6.800	4.200	20.300

⁽¹⁾ AFP Architect⁽²⁾ AFP RIA**Tabella VII.** Concentrazione di AFP nei liquidi amniotici di gestanti con feti con difetto del tubo neurale (NTD)

Soggetto	Settimana gestazione	AFP ng/mL	
		Architect	RIA
1	16	331.973	352.000
2	17	94.176	123.000
3	17	58.000	49.500

Tabella VIII. Concentrazione di AFP in soggetti con patologie benigne e maligne

Patologie	Casi n.	AFP ng/mL	
		media	range
Steatosi	24	4,5	1,6 - 6,6
Neoplasie epatiche	26	483	35 - 2.410
Neoplasie non epatiche*	50	8,7	0,9 - 65

* stomaco - intestino

Tabella IX. Determinazione dell'AFP e del CEA nei soprannati dei tumori epatici primari e secondari

Analita	Tessuto	Carcinomi epatici (28)	Metastasi epatiche (22)
AFP ng/mg prot.	Tumorale	155 \pm 30	< 0,4
	Peritumorale	1,8 \pm 0,9	< 0,4
CEA ng/mg prot.	Tumorale	1,9 \pm 0,4	240 \pm 70
	Peritumorale	1,1 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3

ningocele con un indice di rischio per il difetto del tubo neurale molto elevato. Gli altri cinque casi erano di soggetti con difetti del tubo neurale. Da notare inoltre che i dati da noi ottenuti col sistema Architect non sono molto dissimili da quelli ottenuti con un Kit radioimmunologico da noi precedentemente utilizzato nel tri-test (25).

Quindi si è proceduto alla determinazione dell'AFP col sistema Architect su un gruppo di 362 campioni di liquidi amniotici di gestanti con feto normale. In Tabella VI sono riportati i valori di media, mediana ed i corrispondenti valori minimi e massimi di AFP per settimana di gestazione. Come si può osservare dai dati riportati in Tabella, la concentrazione di AFP è nei liquidi amniotici di circa 500 volte più elevata di quella osservata nei sieri delle gestanti (Tabella V) e va progressivamente diminuendo con il progredire delle settimane di gestazione. Le determinazioni dell'AFP sui liquidi amniotici erano state già eseguite con un kit radioimmunologico. In Tabella VII sono riportati anche i valori ottenuti con le due metodiche (sistema Architect e metodica RIA) su 3 liquidi amniotici di gestanti che avevano abortito in seguito alla presenza di feti con difetti del tubo neurale. Tali valori, confrontati con i liquidi amniotici della stessa settimana di gestazione (Tabella VI) provenienti da donne con feto normale erano da 5 a 30 volte superiori. Le concentrazioni di AFP, pur essendo molto elevate, sono risultate molto simili a quelle ottenute con entrambe le metodiche (sistema Architect e RIA). Oltre che in gravidanza l'AFP viene determinata nei casi sospetti di neoplasie principalmente a carico del fegato (26) e delle cellule germinali, e spesso è possibile osservare lievi aumenti di tale analita nel siero di soggetti con neoplasie di origine gastrointestinale.

E' stata quindi determinata l'AFP con il sistema Architect su 24 sieri di soggetti con steatosi epatica, 26 con neoplasie epatiche e 50 con neoplasie non epatiche a carico del tubo gastroenterico. Dall'analisi dei dati riportati in Tabella VIII si osserva che valori elevati di AFP erano presenti solo nei sieri dei soggetti con neoplasie epatiche, infatti la media dei valori è risultata di 483 ng/mL con valori compresi tra 35 e 2410 ng/mL. Viceversa, nei sog-

getti con steatosi ed in quelli con neoplasie non epatiche la media dei valori è risultata di 4,5 ng/mL e di 8,7 ng/mL rispettivamente.

Più recentemente è stato osservato che maggiori informazioni sulla evoluzione della malattia neoplastica possono derivare dalla determinazione degli indicatori di neoplasie sui tessuti prelevati al tavolo operatorio. Pertanto, abbiamo ritenuto interessante preparare da 28 omogenati di tessuti tumorali e corrispondenti tessuti peritumorali i sopranatanti mediante centrifugazione a 105000 g per 60 minuti e determinare su tale materiale biologico l'AFP con il Sistema Architect ed il CEA con una metodica radioimmunologica. Dall'analisi della Tabella IX si osserva che i livelli di AFP espressi come ng/mg di proteine erano di circa 100 volte superiori nei tumori epatici primari rispetto a quelli trovati nei sopranatanti dei tessuti peritumorali mentre non erano dettabili nei 22 tumori epatici secondari (metastasi da tumori del colon). Viceversa, i valori del CEA erano molto elevati nei tessuti metastatici e molto bassi nei tumori epatici primitivi. Tale dato di AFP oltre a suggerire l'uso del sistema Architect anche per questo particolare materiale biologico permette di confermare quanto da noi precedentemente ipotizzato (27) che la determinazione di CEA e di AFP sul sopranatante dei tumori epatici può essere di valido aiuto nella diagnosi del tipo di tumore epatico (primario o metastasi).

Conclusioni

In conclusione, sulla base dei dati da noi ottenuti è possibile affermare che l'utilizzo del sistema completamente automatizzato dell'Abbott (sistema Architect) per la determinazione dell'AFP permette di ottenere risultati validi da un punto di vista tecnico e che sono in accordo con le attese cliniche. Inoltre, non solo è utilizzabile con liquidi biologici come siero e liquido amniotico ma anche con altri materiali biologici quali i sopranatanti dei tessuti provenienti da soggetti con patologie sia benigne che maligne.

Infine, viene qui confermato che la determinazione dell'AFP oltre che essere di ausilio in campo di diagnosi di laboratorio dei tumori epatici è anche un utile indicatore biochimico in corso di gestazione dal momento che la sua determinazione, sia su siero che su liquido amniotico, riveste un ruolo fondamentale nell'ambito della diagnostica prenatale al fine di identificare le varie alterazioni congenite del feto.

Bibliografia

1. Macchia V, Mariano A. Significato diagnostico dei marcatori tumorali. *Aggiornamento del Medico* 1987; 11: 95-102.

2. Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review: *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 225-62.
3. Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ, Dennison OF, Hawkins JW, Beattie WG, Dugaiczy A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q 11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem* 1986; 261: 6747-57.
4. Kekomaki M, Seppola M, Ehnholm C, Schwartz AL, Raivio K. Perfusion of isolated human fetal liver: synthesis and release of α -fetoprotein and albumin. *Int J Cancer* 1971; 8: 250-8.
5. Gillespie JR, Uversky VN. Structure and function of alpha-fetoprotein a biophysical overview. *Biochem. Biophys Acta* 2000; 1480: 41-56.
6. Thomas RL, Blakemore KJ. Evaluation of elevations in maternal serum alpha-fetoprotein: a review. *Obst Gynecol Surv* 1990; 45: 269-83.
7. Melbye M, Wohlfahrt J, Lei U, Norgaard-Pedersen B, Mouridsen HT, Lambe M, Michels KB. Alpha-fetoprotein levels in maternal serum during pregnancy and maternal breast cancer incidence. *Journ of NCI* 2000; 92: 1001-5.
8. Seppola M, Ruoslahti E. Alpha-fetoprotein in amniotic fluid an index of gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 114: 595-8.
9. Wu JT, Book L, Sudan K. Serum alpha-fetoprotein levels in normal infants. *Pediatr Res* 1981; 15: 50-2.
10. Bourgaux JF, Ponsoda P, Raffanel C, Riboard D, Ponderoux P, Balmes JL. Highly elevated alpha-fetoprotein and hepatic cirrhosis. It is not always hepatocarcinoma. *Presse Med* 2001; 30: 486-7.
11. Chu CW, Hwang SJ, Luo JC, Lai CR, Tsay SH, Li CP, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Clinical, virologic, and pathologic significance of elevated serum alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C. *J. Clin Gastroenterol* 2001, 32: 240-4.
12. Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001, 5: 145-59.
13. Tangkijvanich P, Anukulkarnkusol N, Suwangool P, Lertmaharit S, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P, Poovorawan Y. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum Alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31:302-8.
14. Nikzas D, Champion AE, Fox M. Germ cell tumours of testis: prognostic factors and results. *Eur Urol* 1990; 18: 242-7.
15. Seppola M. Increased alpha-fetoprotein in amniotic fluid associated with a congenital esophageal atresia of the fetus. *Obstet Gynecol* 1973; 42: 613-4.
16. Milunski A, Alpert E. Results and benefits of a maternal serum alpha-fetoprotein screening program. *JAMA* 1984; 252: 1438-42.
17. Macri JN, Weiss RR. Prenatal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects. *Obstet Gynecol* 1982; 59: 633-9.
18. Macchia V, Mariano A, Pinto G, Bloise A, Di Carlo A, Paladini D, Morelli P, Martinelli P. Diagnosi prenatale della sindrome di Down: studio retrospettivo con tests biochimici. *Il Patologo clinico* 1996; 2: 86-93.
19. Egan JF, Benn P, Borgida AF, Rodis JF, Campbell WA, Vinzileos AM. Efficacy of screening for fetal Down syndrome in the United States from 1974 to 1997. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 979-85.

20. Lam YH, Tang MH, Lee CP, Sin SY, Tang R, Wong HS, Wong SF. Acceptability of serum screening as an alternative to cytogenetic diagnosis of down syndrome among women 35 years or older in Hong Kong. *Prenat Diagn* 2000; 20: 487-90.
21. Perene M, Dudarewicz L, Kaluzewski B. Utility of the triple test in the detection of abnormalities of the feto-placental unit. *Med Sci Monit* 2000; 6: 994-9.
22. Bar-Hava I, Yitzhak M, Krissi H, Shohat M, Shalev J, Czitron B, Ben-Rafael Z, Orvieto R. Triple-test screening in vitro fertilization pregnancies. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 226-9.
23. Benn PA, Ying J, Beazoglon T, Egan JF. Estimates for the sensitivity and false-positive rates for second trimester serum screening for Down syndrome and trisomy 18 with adjustment for cross-identification and double-positive results. *Prenat Diagn* 2001; 21: 46-51.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-52.
25. Macchia V, Mariano A, Di Carlo A, Bloise A, Capobianco C, Paladini D, Martinelli P. Tests biochimici per la diagnosi prenatale della sindrome di Down e dei difetti del tubo neurale: esperienza nella Regione Campania. *Il Patologo clinico* 1994; 6: 434-45.
26. Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992; 15: 948-63.
27. Di Carlo A, Mariano A, D'Alessandro V, Belli G, Romano G, Macchia V. Evaluation of epidermal growth factor receptor, carcinoembryonic antigen and Lewis carbohydrate antigens in human colorectal and liver neoplasias. *Oncology Reports* 2001; 8: 387-92.