

An Evidence-based Case Report

**Peranan biomarker tunggal maupun kombinasi dalam
diagnosis Karsinoma Hepatoseluler**



Penyusun

dr. Catarina Budyono

NPM: 1106024395

Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI/RSCM

Divisi Hepatologi

Jakarta, April 2015

DAFTAR ISI

Pendahuluan.....	1
Presentasi kasus.....	2
Pertanyaan klinis.....	3
Penelusuran bukti.....	3
Telaah kritis.....	4
Diskusi.....	8
Kesimpulan.....	10
Daftar pustaka.....	11

PENDAHULUAN

Karsinoma Hepatoseluler (KHS) adalah adalah kanker keenam terbanyak dan merupakan penyebab kematian ketiga tersering terkait keganasan. Insiden KHS meningkat seiring dengan penambahan usia dan lebih banyak dijumpai pada laki-laki. KHS sendiri banyak ditemukan di negara Asia Tenggara dimana infeksi virus hepatitis B dan C masih tinggi.¹

Sirosis merupakan faktor risiko terjadinya KHS dan dapat disebabkan karena banyak hal misalnya hepatitis kronik, penyakit hati alkoholik, penyakit hati hereditas dan *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD).¹ Studi menyatakan risiko kumulatif timbulnya KHS dalam 5 tahun pada pasien sirosis sebesar 5-30%.² Angka ketahanan hidup pasien KHS dalam 1 tahun masih cukup rendah kurang dari 50% namun dapat meningkat jika tumor sudah terdeteksi dalam ukuran kecil.^{3,4} Diagnosis dini pada KHS kecil yang diikuti dengan terapi reseksi dapat meningkatkan angka ketahanan hidup dalam 5 tahun hingga 71,4%.⁵

Belum ada pemeriksaan biomarker yang direkomendasikan untuk mendiagnosis KHS. AFP sudah banyak digunakan sebagai test penampakan dan diagnosis KHS walaupun memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah (masing-masing 66% dan 82%).⁴ AFP tidak spesifik untuk KHS dan titernya juga meningkat pada hepatitis akut atau kronik, kolangiokarsinoma intrahepatik, metastasis dari kanker colon, kehamilan, atau adanya tumor sel germinal.^{4,6} Beberapa biomarker lainnya yang telah disetujui penggunaannya antara lain *des-γ-carboxy prothrombin* (DCP) atau *protein induced by vitamin K absence/antagonist-II* (PIVKA-II) dan *Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of AFP* (AFP-L3).^{1,4,7} DCP dilaporkan lebih sensitif dan spesifik dibandingkan AFP untuk mendeteksi KHS walaupun hasil tersebut masih kontroversial.^{8,9} Studi lain menyatakan kombinasi AFP dan DCP dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dalam mendiagnosis KHS.¹⁰ Sebuah studi meta-analisis menyatakan AFP-L3 memiliki spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan AFP (92,9% vs 85,6%) namun sensitivitasnya lebih rendah (48% vs 62%).¹¹ Sebuah penanda tumor baru yaitu Golgi protein-73 (GP73) dikatakan mempunyai akurasi yang sama dengan AFP dalam mendiagnosis KHS dan penggunaannya secara kombinasi dengan AFP dikatakan lebih sensitif dibandingkan dengan AFP tunggal.^{12,13}

Belum adanya panduan penggunaan penanda tumor dalam diagnosis KHS membuat penulis mencari literatur berbasis bukti untuk melihat peranan penanda tumor baik pada pemeriksaan tunggal maupun kombinasi untuk mendiagnosis KHS.

ILUSTRASI KASUS

Pasien wanita usia 66 tahun kontrol ke poli hepatologi untuk evaluasi karsinoma hepatoselular. Awalnya tahun 2005 muncul keluhan mudah lelah saat beraktivitas. Pasien berobat ke dokter umum dan dilakukan pemeriksaan laboratorium. Dari hasil pemeriksaan didapatkan peningkatan serum *transaminase*. Sudah dilakukan tes penampisan hepatitis namun hasil negatif. Dari hasil USG didapatkan gambaran perlemakan hati, Pasien diberi obat curcuma, hp pro dan vitamin E serta disarankan untuk USG evaluasi tiap 6 bulan. Satu tahun kemudian pasien dikatakan menderita sirosis hepatis. Pasien masih rutin kontrol untuk melakukan USG tiap 6 bulan dan mendapat tambahan terapi propranolol 2 x 10 mg. tahun 2010 saat kontrol didapatkan hasil gula darah 300 disertai keluhan sering lapar, sering haus dan sering kencing. Pasien akhirnya didiagnosis diabetes melitus (DM) tipe 2 dan mendapat terapi metformin 2 x 500 mg dan gliquidon 2 x 30 mg. Tahun 2013 ditemukan nodul di hati pada saat penampisan menggunakan USG. Didapatkan hasil AFP normal saat pemeriksaan. Pasien kemudian dilakukan biopsi dan CT scan abdomen 3 fase dan ditemukan nodul ukuran kurang dari 3 cm di segmen 8 hepar. Tahun 2014 pasien dirawat untuk dilakukan *percutaneous ethanol injection therapy* (PEIT) 3x dan Radio Frekuensi Ablasi (RFA) 1x. Saat ini pasien kontrol rutin untuk melakukan evaluasi tumor.

Dari pemeriksaan fisik didapatkan tanda vital stabil. Pasien dengan berat badan 60 kg dan tinggi badan 154 cm sehingga dikategorikan obesitas. Pemeriksaan fisik lainnya dalam batas normal.

Dari pemeriksaan laboratorium tanggal 15 januari 2015 didapatkan AFP 2,4, Bilirubin total 1,03 dengan bilirubin direct 0,55. Albumin 4,15, Hb 11,5 leukosit 2820, trombosit 62.000. SGOT 41 dan SGPT 30, Gula darah puasa 120 dan Gula darah 2 jam post prandial 176 dengan HbA1c 7,1. HbsAg dan Anti HCV non reaktif.

Hasil CT Scan abdomen 3 fase menunjukkan kemungkinan sirosis hepatis dengan nodul di segmen 8 ukuran 2,81 x 2,35cm. Dari gastroduodenoskopi didapatkan gastropati hipertensi portal berat.

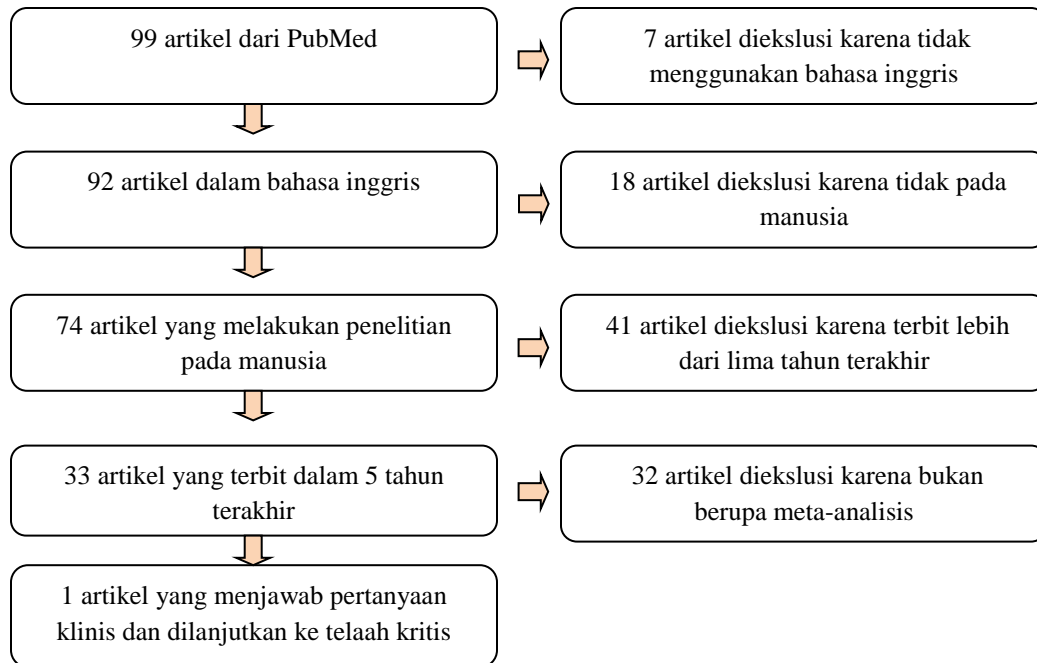
Daftar masalah pada pasien ini adalah karsinoma hepatoseluler BCLC A post PEIT dan RFA, sirosis hepatis *child pugh* B dengan pansitopenia, gastropati hipertensi portal berat, DM tipe 2 obese. Pasien mendapatkan terapi diet DM 1500 kkal/hari terbagi dengan 3 porsi besar dan 3 porsi kecil, propranolol 2x10 mg po, metformin 2 x 500 mg dan gliquidon 2 x 30 mg. Pasien direncanakan USG abdomen untuk evaluasi.

PERTANYAAN KLINIS

Bagaimana peranan biomarker baik tunggal maupun kombinasi dalam mendiagnosis karsinoma hepatoseluler?

PENELUSURAN BUKTI

Untuk menjawab pertanyaan klinis, kami melakukan pencarian di PubMed pada tanggal 12 April 2015. Pada PubMed, kami menggunakan pencarian lanjut (*advanced search*) dan menggunakan kata kunci sebagai berikut: ((((((AFP) OR alpha-fetoprotein) OR α -fetoprotein)) AND ((((((DCP) OR des- γ -carboxy prothrombin) OR des-gamma carboxy prothrombin) OR PIVKA-II) OR protein induced by vitamin k absence-ii) OR protein induced by vitamin k antagonist-ii)) AND (((AFP-L3) OR alpha-fetoprotein-L3) OR Lens culinaris agglutinin) OR lectin-bound AFP)) AND (((HCC) OR Hepatocellular carcinoma) OR Hepatoma) OR liver cancer). Pencarian bukti melalui Pubmed ini menghasilkan 99 artikel. Setelah membatasi artikel yang hanya menggunakan bahasa inggris, dilakukan pada manusia dan dipublikasikan dalam 5 tahun terakhir dan dalam bentuk meta-analisis, didapatkan 1 artikel yang sesuai dengan pertanyaan klinis yang kemudian dilanjutkan ke telaah kritis.(gambar 1)



Gambar 1. Alur pemilihan artikel yang digunakan dalam EBCR

TELAAH KRITIS

Untuk melakukan telaah kritis, penulis menggunakan *Systematic review Critical Appraisal Sheet* dari *the Centre for Evidence Based Medicine (CEBM)*, Universitas Oxford.¹⁴

Tabel 1. Telaah klinis

Studi	Hu dkk ¹⁵
Judul	Evaluation of individual and combined applications of serum biomarkers for diagnosis of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis
Pengarang	Bin Hu, Xiaohui Tian, Jie Sun and Xiangjun Meng
Publikasi	<i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2013;14:23559-80
Jumlah sampel	40 artikel
Subjek	High risk patient for hepatocellular carcinoma
Intervensi	AFP, DCP, GP73, AFP-L3, AFP+DCP, AFP+AFP-L3, and AFP+GP73
Perbandingan	AFP
Hasil	Hepatocellular carcinoma

SYSTEMATIC REVIEW: Are the results of the review valid?

What question (PICO) did the systematic review address?	
What is best?	Where do I find the information?
The main question being addressed should be clearly stated. The exposure, such as a therapy or diagnostic test, and the outcome(s) of interest will often be expressed in terms of a simple relationship.	The Title, Abstract or <i>final paragraph of the Introduction</i> should clearly state the question. If you still cannot ascertain what the focused question is after reading these sections, search for another paper!
<p>This paper: Yes</p> <p>Comment: Evaluation of Individual and Combined Applications of Serum Biomarkers for Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma</p>	
F - Is it unlikely that important, relevant studies were missed?	
What is best?	Where do I find the information?
The starting point for comprehensive search for all relevant studies is the major bibliographic databases (e.g., Medline, Cochrane, EMBASE, etc) but should also include a search of reference lists from relevant studies, and contact with experts, particularly to inquire about unpublished studies. The search should not be limited to English language only. The search strategy should include both MESH terms and text words.	The Methods section should describe the search strategy, including the terms used, in some detail. The Results section will outline the number of titles and abstracts reviewed, the number of full-text studies retrieved, and the number of studies excluded together with the reasons for exclusion. This information may be presented in a figure or flow chart.
<p>This paper: No</p> <p>Comment: the search limited to english language only. There is no data for unpublished studies</p>	
A - Were the criteria used to select articles for inclusion appropriate?	
What is best?	Where do I find the information?
The inclusion or exclusion of studies in a systematic review should be clearly defined a priori. The eligibility criteria used should specify the patients, interventions or exposures and outcomes of interest. In many cases the type of study design will also be a key component of the eligibility criteria.	The Methods section should describe in detail the inclusion and exclusion criteria. Normally, this will include the study design.
<p>This paper: Yes</p> <p>Comment: The inclusion or exclusion of studies was described in figure 1</p>	

<i>A - Were the included studies sufficiently valid for the type of question asked?</i>	
What is best?	Where do I find the information?
The article should describe how the quality of each study was assessed using predetermined quality criteria appropriate to the type of clinical question (e.g., randomization, blinding and completeness of follow-up)	The Methods section should describe the assessment of quality and the criteria used. The Results section should provide information on the quality of the individual studies.
<p>This paper: Unclear</p> <p>Comment: there is only data for sensitivity, specificity, and cut-off in each article. There is no assessment of methodological quality</p>	
<i>T - Were the results similar from study to study?</i>	
What is best?	Where do I find the information?
Ideally, the results of the different studies should be similar or homogeneous. If heterogeneity exists the authors may estimate whether the differences are significant (chi-square test). Possible reasons for the heterogeneity should be explored.	The Results section should state whether the results are heterogeneous and discuss possible reasons. The forest plot should show the results of the chi-square test for heterogeneity and if discuss reasons for heterogeneity, if present.
<p>This paper: Unclear</p> <p>Comment: there is no chi-square test for heterogeneity</p>	

What were the results?

How are the results presented?

Biomarker	Number of Studies	AUC
1 (AFP)	35	0.835
2 (DCP)	15	0.797
3 (GP73)	9	0.914
4 (AFP-L3)	15	0.710
5 (AFP+DCP)	8	0.874
6 (AFP+AFP-L3)	3	0.748
7 (AFP+GP73)	3	0.932

AFP: alpha-fetoprotein; DCP: des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin; GP73: golgi protein-73; AFP-L3: Alpha-fetoprotein L3 isoform.

	Estimate	Std. Error	t Value	Pr (> t)
(Intercept)	2.39257	0.15197	15.744	$<2 \times 10^{-16}$
S.Biomarker.1	0.13594	0.04532	2.999	0.00314
S.Biomarker.2	0.29219	0.10222	2.859	0.00483
S.Biomarker.3	0.15326	0.08245	1.859	0.06492
S.Biomarker.4	-0.19643	0.12226	-1.607	0.11012
S.Biomarker.5	-0.28662	0.20797	-1.378	0.17009
S.Biomarker.6	0.21913	0.17122	1.280	0.20250
S.Biomarker.7	-0.16597	0.13200	1.257	0.21050
Biomarker.2	0.08054	0.36171	0.223	0.82409
Biomarker.3	0.13195	0.31404	0.420	0.67494
Biomarker.4	-0.78803	0.47604	-1.655	0.09983
Biomarker.5	0.43157	0.40973	1.053	0.29381
Biomarker.6	0.77644	0.70680	1.099	0.27364
Biomarker.7	1.21688	0.48657	2.501	0.01341

The statistical significance level was set to $p < 0.05$. The S -value, which represents the positive rate of the biomarker for detecting HCC, was calculated as follows: $S = \text{logit (TPR)} + \text{logit (FPR)}$, where TPR is the true positive rate (sensitivity) and FPR is the false positive rate (1-specificity).

It was found that the AUC of biomarkers **3**, **5** and **7** were superior to that of the reference biomarker **1**, while the AUC of biomarkers **2**, **4** and **6** were inferior to that of the reference biomarker **1**.

Using biomarker **1** as a reference marker, the S -values of biomarkers **2**, **3**, **4**, **5** and **6** were not significantly different from that of AFP ($p > 0.05$). The S -value of biomarker **7** was significantly different as compared with AFP ($p < 0.05$).

DISKUSI

Dari hasil pencarian bukti yang sudah dilakukan, ditemukan 1 studi meta-analisis yang dilakukan oleh Hu dkk. Dari hasil tersebut, didapatkan hasil akurasi diagnosis dari masing-masing tes diagnostik yang digambarkan dalam AUC. Dengan menggunakan AFP sebagai referensi, didapatkan GP73, kombinasi AFP dan DCP serta kombinasi AFP dan GP73 lebih baik dibandingkan AFP tunggal dalam mendiagnosis KHS. Kombinasi AFP dan GP73 memiliki akurasi diagnosis yang paling baik dalam mendeteksi dan membedakan KHS dengan non-KHS sehingga dapat digunakan untuk diagnosis dan tes penampisan pada KHS.¹⁵

AFP adalah biomarker yang paling banyak digunakan dalam penampisan dan diagnosis KHS. Nilai *cutoff* 20 ng/ml digunakan untuk penampisan dan mempunyai sensitivitas 41-65% dan spesifisitas 80-94%. Dengan menaikkan *cutoff* menjadi 200 ng/ml maka spesifisitasnya akan meningkat walaupun sensitivitasnya akan turun menjadi 22%.⁴ Sensitivitasnya semakin menurun hanya 25% pada KHS berukuran <3 cm. Walaupun *cutoff* 200 ml/ml mempunyai spesifisitas 99% untuk KHS, hasil positif palsu bisa didapatkan pada pasien dengan keganasan germinal, kanker gaster dan keganasan saluran bilier (kolangiokarsinoma). Karena spesifisitasnya yang tidak sempurna, panduan terbaru sudah tidak mencantumkan AFP sebagai tes diagnosis.¹⁶ AFP juga terbukti tidak efektif untuk mendiagnosis KHS akibat *Non Alcoholic Steatohepatitis* (NASH). Studi oleh Wong dkk menyatakan sensitivitas AFP hanya 47% pada pasien dengan KHS terkait NASH dan 67.2% pada KHS terkait hepatitis.¹⁷

Dari studi yang ada, DCP atau yang dikenal dengan PIVKA-II memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan AFP terutama pada KHS yang terkait NASH.¹⁸ Selain itu DCP juga lebih superior untuk mendeteksi KHS non-sitotik.¹⁰ Pemeriksaan dengan *Enzim Immunoassay* (EIA) untuk mendeteksi KHS menggunakan *cutoff* 0,1 absorbance units (AU)/ml. Belakangan ini di Jepang telah dikembangkan pemeriksaan EIA yang lebih sensitive dimana nilai *cutoff* 40mAU/ml mempunyai sensitivitas 61,5% dan spesifisitas 94,7% untuk mendiagnosis KHS.¹⁹ Studi meta-analisis bivariat yang dilakukan Gao dkk menunjukkan DCP memiliki *positive likelihood ratio* (PLR) 7,9 dan *negative likelihood ratio* (NLR) 0,89 yang membuat peranannya sedang dalam diagnosis KHS.²⁰ Nilai akurasinya juga menurun pada ikterus obstruktif berkepanjangan, kolestasis intrahepatik dengan defisiensi vitamin K, dan penggunaan warfarin.

DCP dikaitkan dengan adanya invasi vena porta trombosis vena hepatica, metastasis intrahepatik dan infiltrasi kapsular sehingga berkaitan dengan prognosis.²¹

Tidak adanya hubungan antara nilai AFP dan DCP membuat penggunaannya sebagai kombinasi lebih superior karena meningkatkan sensitivitas tanpa mengurangi spesifisitas.^{7,10,22} Studi yang dilakukan Tanabe dkk mendapatkan 60% pasien dengan KHS terdeteksi dengan AFP atau DCP dan ketika digunakan sebagai kombinasi sensitivitasnya meningkat menjadi 80%.²³ Dengan menggunakan *cutoff* 200 ng/mL untuk AFP dan 40 mAU/MI untuk DCP maka sensitivitas, spesifisitas dan PLR untuk KHS kecil sebesar 0,48, 0,99 dan 48.⁷ Dari hasil studi ini, DCP ternyata tidak lebih baik dibandingkan AFP dalam mendiagnosis KHS namun penggunaannya dalam kombinasi dengan AFP memberikan hasil akurasi yang lebih baik.¹⁵

AFP-L3 merupakan glikosilasi subfraksi dari AFP dan lebih spesifik terhadap keganasan hepatosit dibandingkan AFP oleh karena itu dapat membedakan peningkatan AFP karena KHS atau penyebab diluar keganasan. Hasilnya dilaporkan dalam bentuk rasio AFP-L3 dibagi total AFP dalam persen. Rasio ini tidak dapat digunakan pada nilai AFP yang rendah <10 ng/mL.¹⁹ Baru-baru ini *high sensitive* AFP-L3 (hs AFP-L3) menggunakan metode μ TAS memiliki sensitivitas yang lebih baik dibanding LiBASys dan dapat digunakan pada AFP <20 ng/mL.¹¹ Nilai *cutoff* 5% mempunyai sensitivitas 41,5% dan spesifisitas 85,1%.¹⁹ Jika nilai *cutoff* nya dinaikkan menjadi 35%, maka spesifisitasnya mencapai 100% walaupun sensitivitasnya turun menjadi 33%.¹⁵ Sensitifitasnya berhubungan dengan staging dari KHS dimana jika tumor berukuran <2 cm sensitifitasnya 35-45% dan akan meningkat hingga 80-90% pada tumor berukuran > 5 cm. AFP-L3 juga dihubungkan dengan metastasis intrahepatik dan adanya invasi vaskular sehingga dapat digunakan sebagai indikator derajat keparahan dan prognosis.²¹ Dari hasil studi ini didapatkan AFP-L3 baik penggunaan tunggal maupun dikombinasi dengan AFP ternyata tidak lebih baik dibandingkan dengan AFP tunggal. Interpretasi dari hasil ini harus berhati-hati karena perbedaan epidemiologi, *cutoff*, dan metodologi test yang digunakan.¹⁵

GP73 merupakan glikoprotein yang diekspresikan di sel epitel bilier dalam keadaan normal namun tidak di sel hepatosit. Pada penyakit hati, ekspresi GP73 di sel hati meningkat.²¹ GP73 dapat meningkat kadarnya pada karier hepatitis B, sirosis, tumor hati non-KHS dan keganasan diluar hati walaupun peningkatan ini tidak signifikan dibandingkan pada KHS. Dengan menggunakan *cutoff* 8,5 relative units (ru), sensitivitas dan spesifisitasnya lebih baik

dibandingkan AFP dalam mendiagnosis KHS (74,6% vs 58,2% dan 97,4% vs 85,3%).¹² Studi meta-analisis dari Witjens dkk juga menyatakan GP73 merupakan biomarker yang lebih superior dibandingkan AFP untuk penampisan KHS.²⁴ GP73 merupakan biomarker yang potensial untuk KHS dan penggunaannya sebagai kombinasi dengan AFP dapat meningkatkan sensitivitas hingga 89,2% dan spesifisitas 85,2%.^{13,25} Hasil yang sesuai didapatkan pada meta-analisis ini dimana kombinasi GP73 dengan AFP lebih baik daripada AFP tunggal sebagai tes diagnostik KHS.¹⁵

Xu dkk meneliti tentang peranan biomarker AFP-L3 dan GP73 pada KHS dengan AFP yang rendah ($\leq 200 \mu\text{g/L}$). AFP-L3 memiliki akurasi diagnosis sebesar 88,7% dan GP3 sebesar 92,8%. Kombinasi AFP-L3 dan GP73 mempunyai sensitivitas 94% dan spesifisitas 93,1% dengan akurasi diagnosis 93,3% sehingga kombinasi keduanya dapat dipertimbangkan pada KHS dengan AFP yang rendah.²⁶

Kelemahan dari meta-analisis ini adalah penulis tidak menilai kualitas metodologi dari masing-masing studi. Penulis juga tidak mencantumkan metodologi penelitian dan hanya menggunakan artikel yang berbahasa inggris sehingga kemungkinan adanya bias. Tidak adanya analisis heterogenitas serta adanya perbedaan epidemiologi, metode pemeriksaan (LiBASys, μTAS , ELISA, Western Blot, EIA, IAUEC, LAEC) dan nilai *cutoff* dari masing-masing studi juga merupakan kelemahan dari penelitian ini karena berpengaruh terhadap hasil dari tes diagnosis.

KESIMPULAN

Deteksi dan diagnosis awal KHS penting untuk meningkatkan prognosis dan memperpanjang harapan hidup. Belum ada biomarker yang efektif sebagai test penampisan dan diagnosis KHS karena terbatasnya sensitivitas dan spesifisitas. GP73 merupakan biomarker yang potensial untuk diagnosis KHS dan penggunaannya sebagai kombinasi dengan AFP dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas. Diperlukan studi prospektif lebih lanjut menilai peranan GP73 baik pemeriksaan tunggal maupun kombinasi dengan AFP, nilai *cutoff* dengan metode pemeriksaannya, serta analisis efektivitas biaya pemeriksaan tersebut sebagai tes diagnostik KHS.

DAFTAR PUSTAKA

1. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012 Apr;56(4):908-43.
2. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F: Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004, 127:S35–S50.
3. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 20;27(9):1485-91.
4. Bruix J, Sherman M, Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology.* 2011 Mar; 53(3): 1020–2.
5. Xu Q, Kobayashi S, Ye X, Meng X. Comparison of Hepatic Resection and Radiofrequency Ablation for Small Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis of 16,103 Patients. *Sci Rep.* 2014 Nov 28;4:7252.
6. Zhao YJ, Ju Q, Li GC. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology.* 2013;1(4):593-8.
7. Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, Chen PJ, Lin SM, Yoshida H. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int.* 2010 Mar 18;4(2):439-74.
8. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology.* 2003 May;37(5):1114-21.
9. Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009 Jul;137(1):110-8.
10. Ertle JM, Heider D, Wichert M, Keller B, Kueper R, Hilgard P, et al. A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion.* 2013;87(2):121-31.

11. Yi X, Yu S, Bao Y. Alpha-fetoprotein-L3 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2013 Oct 21;425:212-20.
12. Zhou Y, Yin X, Ying J, Zhang B. Golgi protein 73 versus alpha-fetoprotein as a biomarker for hepatocellular carcinoma: a diagnostic meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012 Jan 16;12:7.
13. Wang Y, Yang H, Xu H, Lu X, Sang X, Zhong S, et al. Golgi protein 73, not Glypican-3, may be a tumor marker complementary to α -Fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Mar;29(3):597-602.
14. Centre for Evidence-Based Medicine. Critical Appraisal tools. [Online]. [cited 2015 Apr 17]; Available from: [URL:http://www.cebm.net/critical-appraisal/](http://www.cebm.net/critical-appraisal/)
15. Hu B, Tian X, Sun J, Meng X. Evaluation of individual and combined applications of serum biomarkers for diagnosis of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2013 Dec 2;14(12):23559-80.
16. Rich N, Singal AG. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014 Oct;28(5):843-53.
17. Wong LL, Kim CJ, Kwee SA, Hernandez BY. Alpha-fetoprotein testing for hepatocellular carcinoma may not be helpful in nonalcoholic steatohepatitis. *Open Journal of Gastroenterology* 3 (2013) 49-54.
18. Voiculescu M, Nanau RM, Neuman MG. Non-invasive biomarkers in non-alcoholic steatohepatitis-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2014 Dec;23(4):425-9.
19. Huang TS, Shyu YC, Turner R, Chen HY, Chen PJ. Diagnostic performance of alpha-fetoprotein, lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and glypican-3 for the detection of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis protocol. *Dig Dis Sci*. 2014 Feb;59(2):238-41. *Syst Rev*. Jun 2013;2:37.
20. Gao P, Li M, Tian QB, Liu DW. Diagnostic performance of des- γ -carboxy prothrombin (DCP) for hepatocellular carcinoma: a bivariate meta-analysis. *Neoplasma*. 2012;59(2):150-9.
21. Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, Berreta M, Cappellani A, Malaguarnera M. Serum Markers of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci* (2010) 55:2744–55.

22. Tokushige K, Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, et al. Prospective study of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis in comparison with hepatocellular carcinoma caused by chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2010 Sep;45(9):960-7.
23. Tanabe T, Fukuda A, Oohashi R, Fukui H, Tsuda Y, Teramura K, et al. Clinical Characteristics and Difference at First Detection among Hepatocellular Carcinoma Patients with Hepatitis B-, C- Virus, and Diagnosed as Non-B Non-C type. *Bulletin of the Osaka Medical College*. 2007;53(1):21-32.
24. Witjes CD, van Aalten SM, Steyerberg EW, Borsboom GJ, de Man RA, Verhoef C, et al. Recently introduced biomarkers for screening of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int*. 2013 Mar;7(1):59-64.
25. Mao Y, Yang H, Xu H, Lu X, Sang X, Du S, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2010 Dec;59(12):1687-93.
26. Xu WJ, Guo BL, Han YG, Shi L, Ma WS. Diagnostic value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels. *Tumour Biol*. 2014 Dec;35(12):12069-74.