

Artikel

Omtrent de equimolariteit van prostaatspecifiek antigeen

B.G. BLIJENBERG¹, B.D. van ZELST¹ en F.H. SCHRÖDER²

Inleiding: Onderzoek uitgevoerd de laatste 10-15 jaar heeft geleid tot een harmonisatie van de bepalingen van vrij en totaal PSA voor vele op de markt zijnde methoden. Desalniettemin hebben wij een spreiding in resultaten tot 20 à 25% te accepteren, zoals enquêtes uitgevoerd door de SKML in de jaren 2002 en 2003 laten zien. Deze spreiding kan van invloed zijn op de klinische besluitvorming.

In ons onderzoek hebben wij getracht de vraag te beantwoorden of mogelijke afwijkingen in equimolariteit van belang kunnen zijn ter verklaring van de gevonden verschillen. Daarvoor hebben wij drie 'state-of-the-art'-methoden voor PSA met elkaar vergeleken gebruikmakend van serummonsters afkomstig van een lopende studie voor de vroege opsporing van prostaatkanker (European Study of Screening for Prostate Cancer, ERSPC).

Resultaten: In totaal 199 monsters werden geanalyseerd op de aanwezigheid van vrij en totaal PSA (totaal PSA-bereik: 0-15µg/l) door gebruikmaking van de Beckman (Access), PerkinElmer-Wallac (Prostatus) en Roche (E170) analyse-instrumenten. Uitstekende correlaties werden gevonden voor alle methoden voor totaal PSA, maar minder goede voor vrij PSA. De Access en E170 verschilden 6-7% voor totaal PSA (Access hoger dan E170) terwijl de Access en Prostatus, statistisch gezien, identieke resultaten gaven. Voor vrij PSA werden verschillen van ca. 4% gevonden bij vergelijking van de Access met de E170 (Access hoger dan E170) en van ca. 11% bij de Access en de Prostatus (Access lager dan Prostatus). Verdeling in twee groepen (laag en hoog vrij PSA) op basis van de ratio vrij/totaal PSA gaf geen verschil in regressielijn te zien. Tot slot werd een aanzienlijke spreiding gevonden bij alle onderlinge vrij-PSA-vergelijkingen.

Conclusies: Alle bepalingmethoden bleken totaal PSA min of meer equimolair te meten. Alleen de vergelijking Access-Prostatus resulteerde in een verschil van 3-4% tussen twee groepen met lage en hoge PSA-concentratie. Geringe verschillen in equimolariteit kunnen geen verklaring zijn voor juistheidsverschillen zoals geconstateerd in enquêtes.

De onderlinge vrij-PSA-vergelijkingen gaven zodanige verschillen en spreidingen te zien, dat gebruik van de ratio vrij/totaal-PSA bij klinische beslissingen kritisch dient te worden benaderd. De combinatie van vrij en totaal PSA van twee verschillende leveranciers is af te raden.

Trefwoorden: prostaatspecifiek antigeen; PSA; equimolariteit PSA

In eerdere publicaties hebben wij beschreven welke wetenschappelijke activiteiten een rol hebben gespeeld bij het bereiken van een betere vergelijkbaarheid met betrekking tot de tientallen testen voor de bepaling van totaal prostaatspecifiek antigeen (PSA) (1, 2). Kortweg betrof het de volgende ontwikkelingen.

1) Activiteiten die geleid hebben tot de bereiding en beschrijving van een gemeenschappelijke kalibrator (3).
2) Onderzoekingen die geresulteerd hebben in de ontdekking en toepassing van vrij en gecomplexeerd of vrij en totaal PSA (4, 5).

3) Studies met betrekking tot de toepasbaarheid en kwaliteit van de vele antilichamen tegen PSA (6).

Genoemde activiteiten vormden een goed voorbeeld van samenwerking tussen het professionele veld, de diagnostische industrie en officiële gremia ondanks de verschillen in belangen. Het gevolg van het een en ander is geweest, dat nagenoeg alle toonaangevende firma's de resultaten van deze ontwikkelingen hebben benut om de laatste jaren verandering/verbetering in hun PSA-methoden aan te brengen (7).

Harmonisatie van PSA-waarden, nationaal en internationaal, werd daarmee zichtbaar. Niettemin dienen wij anno 2004 te accepteren dat een zekere spreiding in deze waarden nog steeds aanwezig is, een spreiding die kan leiden tot klinische consequenties (8). Een onafhankelijke indruk van de omvang van deze variatie krijgt men bij bestudering van de uitkomsten van enkele bindingsanalyse-enquêtes van de SKML uit de jaren 2002 en 2003 (tabel 1).

In een vorig artikel gaven wij aan welke factoren zouden kunnen bijdragen aan het bestaan van methodische verschillen (2). Verondersteld wordt dat de complexe samenstelling van het eiwitmengsel dat wij gemakshalve totaal PSA noemen, een rol speelt in het bestaan van deze verschillen. Dit, omdat de afzonderlijke eiwitten een verschillende affiniteit zouden kunnen hebben ten opzichte van de antilichamen (die alle verschillend zijn) die leveranciers toepassen. Hier-

Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Urologie², Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam

Correspondentie: Dr. B.G. Blijenberg, Erasmus MC, Afdeling Klinische Chemie, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam
E-mail: b.g.blijenberg@erasmusmc.nl

Tabel 1. Enquêteresultaten van zes SKML-enquêtes uit 2002 en 2003. Totaal PSA in $\mu\text{g/l}$, variatiecoëfficiënt (VC) in %. VC's berekend uit resultaten van ten minste tien deelnemers.

	Gem. 1 (VC)	Gem. 2 (VC)	Gem. 3 (VC)	Gem. 4 (VC)	Gem. 5 (VC)	Gem. 6 (VC)
Beckman	2,6 (4,1)	2,9 (2,6)	4,5 (5,8)	5,3 (4,5)	6,3 (5,6)	6,8 (2,9)
Abbott	1,9 (7,1)	2,1 (7,3)	3,6 (8,1)	4,2 (6,6)	5,1 (7,7)	5,0 (6,9)
Bayer	2,2 (6,8)	2,3 (9,2)	3,9 (4,7)	4,3 (5,2)	4,7 (9,2)	5,5 (5,2)
DPC	2,4 (6,7)	2,5 (7,7)	4,4 (5,9)	5,0 (6,6)	6,0 (9,7)	6,2 (5,8)
Roche	2,2 (5,1)	2,5 (7,7)	3,9 (8,7)	4,4 (5,7)	5,6 (6,5)	5,8 (8,1)

over is echter nog nauwelijks enige literatuur beschikbaar. In ieder geval maakt het aannemelijk dat het begrip equimolariteit, gedefinieerd als de gelijkwaardige bepaling van vrij en gecompliceerd PSA bij de bepaling van totaal PSA, een begrip dat gaarne gehanteerd wordt door diagnostische firma's, met enige scepsis beschouwd dient te worden.

Bovengenoemde onzekerheden vormden onlangs de aanleiding voor een algemene discussie over de vergelijkbaarheid van bestaande PSA-methoden. Met name de vergelijking van de in de 'European Study of Screening for Prostate Cancer' (ERSPC), gebruikte methode voor de bepaling van totaal PSA, te weten de Beckman (Access), met de in 2003 geherkalibreerde PerkinElmer(Wallac)-bepaling voor vrij en totaal PSA, was van belang omdat deze laatste methode in enkele ERSPC-centra in een aantal nevenstudies is gebruikt.

Dit onderzoek beschrijft eventueel aanwezige verschillen in equimolariteit tussen genoemde methodes aan de hand van materiaal afkomstig uit de ERSPC, sectie Rotterdam. Ter vergelijking is een onafhankelijke methode meegenomen, zijnde de Roche (E170) bepaling. Tegelijkertijd hebben wij in het hetzelfde serumbestand het gehalte aan vrij PSA bepaald ter berekening van de ratio vrij/totaal-PSA. De achterliggende gedachte bij dit onderzoek was de vraag of een eventueel verschil in equimolariteit zou kunnen bijdragen aan een verklaring van de verschillen die in de SKML-enquêtes werden gevonden.

Materialen en Methoden

Methoden

Vrij en totaal PSA werden exact volgens voorschrift van de verschillende fabrikanten bepaald met de volgende methoden:

- Beckman-Coulter (Access), de geautomatiseerde versie van de oorspronkelijke Hybritech-methoden. De kalibratie van de Access is traceerbaar naar deze Hybritech-methoden zonder gebruikmaking van de WHO-kalibratoren. De bepalingen van vrij en totaal PSA worden apart uitgevoerd. Totale analysetijd per bepaling: 18 minuten.
- Roche (E 170), de Elecsys-versie uitgevoerd op een Modular Analytics E 170 systeem. De kalibraties van vrij en totaal PSA zijn traceerbaar naar de WHO-referentiepreparaten 96/668 en 96/670. Totale analysetijd per bepaling: 18 minuten.
- PerkinElmer Life and Analytical Sciences, de oorspronkelijke DELFIA-versie afkomstig van Wallac Oy (Turku, Finland): ProstatuTM PSA, PSA

Free/Total die in 2003 geherkalibreerd werd op basis van de onder b genoemde WHO-preparaten 96/668 en 96/670. In deze studie werd de manuele versie uitgevoerd met behulp van een 1234 DELFIA fluorimeter. Totale analysetijd per resultaat (vrij en totaal PSA): 2 uur.

Monsters

Gebruik gemaakt werd van 199 bloedmonsters die afkomstig waren van deelnemers van de sectie Rotterdam van de European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) (9). Gedurende de maanden april, mei en juni 2004 werd uit de binnenkomende monsters een selectie gemaakt uit die serummonsters waarvan de concentratie totaal PSA lag tussen ca. 0 en ca. 15 $\mu\text{g/l}$. Volgens protocol werd na binnenkomst eerst totaal PSA bepaald met behulp van de Beckman (Access) waarna vervolgens een aliquot voor verdere analyses werd ingevroren (-20 °C). Binnen 2-3 weken nadien werden de volgende analyses uitgevoerd. Per analysegang (30-40 monsters) werden de volgende bepalingen zo veel mogelijk gelijktijdig gedaan: vrij PSA Beckman (Access), vrij en totaal PSA Roche (E 170) en vrij en totaal PSA Wallac (Prostatu).

Statistiek

Voor de vergelijking van de diverse meetresultaten werd gebruik gemaakt van de regressieanalyse volgens Passing en Bablok zoals geïncorporeerd in het programma Analyse-It (Analyse-It Software Ltd., Leeds, Engeland).

Resultaten

Voor de in tabel 1 vermelde gegevens is gekozen voor bewerking van de resultaten van die enquête-monsters waarvan de waarden voor totaal PSA lagen in het klinisch belangrijke gebied van ca. 2 tot circa 7 $\mu\text{g/l}$. Verder zijn de gemiddeldes en variatiecoëfficiënten weergegeven van die methodes waarvan het totaal aantal deelnemers ten minste 10 bedroeg.

In eerste instantie zijn alle resultaten met betrekking tot vrij en totaal PSA voor de drie analyseapparaten grafisch weergegeven (figuren 1 en 2). De bijbehorende statistische gegevens staan in tabel 2. Er is ook een uitsplitsing gemaakt voor het PSA-bereik 0-5 $\mu\text{g/l}$, omdat dit bereik voor de diagnostiek van belang is. In figuur 3 is de vergelijking tussen de ratio-waarden vrij/totaal-PSA voor de drie methodes weergegeven voor het totale bestand ($n = 199$). In dit ratio-bestand werd vervolgens een cesuur aangebracht op basis van de Access-ratio 0,20. De regressieverge-

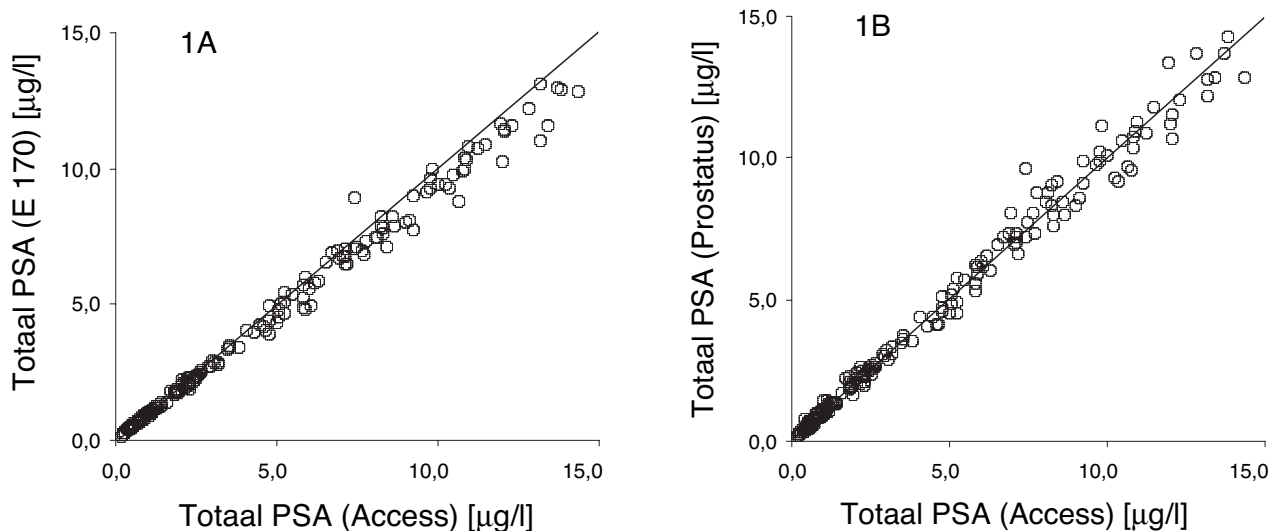
lijkingen voor totaal PSA behorende bij de verschillende subgroepen (ratio $\leq 0,20$ en ratio $\geq 0,21$) werden berekend en ook weergegeven in tabel 2.

De relatie tussen de ratiowaarden voor PSA en de onderlinge verhouding tussen de waarden voor totaal PSA van de verschillende methoden is afgebeeld in een Bland Altman Plot (figuur 4). Het quotiënt totaal PSA (Wallac)/totaal PSA (Beckman) is hierin uitgezet tegen de ratiowaarden zoals gemeten met de Beckman Access. Wallac en Beckman zijn hier gekozen als voorbeeld. De andere combinaties die gemaakt hadden kunnen worden, dus ook met de Roche-methode, laten een vergelijkbaar beeld zien en zijn weggelaten uit ruimtelijke overwegingen.

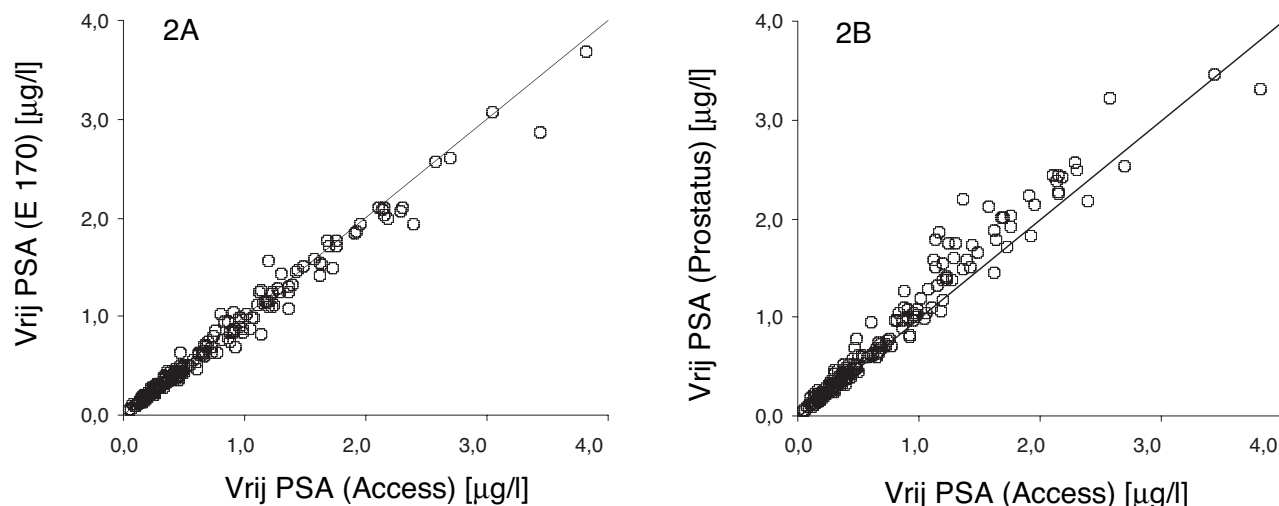
Tijdens de evaluatie werden ook de twee reeds bestaande Beckman-methoden, Tandem-E en Access, met elkaar vergeleken (figuur 5). In totaal werden 195 serummonsters geanalyseerd waarbij als regressievergelijking gevonden werd:

$$\text{Access} = 1,00 [0,98-1,02] \times (\text{Tandem-E}) - 0,1 [(-0,1)-0,0]$$

In de figuren 1, 2, 3 en 5 geven de getrokken lijnen de situatie $y=x$ weer.



Figuur 1. Grafische weergave van de resultaten voor totaal PSA. A. Access versus E170 en B. Access versus Prostatus.

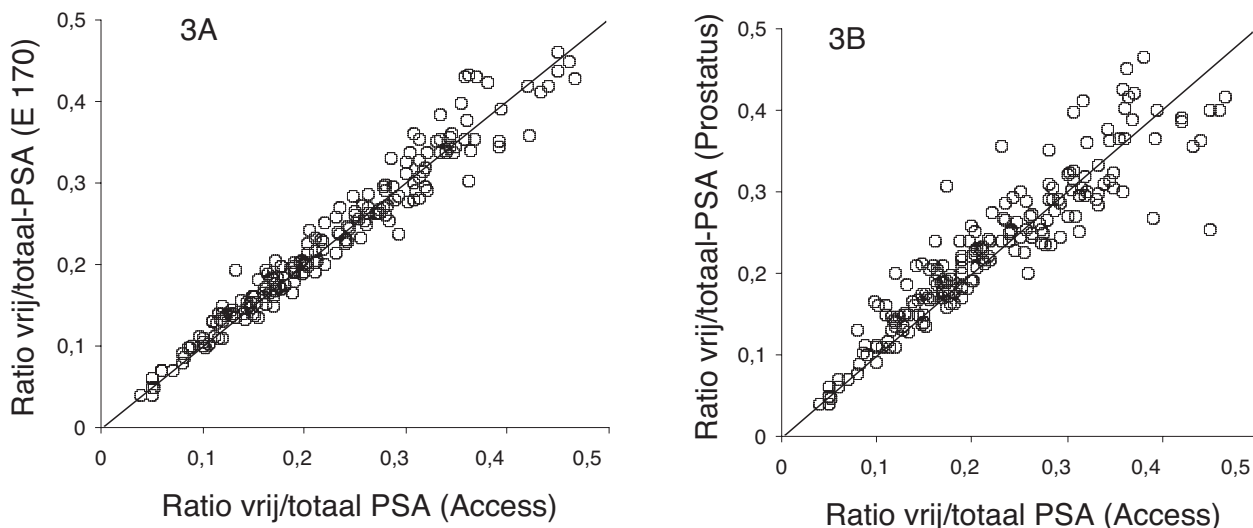


Figuur 2. Grafische weergave van de resultaten voor vrij PSA. A. Access versus E170 en B. Access versus Prostatus.

Discussie

Gegeven de kennis die wij anno 2004 van de biochemie van PSA hebben kan men zich afvragen wat de precieze betekenis van het begrip equimolariteit is bij de meting van totaal PSA. Het begrip kwam op in het begin van de jaren '90 van de vorige eeuw, toen de kennis omtrent het voorkomen van PSA in de bloedbaan zich beperkte tot drie vormen, te weten: 1) vrij PSA zijnde een 237 aminozuren bevattend eiwit, 2) PSA gebonden aan α_1 -antichymotrypsine en 3) PSA gebonden aan α_2 -macroglobuline. Bij de meting van PSA speelden alleen de eerste twee vormen een rol omdat van de derde weinig meer bekend was dan dat deze het PSA volledig inkapselde (10).

In deze situatie is in die zin verandering gekomen dat wij nu weten dat vrij en gebonden PSA allebei mengsels van een onbekend aantal eiwitten zijn. Er is echter nauwelijks iets bekend omtrent de samenstelling en mogelijke functie en relatie tussen van de afzonderlijke eiwitten in bloed en semen en ook niet in welke mate de in gebruik zijnde antilichamen eventueel verschillend reageren met deze eiwitten (11, 12).



Figuur 3. Grafische weergave van de resultaten voor de ratio vrij/totaal-PSA. A. Access versus E170 en B. Access versus Prostatus.

Het een en ander maakt een heldere definitie van equimolariteit niet goed mogelijk.

Pragmatisch redenerend mag men echter verwachten dat, gegeven het feit dat een aantal van deze eiwitten in beide PSA-fracties structureel een sterke gelijkenis vertonen, de epitopen op de verschillende PSA-moleculen niet zodanig zullen verschillen dat het onmogelijk zou zijn om de metingen van vrij en gebonden PSA met elkaar te vergelijken om daarmee toch van een equimolaire PSA-meting te kunnen spreken. Dit impliceert dat in geval men de equimolariteit van verschillende PSA-bepalingen zou willen vergelijken, er twee andere aspecten zijn die van belang kunnen zijn voor dit begrip, te weten: 1) mogelijke sterische hindering bij de binding van epitopen van het vrij PSA na complexering met het ca. 4x grotere α_1 -antichymotrypsine en 2) mogelijk verschil in reactiekinetiek met betrekking tot vrij PSA en het gecomplexeerde PSA, immers de huidige analysemethoden voor PSA kenmerken zich in het algemeen door een aanzienlijk kortere incubatietijd dan de vroegere. Beide aspecten kunnen van invloed zijn op de juistheid van enigerlei bepaling van totaal PSA en daarmee deels een verklaring vormen voor verschillen zoals weergegeven in tabel 1.

Wij hebben getracht op een relatief eenvoudige manier enig zicht te krijgen op bovengenoemde aspecten. Dat de methoden van Beckman en Wallac zijn gekozen vloeit voort uit de in de inleiding genoemde discussie. De Roche-methode is meegenomen vanwege het feit dat deze methode de routine-PSA-methode is voor het ErasmusMC. Wij zijn ons bewust van de beperking van onze keuze. Daar staat echter tegenover dat door onze aanpak, zijnde het gebruik van enkel en alleen patiëntenmateriaal, ten minste een indruk verkregen kan worden of een methode wel of niet equimolair genoemd kan worden. Immers, eventuele matrixproblematiek is niet aan de orde. De gegevens vermeld in figuur 1 laten zien dat er een uitstekende correlatie bestaat tussen de drie onderzochte methoden. Er is alleen sprake van een juistheidverschil van 6-7% tussen de Roche-methode en

de beide andere. Daarnaast zijn de resultaten voor totaal PSA, statistisch gezien, uitwisselbaar voor de Beckman- en Wallac-methode, zoals blijkt uit de gegevens vermeld in tabel 2. Deze laatste bevinding bevestigt eerdere bevindingen vanuit ons laboratorium. Omrekening van de resultaten verkregen met de Wallac-methode behorend bij een vergelijkende studie naar de verschillen bij 5 methoden voor de bepaling van PSA, geeft voor de vergelijking Beckman-Wallac exact dezelfde regressievergelijkingen als weergegeven in tabel 2 (13). De omrekening waarvan hier sprake is, is een gevolg van de in 2003 doorgevoerde herkalibratie van de Wallac-methode op basis van de WHO-kalibratoren voor vrij en totaal PSA. Bestudering van tabel 2, waarin ook vermeld is de vergelijking tussen twee groepen met lagere en hogere concentraties vrij PSA, geeft aan dat de onderlinge verschillen tussen de drie methoden gering zijn.

Tabel 2. Statistische informatie (Passing-Bablok) voor vrij en totaal PSA

Totaal PSA 0,0 - 15,0 $\mu\text{g/l}$ (n = 199)

(E170) = 0,94 [0,93 - 0,95] x (Access)

(Prostatus) = 1,00 [0,98 - 1,01] x (Access)

Totaal PSA 0,0 - 5,0 $\mu\text{g/l}$ (n = 126)

(E170) = 0,92 [0,91 - 0,94] x (Access)

(Prostatus) = 1,01 [0,98 - 1,03] x (Access)

Totaal PSA ratio $\leq 0,20$ (n = 100)

(E170) = 0,94 [0,93 - 0,95] x (Access)

(Prostatus) = 0,99 [0,96 - 1,02] x (Access) + 0,1

Totaal PSA ratio $\geq 0,21$ (n = 99)

(E170) = 0,93 [0,92 - 0,95] x (Access)

(Prostatus) = 1,01 [0,98 - 1,03] x (Access)

Vrij PSA totale bestand (n = 199)

(E170) = 0,96 [0,94 - 0,98] x (Access)

(Prostatus) = 1,11 [1,08 - 1,14] x (Access)

Ratio PSA totale bestand (n = 199)

(E170) = 0,97 [0,95 - 1,00] x (Access)

(Prostatus) = 0,94 [0,89 - 0,99] x (Access)

De regressielijnen behorend bij de vergelijking Beckman-Roche zijn identiek te noemen voor de beide groepen terwijl die bij Beckman-Wallac hooguit enkele procenten verschillen. Hieruit kan de conclusie getrokken worden dat verschillen in equimolariteit, zo al aanwezig, nauwelijks aan de orde zijn. Tevens kan met enige voorzichtigheid geconcludeerd worden dat de eventuele verschillen in binding tussen de gebruikte antilichamen en de beschikbare epitopen op de PSA-moleculen (vrij en gebonden), beperkt zijn. Dit is in onze ogen een bevestiging van de waarde van de ISOBM-studie naar de kwaliteit van de vele PSA-antilichamen die er in de jaren '90 geproduceerd zijn.

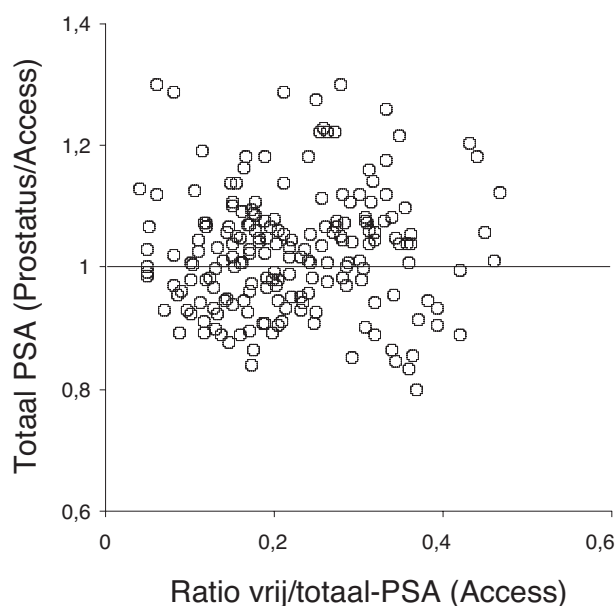
Voor de binding tussen de verschillende antilichamen en de tot de fractie vrij PSA behorende eiwitten geldt een vergelijkbare redenering als hiervoor vermeld. De vergelijking tussen de afzonderlijke bepalingen van vrij PSA, zoals weergegeven in figuur 2, toont twee opvallende aspecten: 1) de uitstekende onderlinge correlatie van de drie leveranciers en 2) het verschil van ca. 16% tussen de waarden van Roche en Wallac hetgeen beduidend meer is dan het verschil bij de vergelijking van totaal PSA. Of dit verschil verklaard kan worden uit een mogelijk verschil in binding danwel verschil in methodeontwerp of anderszins (kalibratie), is niet uit onze resultaten te halen.

Mutatis mutandis zou een vergelijking tussen de fracties gebonden PSA passen in de voorgaande redenering. Echter, hier geldt het bezwaar dat bij de door ons gebruikte methoden een bepaling van gebonden PSA alleen mogelijk is als verschilmeting tussen de metingen van totaal en vrij PSA, hetgeen een eenduidige interpretatie van de resultaten bemoeilijkt. Praktischer is het om de metingen van vrij en totaal PSA te combineren om daarmee een verhouding uit te rekenen, mede omdat het begrip 'ratio vrij/totaal-PSA' een plaats in de diagnostiek verworven heeft. Opvallend is de grotere spreiding bij de Beckman-Wallac-vergelijking ten opzichte van die van Beckman-Roche, zoals weergegeven in figuur 3. Hetzelfde geldt voor de vergelijking Roche-Wallac (niet weergegeven). Dit is te meer opvallend omdat de Wallac-methode de enige methode is waarbij vrij en totaal PSA in één analysegang gemeten worden. Een verklaring op basis van analytische variatie ligt niet voor de hand (variatiecoëfficiënten 3-5%). Duidelijk is echter dat de interpretatie van een waarde voor de ratio vrij/totaal-PSA met voorzichtigheid dient te geschieden, een waarschuwing die gestaafd wordt door diverse andere literatuurgegevens (14, 15).

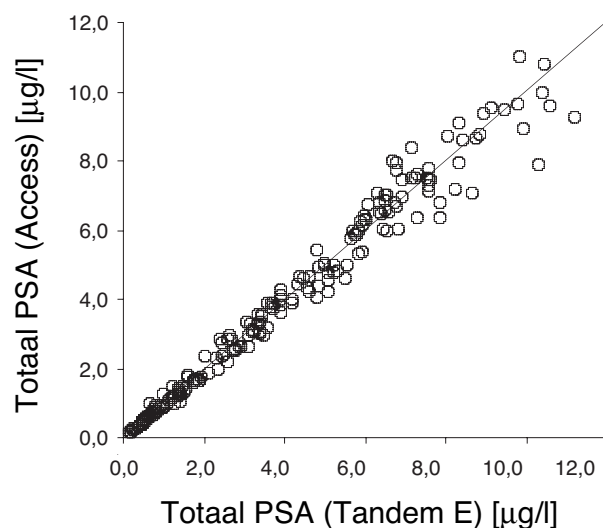
Dat voorzichtigheid geboden is bij de interpretatie van de ratio vrij/totaal-PSA blijkt ook uit figuur 4, waarin het quotiënt totaal PSA (Wallac)/totaal PSA (Beckman) is uitgezet tegen de ratio vrij/totaal (Beckman). Duidelijk is dat er een grote variatie bestaat. Weliswaar is deze iets kleiner wanneer de lage totaal-PSA-waarden (tot totaal PSA 2,0 µg/l) niet meegerekend worden (niet weergegeven) maar dan nog is de variatie aanzienlijk. Immers, in het ideale geval dient de regressielijn in figuur 4 evenwijdig aan de x-as te lopen met een snijpunt door $y = 1,0$. Deze resultaten lijken in tegenspraak met het in een eerdere alinea ge-

stelde, maar geven aan dat wellicht in incidentele gevallen epitooherkenning verschillend kan uitpakken bij de verschillende antilichamen. In ieder geval maakt het ook duidelijk dat het begrip 'ratio vrij/totaal-PSA' kritisch benaderd dient te worden en dat in geen geval de bepalingen van totaal PSA en van de ratio-PSA op twee verschillende systemen uitgevoerd mogen worden.

Figuur 5 laat zien dat de mogelijke verschillen in reactiekinetiek bij vrij en gebonden PSA voor de beide Beckman-methoden voor totaal PSA, de Beckman (Hybritech) Tandem-E en de Beckman (Access), methoden die gebruik maken van dezelfde antilichamen, gering lijken. De achterliggende gedachte bij deze vergelijking is dat het relatief kleinere vrij PSA door de kortere incubatietijd bij de Access-methode (= 18 minuten) in hogere proportie gebonden zou kunnen



Figuur 4. Grafische weergave van de vergelijking ratio vrij/totaal-PSA gemeten op de Access en het quotiënt totaal PSA (Prostatus)/totaal PSA (Access).



Figuur 5. Grafische weergave van de resultaten voor totaal PSA gemeten op de Tandem-E en de Access.

worden dan het veel grotere gebonden PSA bij vergelijking met de Tandem-methode, waar de incubatietijd 2 uur bedraagt. Statistisch gezien hebben wij de resultaten van de Tandem- en de Access-methoden identiek bevonden. Wij gaan er hierbij van uit dat er een zekere variatie in concentratie vrij PSA (dat niet gemeten is in deze studie), en daarmee ook gebonden PSA, aanwezig is in ons bestand. Het een en ander wordt bevestigd door de eerder genoemde vergelijkende studie met vijf PSA-methoden. Voor de groepen PCa (prostaatanker) en NED (no evidence of disease) vonden wij toen voor de beide Beckman-methoden de volgende regressievergelijkingen:

NED (n = 96): Access = 1,02 [0,97-1,07] x (Tandem-E) + 0,0 [(-0,2)-0,2]

PCa (n = 360): Access = 1,03 [1,00-1,06] x (Tandem-E) - 0,1 [(-0,2)-0,0]

Tot slot: wij hebben al aangegeven dat ons bestand een beperkte omvang heeft. Een grootschaliger vergelijking, bij voorbeeld enkele duizenden monsters, zou misschien tot enigszins andere conclusies kunnen leiden. Daarnaast zijn de methoden van Abbott, Bayer, die wij al eens eerder evalueerden (16), en DPC, die ook vermeld zijn in tabel 1 en die volgens de gegevens van de afzonderlijke fabrikanten ook equimolair heten te zijn, niet meegenomen in onze studie. Vooralsnog durven wij echter te stellen dat de door ons onderzochte methoden ter bepaling van totaal PSA equimolair genoemd mogen worden, met hooguit een spreiding van enkele procenten. Daarmee lijkt ook de conclusie gerechtvaardigd dat de bijdrage van het al of niet equimolair zijn van een methode ter verklaring van de variatie zoals weergegeven in tabel 1, niet anders dan beperkt kan zijn al is er, zoals figuur 4 laat zien, ruimte voor incidentele verschillen waar het het monstermateriaal betreft. Wij realiseren ons in dezen dat de door ons onderzochte methoden hoogstens in geringe mate afwijkingen in equimolariteit vertoonden en dat grotere afwijkingen van invloed kunnen zijn op klinische beslissingen (17, 18, 19). Het een en ander betekent dat de in tabel 1 vermelde juistheidsverschillen alleen geminimaliseerd kunnen worden door gebruikmaking van een gefundeerd referentiesysteem met referentiepreparaten en referentiemethoden (20). Juist het laatste aspect ontbreekt helaas nog bij PSA en zal, naar verwachting nog lang op zich laten wachten (7).

Dankbetuiging

Wij zijn Beckman Coulter Nederland B.V., Roche Diagnostics Nederland BV en PerkinElmer Life Sciences Nederland B.V. zeer erkentelijk voor het ter beschikking stellen van de reagentia. Wij danken Dr. J.G. Boonstra (Erasmus MC, Rotterdam) voor het kritisch doorlezen van het manuscript.

Literatuur

- Blijenberg BG, Storm BN, Zelst BD van, Boeken Kruger AE, Schröder FH. New developments in the standardization of total prostate-specific antigen. *Clin Biochem* 1999; 32: 627-634.
- Zelst BD van, Blijenberg BG. PSA-vergelijkbaarheid: standaardisatie of harmonisatie? *Ned Tijdschr Klin Chem* 2003; 28: 26-32.
- Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Gaines Das R. Reference reagents for prostate-specific antigen (PSA): establishment of the first international standards for free PSA and PSA (90:10). *Clin Chem* 2000; 47: 1310-1317.
- Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Ranniko S, Tuukkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha-1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostate cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 222-226.
- Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, Lövgren T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha-1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991; 37: 1618-1625.
- ISOBM TD-3 International workshop on monoclonal antibodies against prostate-specific antigen. *Tumour Biol* 1999; 20 (Suppl 1): 1-94.
- Stenman UH. Immunoassay standardization: is it possible, who is responsible, who is capable? *Clin Chem* 2001; 47: 815-820.
- Yurdakul G, Bangma CH, Blijenberg BG, Zelst BD van, Wildhagen MF, Kwast TH van der, Schröder FH. Different PSA assays lead to detection of prostate cancers with identical histological features. *Europ Urol* 2002; 42: 154-158.
- Schröder FH, Denis LJ, Roobol M. The story of the European Study of Screening for Prostate Cancer. *BJU International* 2003; 92 (Suppl 2): 1-13.
- Graves HC. Standardization of immunoassays for prostate-specific antigen. A problem of prostate-specific antigen complexation or a problem of assay design? *Cancer* 1993; 72: 3141-3144.
- Lilja H. Biology of prostate-specific antigen. *Urology* 2003; 62 (Suppl 5A): 27-33.
- Mikolajczyk S, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clin Biochem* 2004; 37: 519-528.
- Blijenberg BG, Yurdakul G, Zelst BD van, Bangma CH, Wildhagen MF, Schröder FH. Discordant performance of assays for free and total prostate-specific antigen in relation to the early detection of prostate cancer. *BJU International* 2001; 88: 545-550.
- Junker R, Brandt B, Zechel C, Assman G. Comparison of prostate-specific antigen (PSA) measured by four combinations of free PSA and total PSA assays. *Clin Chem* 1997; 43: 1588-1594.
- Patel D, White PAE, Ward M. A comparison of six commercial assays for total and free prostate-specific antigen (PSA): the predictive value of the ratio of free to total PSA. *BJU International* 2000; 85: 686-689.
- Zelst BD van, Blijenberg BG, Schröder FH. De bepaling van totaal PSA m.b.v. de ACS:180 in perspectief. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2001; 26: 3-8.
- Roddam AW, Price CP, Allen NE., Ward AM. Assessing the clinical impact of prostate-specific antigen assay variability and nonequimolarity: a simulation study based on the population of the United Kingdom. *Clin Chem* 2004; 50: 1012-1016.
- 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 antigen 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.
- Ward AM, Catto JWF, Hamdy FC. Prostate-specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 633-651.
- Thienpont LM, Uytendaele K van, Leenheer AP de. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 73-87.

Summary

On the equimolarity of prostate-specific antigen. Blijenberg BG, Zelst BD van, Schröder FH. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 42-48.

Introduction: Though recent research from the last decade has led to a harmonization of results for free and total PSA, we still have to accept variation between assays regarding recovery. Surveys held in 2002 and 2003 in The Netherlands show differences up till 20-25% for total PSA and even more for free PSA based on recovery values, differences that may influence clinical decision making. In this study we have tried to answer the question whether or not deviations from equimolarity play a role as contribution to the differences in PSA values. To that end we have compared three state-of-the-art assays for PSA with samples coming from an ongoing screening study for prostate cancer (ERSPC).

Results: In total 199 serum samples were analyzed for free and total PSA (range total PSA: 0 – 15µg/l) by applying Beckman (Access), PerkinElmer-Wallac (Prostatus) and Roche (E170). Excellent correlations were found between all assays for total PSA and minor correlations for free PSA. Access and E170 proved to differ by 6-7% for total PSA (Access being the

highest) while Access and Prostatus were identical, statistically speaking. For free PSA the differences were 4% for the comparison Access and E170 (Access being the highest) and 11% for Access and Prostatus (Access being the lowest). A division of the whole collection into two groups with a lower and a higher concentration free PSA (ratio free/total PSA 0,20) didn't show any difference in regression line for total PSA with Access and E170 while Access and Prostatus differed by 3-4%. Furthermore, a considerable spread was found in all free PSA comparisons.

Conclusions: 1. All assays proved to measure total PSA more or less equimolarly. We only found very small differences in the Access-Prostatus comparison with two sample groups based on a low and high free PSA concentration. These results show that limited differences in equimolarity cannot explain the differences in recovery of total PSA as seen in surveys. 2. We found differences in recovery for free PSA (though limited) and spread in the results. This means in our view that care must be taken in using free/total PSA values in clinical decision making. Measuring free and total PSA with assays from two different manufacturers should be avoided.

Key words: prostate-specific antigen; PSA; equimolarity PSA