La fase preanalitica nella misura del [-2]proPSA e dell'Indice di Salute Prostatica

Ferruccio Ceriotti, Marina Pontillo, Luigi Fasoli, Fernanda Dorigatti
Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano

ABSTRACT

Pre-analytical phase of [-2]proPSA measurement and Prostate Health Index calculation. Prostate carcinoma is the most common cancer in men. The [-2]proPSA and derived Prostate Health Index (PHI) are new proposed markers for this neoplastic condition. Unfortunately, if the serum is not immediately separated from the clot, concentrations of [-2]proPSA spuriously increase *in vitro*. Aim of our work was to test if use of serum separator tubes or sample refrigeration were effective in stabilizing [-2]proPSA. Sera were collected from two groups of 25 and 35 patients requiring PHI estimate. From both groups, besides the usual serum sample, centrifuged and separated from the clot within a maximum of 90 min, additional samples in a tube with serum separator or in a second tube kept in a water-ice bath were taken. In both cases, the centrifuged sera were kept on the clot for 5 h at room temperature or in refrigerator and then separated and frozen at -80 °C. All the aliquots were thawed and analyzed in the same run to avoid run to run variation. Both solutions, i.e. the use of serum separator or the immediate refrigeration of the sample, were effective in reducing the *in vitro* increase of [-2]proPSA. Unfortunately, the use of serum separator introduced a 5% negative bias in the measurement of total and free PSA, both necessary for the calculation of PHI, thus precluding the use of this type of sample. The immediate refrigeration stabilized the [-2]proPSA concentrations, but was unable to avoid free PSA reduction, so that the calculation of PHI was still inaccurate. In conclusion, [-2]proPSA can be effectively stabilized, but free PSA can not. Thus, for an accurate estimate of PHI, an immediate separation of serum from the clot is highly recommended.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della prostata è la neoplasia più frequente nei soggetti di sesso maschile. In Italia rappresenta il 22% di tutte le neoplasie dell'uomo e negli Stati Uniti si stima che possa aver causato 32.050 morti nel 2010 (1, 2). L'introduzione della determinazione dell'antigene prostatico-specifico (PSA) sembrava poter rappresentare la soluzione definitiva in termini diagnostici per questo tumore (3), ma ben presto ne sono emersi i limiti di specificità, tanto che lo stesso Stamey, già nel 2004, decretava che il tempo del PSA come marcatore per il tumore della prostata era terminato (4). Più recentemente, si è affacciato all'orizzonte un nuovo promettente marcatore, denominato [-2]proPSA. Descritto per la prima volta da Mikolajczyk et. al. nel 1997 (5), il [-2]proPSA è un'isoforma del proPSA, precursore del marcatore, che non viene trasformata in PSA, rappresenta nel plasma una frazione del PSA libero ed è rilasciato in circolo in maggior quantità in soggetti affetti da carcinoma prostatico (6). Solo recentemente è stato commercializzato un metodo automatizzato per la misura del [-2]proPSA e sono apparsi i primi lavori che ne indicherebbero la superiorità diagnostica non solo rispetto al PSA totale, ma anche al rapporto PSA libero/PSA totale (7, 8). In realtà non è tanto la misura del [-2]proPSA a essere particolarmente utile, quanto il calcolo dell'Indice di Salute Prostatica ("Prostate Health Index", PHI), in cui il [-2]proPSA è inserito, insieme al PSA totale e al PSA libero, come segue: PHI = ([-2]proPSA/PSA libero) x √PSA totale.

Sfortunatamente però, la misura del [-2]proPSA presenta alcuni problemi preanalitici. Il siero, infatti, deve essere separato rapidamente dai globuli rossi, altrimenti, probabilmente a causa dell'azione di enzimi proteasici che agiscono sulle altre forme di proPSA, la concentrazione di [-2]proPSA aumenta (9). In particolare, sulla base dei dati di Semjonow et al. (9) la casa produttrice del reattivo indica la necessità di separare il siero entro un massimo di 3 ore dal prelievo. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare due possibili modalità alternative per superare il problema: l'utilizzo di una provetta con gel separatore di siero oppure il mantenimento del campione a bassa temperatura. Inoltre, visto che il dato fondamentale dal punto di vista clinico non è tanto quello del [-2]proPSA quanto quello del PHI, si sono verificati gli effetti delle modalità di trattamento del campione anche sulle determinazioni di PSA totale e libero e quindi sul calcolo finale dell'indice PHI.

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano. Tel. 0226432282, Fax 0226432640, E-mail ceriotti.ferruccio@hsr.it

Ricevuto: 24.06.2011 Revisionato: 19.07.2011 Accettato: 21.07.2011

MATERIALI E METODI

Pazienti e campioni

A due gruppi rispettivamente di 25 e 35 pazienti che si sono rivolti al nostro laboratorio per la misura del PHI, previo consenso informato, è stata prelevata, oltre al campione di sangue necessario per l'analisi dei biomarcatori in siero (raccolto in provetta Vacutainer 7mL, cod. 368817, Becton Dickinson), una provetta aggiuntiva. Al primo gruppo di 25 pazienti è stata aggiunta una provetta Vacutainer SST II (Becton Dickinson) con gel separatore di siero (cod. 367957). Al secondo gruppo, una seconda provetta identica alla prima, che però è stata posta in un contenitore con acqua e ghiaccio immediatamente dopo il prelievo.

Nel primo gruppo, entrambe le provette sono state centrifugate contemporaneamente entro 90 min dal prelievo. Dopo la centrifugazione è stata prelevata una aliquota da ciascun campione e le aliquote sono state immediatamente congelate a -80 °C. Entrambe le provette sono state lasciate a temperatura ambiente per ulteriori 5 ore, al termine delle quali è stata prelevata una seconda aliquota, anch'essa congelata a -80 °C.

Nel secondo gruppo, si è proceduto come per il gruppo precedente, ma l'intervallo tra prelievo e centrifugazione non ha mai superato i 45 min. Anche in questo caso, dopo il prelievo della prima aliquota subito congelata a -80 °C, le provette sono state conservate per altre 5 ore, quella standard a temperatura ambiente e quella tenuta in ghiaccio in frigorifero (2–8 °C). Allo scadere delle 5 ore è stata prelevata da entrambe una seconda aliquota che è stata congelata a -80 °C.

Metodi

La determinazione di PSA totale, PSA libero e [-2]proPSA è stata eseguita su analizzatore Beckman DxI 800 (Beckman Coulter). Per i campioni del primo gruppo tutte le analisi sono state eseguite in duplicato, per quelli del secondo in singolo. Le analisi delle 4 aliquote appartenenti allo stesso soggetto sono sempre state eseguite nella stessa seduta analitica.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il "software" Ministat ver. 2.1. E' stata verificata in via preliminare la distribuzione dei dati. Poiché essa risultava non gaussiana, per il confronto tra dati appaiati è stato impiegato un test non-parametrico (test di Wilcoxon, noto anche come test U di Mann-Whitney) effettuato sui valori prima della trasformazione in percentuale.

RISULTATI

Le caratteristiche e i dati biochimici di tutti i soggetti arruolati per lo studio sono mostrati nella Tabella 1.

I risultati ottenuti nel gruppo 1 sono mostrati nella Tabella 2. L'utilizzo della provetta con gel separatore introduceva un bias negativo di ~5% sia sulla misura del PSA totale che in quella del PSA libero. In particolare, nel caso del PSA libero il valore si riduceva ulteriormente con la conservazione del campione per 5 ore a temperatura ambiente. Il [-2]proPSA al contrario non mostrava problemi e l'uso del gel, separando il siero dai globuli rossi, permetteva di stabilizzarlo anche a temperatura ambiente. Il valore del PHI è però influenzato dal bias negativo degli altri due parametri inclusi nel calcolo e quindi l'effetto complessivo, nel caso il campione sia conservato 5 ore a temperatura ambiente, è un incremento significativo del valore di PHI non dissimile da quello che accade sul siero senza separatore. Si è anche calcolato il valore del PHI utilizzando i valori di PSA totale e libero misurati sul siero da provetta senza separatore e quelli del [-2]proPSA ottenuti da provetta con separatore di siero, dopo 5 ore di conservazione a temperatura ambiente per entrambe le provette. Con questa modalità preanalitica, il valore di PHI incrementa, ma non in modo statisticamente significativo (mediana 102,7%, 10°÷90° percentile: 94,1%÷113,5%).

I risultati ottenuti nel secondo gruppo sono mostrati nella Tabella 3. La differenza delle concentrazioni di [-2]proPSA nel campione mantenuto a temperatura ambiente per un tempo di 45 min prima della centrifugazione e quello posto immediatamente a bassa temperatura fa sospettare che il fenomeno di clivaggio delle varie forme di proPSA avvenga fin dai primi minuti dopo il prelievo. La conservazione in frigorifero del campione dopo la centrifugazione consente di bloccare l'ulteriore formazione di [-2]proPSA, non essendo il lieve incremento ottenuto

Tabella 1
Caratteristiche dei soggetti arruolati nello studio

Gruppo	No. soggetti	Valore	Età (anni)	PSA totale (µg/L)	PSA libero (µg/L)	[-2]proPSA (ng/L)	PHI
1	25	Mediana	69	5,4	1,1	17,4	43
		Minimo	39	1,3	0,3	5,8	22,4
		Massimo	78	46,4	3,2	104,3	237,9
2	35	Mediana	67	5,8	1,0	15,9	36,4
		Minimo	52	1,5	0,4	5,1	11,1
		Massimo	81	58,8	5,5	88,3	182,0

PSA, antigene prostatico-specifico; PHI, Indice di Salute Prostatica.

Tabella 2
Effetto del gel separatore di siero e/o della conservazione dello stesso per 5 ore a temperatura ambiente sui parametri biochimici valutati. I valori sono espressi come recupero percentuale degli analiti e del calcolo derivato rispetto al valore basale (siero separato entro 90 min dal prelievo)

	Provetta senza separatore (conservata 5 ore a temperatura ambiente) Mediana (10°÷90° percentile)	Provetta con separatore (basale) Mediana (10°÷90° percentile)	Provetta con separatore (conservata 5 ore a temperatura ambiente) Mediana (10°÷90° percentile)
PSA totale	99,4% (95,9÷104,0)	94,3%[a] (89,7÷101,8)	95,9%[a] (91,6÷103,5)
PSA libero	98,8% (92,3÷103,8)	94,6%[b] (90,2÷98,9)	91,8%[b] (88,7÷96,3)
[-2]proPSA	106,0%[a] (96,6÷117,8)	100,4% (91,9÷107,6)	101,5% (93,1÷110,5)
PHI	109,0%[a] (96,3÷123,2)	103,3% (92,0÷114,6)	108,0%[b] (96,8÷118,3)

PSA, antigene prostatico-specifico; PHI, Indice di Salute Prostatica.
[a]P <0,05 e [b]P <0,001.

Tabella 3
Effetto del mantenimento del campione in ghiaccio e/o della conservazione del campione per 5 ore in frigorifero e a temperatura ambiente sui parametri biochimici valutati. I valori sono espressi come recupero percentuale degli analiti e del calcolo derivato rispetto al valore basale (siero separato entro 45 min dal prelievo)

	Campione conservato 5 ore a temperatura ambiente Mediana (10°÷90° percentile)	Campione in acqua e ghiaccio (basale) Mediana (10°÷90° percentile)	Campione immediatamente in acqua e ghiaccio, poi conservato 5 ore a 2-8 °C Mediana (10°÷90° percentile)
PSA totale	99,6% (93,8÷105,8)	102,1% (94,7÷106,9)	99,9% (90,9÷106,4)
PSA libero	95,5%[b] (89,5÷100,0)	98,6%[a] (93,4÷103,1)	94,0%[b] (87,6÷100,0)
[-2]proPSA	110,8%[b] (98,9÷126,3)	94,3%[b] (84,9÷102,4)	96,8%[a] (86,5÷106,6)
PHI	115,5%[b] (104,9÷135,7)	96,3% (86,2÷107,0)	102,1% (90,2÷116,8)

PSA, antigene prostatico-specifico; PHI, Indice di Salute Prostatica.
[a]P <0,05 e [b]P <0,001.

statisticamente significativo. La conservazione del campione in frigorifero comporta però una significativa riduzione della concentrazione di PSA libero, anche se il risultato del PHI rimane comunque non significativamente differente dal valore di riferimento (campione conservato a temperatura ambiente e separato entro 45 min dal prelievo).

DISCUSSIONE

Come anche indicato dai dati presenti in letteratura, la fase preanalitica della misura del [-2]proPSA e del PHI si conferma critica e in grado di condizionare significativamente l'interpretazione del risultato (9). In particolare, i risultati relativi al siero conservato per 5 ore a temperatura ambiente non separato dal coagulo indicano un aumento mediano dei valori di PHI del 15,5%, ma con incrementi, in singoli casi, anche del 35%–40%. Dato che i valori di PHI sembrano correlati a presenza e aggressività della neoplasia (8), una sovrastima di questo valore causato da aspetti preanalitici può avere conseguenze importanti per il paziente (biopsia e/o decisione di intervento chirurgico).

I risultati da noi ottenuti dimostrano che è possibile stabilizzare le concentrazioni di [-2]proPSA utilizzando una provetta con gel separatore oppure ponendo il campione di sangue in ghiaccio immediatamente dopo il prelievo. Entrambe le modalità risultano efficaci, per lo meno per l'intervallo di tempo da noi preso in considerazione (5 ore), che copre la maggior parte delle situazioni, inclusi i prelievi provenienti da sedi esterne, ma non sono esenti da problemi. In particolare, l'uso del gel separatore è risultato incompatibile con la misura di PSA totale e libero, introducendo una sottostima di ~5%, che comporta la conseguente sovrastima nel calcolo del PHI.

Una possibilità alternativa è quella di calcolare il valore del PHI utilizzando i valori di PSA totale e libero misurati sul siero da provetta senza separatore e quelli del [-2]proPSA ottenuti da provetta con separatore di siero. Utilizzando questo approccio, dopo 5 ore di

conservazione a temperatura ambiente, i risultati del PHI sembra rimangano accettabilmente stabili. Questo approccio presenta però lo svantaggio di richiedere un maggior quantitativo di sangue (due provette) e costi più alti per il prelievo.

La conservazione del campione in acqua e ghiaccio permette di usare una singola provetta, ma rallenta la fase di coagulazione e rende più difficile la separazione del coagulo. In ogni caso, mentre il PSA totale non presenta problemi di stabilità, il valore del PSA libero, misurato con il sistema analitico DxI 800 (ma non con altri metodi analitici, dati non mostrati) tende a diminuire con la conservazione. Tuttavia, i dati ottenuti per il PSA libero misurato su siero conservato 5 ore a temperatura ambiente non sembrano completamente riproducibili nelle due serie di esperimenti (Tabelle 2 e 3), anche se devono essere considerati alcuni importanti aspetti: nel secondo esperimento il tempo tra prelievo e centrifugazione era più breve e meglio controllato e la numerosità del campione del secondo esperimento era maggiore. Inoltre, nel secondo esperimento i campioni erano misurati in singolo e questo potrebbe aver aumentato l'influenza dell'imprecisione analitica sui risultati ottenuti.

In conclusione, anche se è possibile stabilizzare il [-2]proPSA, non è possibile stabilizzare completamente la misura del PHI a causa della variazione del PSA libero. Di conseguenza, oltre alla precauzione della conservazione a bassa temperatura, è sempre opportuno ridurre al minimo i tempi che intercorrono fra il prelievo e la separazione del siero (o la sua analisi).

BIBLIOGRAFIA

1. AIRTUM Working Group. Italian cancer figures, report 2010: Cancer prevalence in Italy. Patients living with cancer, long-term survivors and cured patients. Epidemiol Prev 2010;34(suppl 2):1-188.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010;60:277-300.
3. Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med 1987;317:909-16.
4. Stamey TA. The era of serum prostate specific antigen as a marker for biopsy of the prostate and detecting prostate cancer is now over in the USA. BJU Int 2004;94:963-4.
5. Mikolajczyk SD, Grauer LS, Millar LS, et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. Urology 1997;50:710-4.
6. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, et al. Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. Clin Chem 2004;50:1017-25.
7. Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010;19:1193-200.
8. Guazzoni G, Nava L, Lazzeri M, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. Eur Urol 2011;60:214-22.
9. Semjonow A, Köpke T, Eltze E, et al. Pre-analytical in-vitro stability of [-2]proPSA in blood and serum. Clin Biochem 2010;43:926-8.