

Antigene prostata-specifico totale, libero e complessato: relazioni tra le differenti misure

Luisa Scapellato¹, Anna Pagani², Carlo Franzini³

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche, Ospedale L. Sacco, Milano

²Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica e ³Dipartimento di Scienze Cliniche L.Sacco, Università degli Studi di Milano, Milano

ABSTRACT

Total, free and complexed prostate-specific antigen: relationships among the different measurements

Measurement of the free portion of serum prostate specific antigen (fPSA), generally reported as free to total PSA ratio (f/t PSA), is widely used for modulating the medical decision in the presence of moderately increased levels of total serum PSA. Alternatively, the complexed portion of serum PSA (cPSA) can be measured. In order to evaluate possible differences in patients' classification resulting from the two different measurements, we assayed fPSA, cPSA and tPSA in 298 serum samples selected independently from the clinical diagnosis, covering the 2.0-25.9 ng/mL interval of total PSA concentration. 206 of such samples had PSA levels in the "grey-zone" interval (4.0-10.0 ng/mL). The sum (fPSA + cPSA) agreed with measured tPSA values, both in the whole group (n=298) and in the grey-zone subgroup of sera (n=206), pointing out at equimolarity of measurements. The f/t PSA ratios were calculated either from fPSA and tPSA results or from cPSA and tPSA results. In the grey-zone subgroup the two sets of calculated ratios agreed: taking 0.20 as the ratio's cut-off value for the ratio, patient's classification agreed in 168 (82%) case and disagreed in 38 (18%) cases. In most cases, however, different classification was due to small variations among the ratio values.

RIASSUNTO

La misura della porzione libera dell'antigene prostata-specifico del siero (fPSA), generalmente refertata come rapporto PSA libero/totale (f/t PSA), è ampiamente usata per modulare la decisione medica in presenza di livelli moderatamente aumentati di PSA totale del siero. In via alternativa è possibile misurare la porzione complessata (cPSA) del marcatore del siero. Ai fini di valutare le possibile differenze nella classificazione dei pazienti derivanti dalle due differenti misure, abbiamo determinato fPSA, cPSA e tPSA in 298 campioni di siero selezionati indipendentemente dalla diagnosi clinica, coprenti l'intervallo di valori di tPSA da 2,0 a 25,9 ng/mL. 206 di tali campioni avevano valori di PSA compresi nella cosiddetta "zona grigia" (4-10 ng/mL). I valori della somma (fPSA + cPSA) sono risultati in accordo con quelli del tPSA misurato, nell'intero gruppo (n=298) e nel sottogruppo di zona grigia (n=206), indicando la equimolarità delle differenti misure. Il rapporto fPSA/tPSA è stato calcolato sia dalle misure di fPSA e tPSA, sia dalle misure di cPSA e tPSA come: rapporto = (tPSA - cPSA)/tPSA. Nei campioni del sottogruppo di zona grigia i valori di rapporto calcolati con i due modi erano in buon accordo: prendendo il valore di 0,20 come valore soglia per il rapporto, la classificazione dei 206 pazienti di zona grigia coincideva in 168 casi (82,5%) e non coincideva in 38 casi (18%). Nella massima parte dei casi, tuttavia, la differente classificazione era dovuta a piccole differenze tra i valori di rapporto calcolati nei due modi.

INTRODUZIONE

Da quando la misura dell'Antigene Prostata-Specifico (PSA) del siero è stata introdotta nell'uso clinico ai fini del riconoscimento e della sorveglianza del carcinoma della prostata, si sono seguite diverse vie nel tentativo di migliorarne la predittività, come il calcolo del rapporto tra la concentrazione del marcatore nel siero ed il volume della ghiandola prostatica (1), la velocità di aumento della sua concentrazione nel siero (2), l'utilizzo di intervalli di riferimento specifici per fascia di età (3). Un ulteriore approccio, rivolto al medesimo scopo, è stato quello di misurare separatamente le diverse "isoforme" o le differenti specie chimiche secondo cui la molecola immunoreattiva è presente nel siero.

Considerando che il PSA, in prima approssimazione, è presente nel siero in tre forme principali (libero, 18% circa; legato alla α -1-anti-chimotripsina, 60% circa; legato alla α -2-macroglobulina, 20% circa) (4), e che l'ultima porzione non è riconosciuta dagli anticorpi impiegati per la misura del PSA totale, si è adottata ai fini clinici la convenzione di dividere il PSA totale del siero (tPSA) in due frazioni principali, il "PSA libero" (fPSA) ed il PSA complessato (cPSA), questa ultima considerata corrispondente sostanzialmente alla porzione di PSA legato alla α -1-anti-chimotripsina (PSA-ACT) (5) e liberamente reagente con gli anticorpi anti-PSA.

In realtà la situazione è più complessa. Oggi si riconosce che fPSA del siero comprende in realtà almeno tre forme distinte (6), caratterizzate da diversa integrità della

catena polipeptidica e/o differente conservazione della attività enzimatica specifica. Di esse, una denominata antigene prostata-specifico benigno (BPSA), non si modificherebbe nel corso di carcinoma prostatico (PCa) ma darebbe indicazioni per l'esistenza di iperplasia prostatica benigna (BPH) (7). Anche il legame proteico del PSA nel siero è più complesso. Una porzione minore ma significativa del PSA di sieri con elevate concentrazioni del marcatore si lega ad altre proteine, tra cui l' α -1-inibitore delle proteasi, API): la proporzione del complesso PSA-API risulta minore nei portatori di PCa nei confronti della BPH (8).

Per una serie di motivi, includenti le disponibilità offerte dai sistemi commerciali e la difficoltà alla misura specifica delle differenti forme libere o complessate, nel laboratorio clinico ordinario si adotta tuttora la approssimazione convenzionale di misurare le forme tPSA, fPSA e cPSA come sopra accennato. Già dal momento della descrizione del complesso PSA-ACT si era osservato che tale frazione è il principale responsabile degli aumenti di PSA del siero, e che la proporzione del complesso aumenta in presenza di carcinoma prostatico (9). Ciononostante, e nonostante che fPSA rappresenti la frazione minore del totale e che tale frazione tenda a diminuire in presenza di PCa, la misura di tale frazione è stata la prima ad essere introdotta nel laboratorio clinico ordinario, con una scelta apparentemente irrazionale ma dettata da ragioni analitiche (10). La misura del fPSA (in genere espressa come rapporto fPSA/tPSA) è così diventata un approccio "standard" per modulare la decisione clinica in presenza di valori di PSA moderatamente aumentati (11), soprattutto in quell'intervallo di valori dubbi (generalmente indicati come "zona grigia") di PSA totale, per lo più considerato come compreso tra 4 e 10 ng/mL, anche se viene avanzata qualche cautela sull'utilizzo di tale misura ai fini di screening (12).

Più recentemente è stata resa disponibile la misura di cPSA con sistemi commerciali automatizzati. Esperienze relative alla valutazione dei vantaggi/svantaggi della misura di cPSA nei confronti di fPSA sono riportate nella letteratura, con risultati non sempre univoci, derivanti verosimilmente da differenze dei diversi sistemi valutati e dalla "equimolarità" con cui le differenti frazioni vengono misurate.

In vista di ciò abbiamo valutato, su una serie abbastanza ampia di sieri indipendentemente dalla diagnosi clinica dei singoli pazienti, e con l'uso di uno specifico sistema analitico, quale grado di concordanza/discordanza era da attendersi nelle conclusioni derivanti dalla misura di cPSA nei confronti di fPSA. Questo anche in conseguenza del fatto che motivi di tipo organizzativo ci inducevano a sostituire un strumento in grado di misurare fPSA con uno in cui la disponibilità di fPSA era annunciata essere ad esaurimento in vista della disponibilità della misura di cPSA. I risultati qui riportati sono stati comunicati in via preliminare al Congresso Nazionale SIBioC 2002 (13).

MATERIALI E METODI

Dal carico di lavoro giornaliero si sono selezionati 298

sieri con valori di tPSA compresi tra 2,0 e 25,9 ng/mL. I campioni sono stati selezionati senza nessun riferimento alla diagnosi clinica, avendo cura che i 298 campioni selezionati derivassero da altrettanti pazienti differenti e che, nell'ambito dell'intervallo di valori prescelti, una porzione consistente dei campioni medesimi fosse rappresentata da sieri di "zona grigia" di tPSA (4,0 - 10,0 ng/mL) (14). Questi ultimi sono risultati 206 (69 % del totale). I campioni sono stati analizzati in 7 serie analitiche, nel giorno del prelievo o dopo un massimo di 30 giorni di conservazione a -20°C. In tutti i campioni è stata misurata la concentrazione di tPSA, fPSA e cPSA con strumento Advia Centaur (Bayer Spa, Milano) seguendo le istruzioni ed i procedimenti di calibrazione suggeriti dal produttore.

Brevemente, i metodi per la misurazione completamente automatica del marcatore e delle sue frazioni sono basati su analisi immunochimica in formato "sandwich", con marcatore chemiluminescente (estere di acridinio) e con particelle magnetiche come fase solida. Per la determinazione di tPSA si utilizza un anticorpo anti-PSA policlonale legato al marcatore ed un anticorpo anti-PSA monoclonale legato alla fase solida; per fPSA si utilizza un sistema analogo basato su due anticorpi anti-PSA libero; per cPSA il sistema provvede automaticamente a pretrattare il campione con un anticorpo anti-PSA libero in grado di bloccare la reattività di fPSA, prima di eseguire la misurazione del PSA residuo reattivo con un sistema analogo a quello della determinazione di tPSA. I limiti di rivelazione indicati dal costruttore sono: tPSA, 0,01 ng/mL; fPSA, < 0,1 ng/mL; cPSA, 0,03 ng/mL. La imprecisione analitica per le tre misure (dal sistema di controllo di qualità interno, come valori di CV globali mensili) è risultata compresa tra 2,5 % e 4,0 %.

Dai valori di tPSA, fPSA e cPSA misurati come su indicato si è ricavato: "tPSA calcolato" come somma [fPSA + cPSA]; "rapporto f/t misurato" come rapporto [fPSA/tPSA]; "rapporto f/t calcolato" come rapporto [(tPSA-cPSA)/tPSA].

I risultati sono stati analizzati con tecniche statistiche usuali, in modo da avere valutazioni del grado di accordo e di associazione tra i valori (15), includenti: media; deviazione standard; analisi della regressione lineare non-parametrica di Passing e Bablok (16); calcolo del coefficiente di correlazione "r"; t di Student per dati non appaiati per la significatività delle differenze tra valori medi.

RISULTATI

La figura 1 mostra la relazione tra valori di tPSA, rispettivamente misurati e calcolati (come somma fPSA+cPSA) nell'intero gruppo di campioni (n = 298). I parametri della analisi statistica di questo confronto sono riportati nella tabella 1, prima riga. Il buon livello di accordo e di associazione tra queste due misure è documentato graficamente dall'allineamento dei singoli punti sulla retta di equivalenza ($y = x$) e dai valori assunti dai differenti parametri statistici. Nella figura 2 viene evidenziato l'accordo/associazione tra le due misure relativamente al

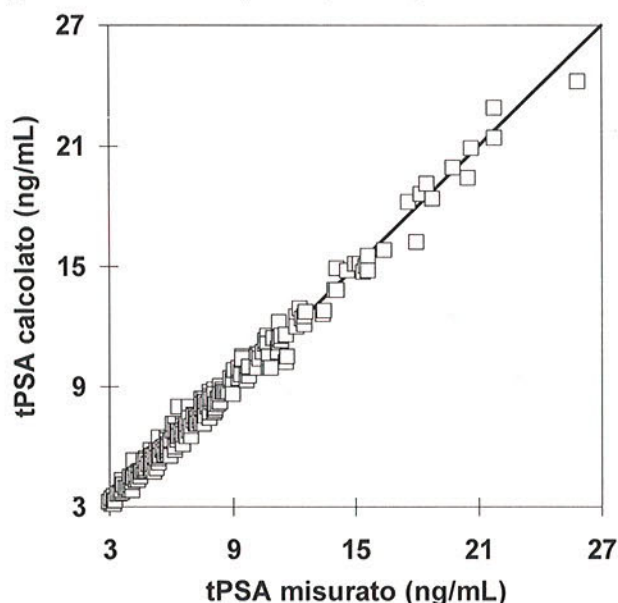
Tabella 1

Parametri statistici nei confronti "tPSA calcolato"/"tPSA misurato" (intero gruppo, n=298, e sottogruppo di "zona grigia", n=206) e nel confronto "rapporto f/t calcolato"/"rapporto f/t misurato" (sottogruppo di "zona grigia", n=206)

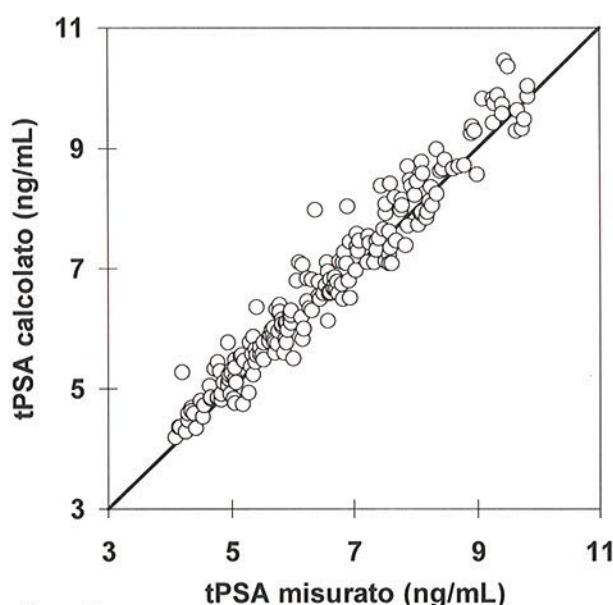
Confronto	Campioni	Media±D.S.		Regressione di P. & B.		R
		y (ng/mL)	x (ng/mL)	Pendenza	Intercetta (ng/mL)	
PSA totale calc.(y)/mis.(x)	Tutti (n=298)	7,62±3,79	7,75(*)±3,68	0,99 (0,97/1,00)	0,23 (0,20/0,35)	0,994
PSA totale calc.(y)/mis.(x)	tPSA=4-10 ng/ml (n=206)	6,55±1,45	6,72(*)±1,49	1,01 (0,98/1,04)	0,13 (-0,08/0,32)	0,974
Rapporto f/t PSA calc. (y)/mis.(x)	tPSA=4-10 ng/ml (n=206)	0,243±0,116	0,216(#)+0,106	1,06 (1,00/1,04)	0,014 (0,00/0,03)	0,886

(*) Differenze tra le medie non significative (P = 0,671 e P = 0,409 rispettivamente)

(#) Differenza tra le medie significativa (P = 0,016)

**Figura 1**

Relazione tra i valori di tPSA calcolato (come somma fPSA+PSA, da misure dirette della due frazioni) e valori di tPSA misurato, nell'intero gruppo di campioni (n = 298). Per i parametri statistici del confronto vedi tabella 1, prima riga. La linea continua è la linea di equivalenza ($y = x$).

**Figura 2**

Relazione tra i valori di tPSA calcolato (come somma fPSA+PSA, da misure dirette della due frazioni) e valori di tPSA misurato, nel sottogruppo di campioni di zona grigia (n = 206). Per i parametri statistici del confronto vedi tabella 1, seconda riga. La linea continua è la linea di equivalenza ($y = x$).

sottogruppo di campioni di "zona grigia" (valori di tPSA nell'intervallo 4-10 ng/mL; n = 206), accordo ed associazione confermati dai parametri statistici del confronto riportati nella tabella 1, seconda riga.

Nella figura 3, per il sottogruppo di campioni di "zona grigia", i valori del "rapporto f/t calcolato" sono confrontati con quelli del "rapporto f/t misurato" con la modalità grafica del "grafico delle differenze" (17). Si osserva un discreto accordo tra le due valutazioni del rapporto f/t, pur in presenza di un certo numero di aberranti. I parametri statistici di questo confronto sono riportati nella tabella 1, terza riga. Il valore medio \pm deviazione standard delle differenze (calcolato - misurato) è risultato $0,028 \pm 0,053$ per l'intero gruppo di campioni (n = 206). 7 di tali differenze sono risultate esterne all'intervallo media \pm 2DS. Escludendo tali valori la media \pm DS delle differenze assume il

valore di $0,022 \pm 0,044$: nella figura 3 sono riportate le linee corrispondenti a tale valore medio e quelle corrispondenti a $m \pm 2DS$.

Assumendo per il rapporto f/t il valore di 0,20 come discriminante, e confrontando le percentuali di classificazione dei 206 pazienti appartenenti al sottogruppo "zona grigia" in base alle due differenti modalità di valutazione di tale rapporto (rispettivamente, "misurato" e "calcolato") si osserva concordanza in 168 casi (82%) e discordanza in 38 casi (18%), come illustrato nella tabella 2. Spostando il valore discriminante a 0,10 le percentuali di concordanza/discordanza non si modificano sostanzialmente. Percentuali identiche di concordanza/discordanza si ottenevano confrontando la classificazione dei 206 pazienti sulla base del rapporto f/t misurato, con quella basata sul rapporto c/t anch'esso misurato, ed assumendo per questo

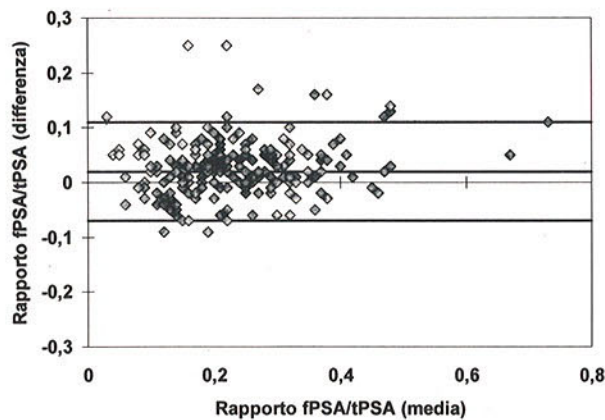
Tabella 2

Percentuali di accordo/disaccordo classificativo tra le due modalità di stima del rapporto f/t ("misurato" e "calcolato") per un valore di cut-off di 0,20. Dati riferiti al sottogruppo di campioni di "zona grigia" (n=206)

Rapporto f/t misurato (*)		Rapporto f/t calcolato (#)	
Valore di f/t	Numero di campioni	Valore di f/t	Numero di campioni
<0,20	77 (37,0)	<0,20 (accordo)	70 (34,0%)
		≥0,20 (disaccordo)	7 (3,4%)
≥0,20	129 (82,8%)	≥0,20 (accordo)	98 (47,6%)
		<0,20 (disaccordo)	31 (15,0%)

(*) dai valori di fPSA e tPSA misurati, come: rapporto f/t = fPSA/tPSA

(#) dai valori di cPSA e tPSA misurati, come: rapporto f/t = (tPSA-cPSA)/tPSA

**Figura 3**

Rapporto f/t nei campioni del sottogruppo di zona grigia (n = 206). Le differenze tra i valori di rapporto "calcolati" e quelli "misurati" sono riportate contro i valori medi. Le linee orizzontali corrispondono a (dall'alto al basso) m+2DS, m e m-2DS, calcolate dopo rimozione di 7 valori aberranti.

ultimo rapporto un valore discriminante di 0,80.

DISCUSSIONE

Per quanto concerne l'accordo tra tPSA misurato e tPSA calcolato (come somma fPSA+cPSA, entrambi misurati separatamente) i nostri risultati (figure 1 e 2) sono sostanzialmente simili a quelli riportati da altri, ottenuti da altri con metodi analitici differenti (18, 19), rispetto ai quali l'accordo è lievemente migliore. Questi dati dimostrano l'equimolarità delle tre misure indipendenti (20). La possibilità di effettuare misure equimolari è stata anche recentemente rimarcata come un importante fattore di attendibilità clinica dei risultati, in relazioni al problema di differenziare PCa da PBH (20-22).

Stante la menzionata consuetudine clinica di modulare la decisione clinica in presenza di valori di tPSA moderatamente aumentati (11) sulla base della misura addizionale di fPSA espresso come rapporto fPSA/tPSA ci è sembrato opportuno verificare l'impatto del cambiamento della misura (da fPSA a cPSA) e quindi di calcolo del rapporto

sulla classificazione dei pazienti. I nostri dati sono riferiti ad un gruppo-campione di sierici da pazienti di cui era ignota la diagnosi clinica; abbiamo comunque riscontrato accordo classificativo nell'82% dei casi, mentre nel 18 % restante la differente classificazione era basata su differenze modeste tra i due valori di rapporto f/t.

Decidendo di misurare cPSA invece di fPSA l'approccio più razionale sarebbe peraltro di esprimere la misura come rapporto cPSA/fPSA. E' stato riportato che sia il rapporto fPSA/tPSA sia il rapporto cPSA/tPSA sono potenzialmente in grado di ridurre il ricorso alla biopsia (23). E' significativamente in accordo con i nostri dati che un valore di cut-off vicino a 0,20 per il rapporto f/t si accompagni a sensibilità e specificità corrispondenti ad un valore vicino a 0,80 per il rapporto c/f (23).

Indipendentemente dal sostanziale accordo tra i due rapporti (f/t e c/t) comunque calcolati, ai fini della migliore significatività medica dei valori misurati si deve considerare: la migliore stabilità *in vitro* di cPSA (24); la minore variabilità biologica del rapporto cPSA/tPSA (25); la possibilità che la sola determinazione di cPSA, esprimendone i valori misurati in concentrazione anziché come rapporto, fornisca risultati di adeguata attendibilità clinica (26).

BIBLIOGRAFIA

1. Benson MC, Whang ID, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, et al. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992;147:815-6.
2. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, et al. Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992;267:2215-20.
3. Desterling JE, Jacobsen SJ, Cooner WH. The use of age specific reference ranges for serum prostate specific antigen in men 60 years old or older. *J Urol* 1995;153:1160-3.
4. Stenman U-H. Biochemistry and basic science. In Brawer MK (Ed.). Prostate specific antigen. Marcel Dekker Inc., New York, Basel 2001:9-29.
5. Milford Ward A, Catto JWF, Hamdy FC. Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem* 2001;38:633-51.
6. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002;59:797-802.
7. Linton HJ, Marks LS, Millar LS, Knott CL, Rittenhouse HG,

- Mikolajczyk SD. Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease. *Clin Chem* 2003;49:253-9.
8. Zhang W-M, Finne P, Leinonen J, Vesalainen S, Nordling S, Stenman U-H. Measurement of the complex between prostate-specific antigen and α -1-protease inhibitor in serum. *Clin Chem* 1999;45:814-21.
 9. Stenman U-H, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and α -1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* 1991;51:222-6.
 10. Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK. Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum. *Clin Chem* 1998;44:1216-23.
 11. Kroll M. Prostate cancer. Free PSA adds value to PSA testing. *Clin Lab News* 2002;April 2002:10-11.
 12. Scorilas A, Yu H, Soosaipillai AR, Gregorakis AK, Diamandis EP. Comparison of percent free prostate-specific antigen levels in the serum of healthy mean and in men with recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *Clin Chim Acta* 2000;292:127-38.
 13. Scapellato L, Franzini C. PSA libero o complessato: confronto tra le due misure (abstr.). *Biochim Clin* 2002;26:279.
 14. Li PE, Lange PH. Free and total PSA. In Brawer MK (Ed.). *Prostate specific antigen*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel 2001:91-117.
 15. Bland JN, Altman DG. Commentary on quantifying agreement between two methods of measurement. *Clin Chem* 2002;48:801-2.
 16. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
 17. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-10.
 18. Brawer MK. Alpha-1-antichymotrypsin complexed prostate specific antigen. In Brawer MK (Ed.). *Prostate specific antigen*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel 2001:119-36.
 19. Jung K, Brux B, Knabich A, Lein M, Sinha P, Schnorr D, et al. A gap between total prostate-specific antigen and the sum of free prostate-specific antigen plus α -1-antichymotrypsin-prostate-specific antigen in patients with prostate carcinoma but not in those with benign prostate hyperplasia. *Clin Chem* 1999;45:422-4.
 20. Oberpenning F, Weining C, Brandt B, De Angelis G, Heinicke A, Hamm M, et al. A new modification of the Chiron ACS assay for total prostate-specific antigen achieves equimolar response characteristics and improves the detection of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:90-4.
 21. Wians FH, Cheli CD, Balko JA, Bruzek DJ, Chan DW, Sokoll LJ. Evaluation of the clinical performance of equimolar- and skewed-response total prostate-specific antigens assays versus complexed and free PSA assays and their ratios in discriminating between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2002;326:81-95.
 22. Onur R, Ilhan N, Ilhan N. Increased discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer with equimolar total prostate specific antigen measurement. *World J Urol* 2003;21:43-7.
 23. Jung K, Elgett U, Lein M, Brux B, Sinha P, Rudolph B, et al. Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? *Clin Chem* 2000;46:55-62.
 24. Pironen T, Petterson K, Suonpaa M, Stenman U-H, Oesterling JE, Lovgren T, et al. *In vitro* stability of free prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific antigen (PSA) complexed to α -1-antichymotrypsin in blood samples. *Urology* 1996;48:81-7.
 25. Bunting PS, DeBoer C, Choo R, Danjoux C, Klotz L, Flesher N. Intraindividual variation of PSA, free PSA and complexed PSA in a cohort of patients with prostate cancer managed with watchful observation. *Clin Biochem* 2002;33:471-5.
 26. Kuriyama M, Ueno K, Uno H, Kawada Y, Akimoto S, Noda M, et al. Clinical evaluation of serum prostate-specific antigen alpha-1-antichymotrypsin complex values in diagnosis of prostate cancer: a cooperative study. *Int J Urol* 1998;5:48-54.