

Prostata-spezifisches Antigen (PSA): Einfluß des freien und gebundenen Anteils auf die klinische Aussagekraft als Tumormarker

Prostate specific antigen: Influence of its free and complexed form on the clinical validity as tumour marker

K. Jung¹, M. Lein¹, D. Schnorr¹, W. Henke¹, Brigitte Brux², S. Loening¹

Zusammenfassung

Mit den kommerziellen Testkombinationen Tandem-E*, AxSYM* und LIA-mat* wurden Bestimmungen des prostata-spezifischen Antigens (PSA) in einem Modellversuch mit Kontrollproben mit definierten Anteilen von freiem und an α_1 -Antichymotrypsin gebundenem PSA sowie in Seren von gesunden Probanden, Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und Patienten mit Prostatakarzinom vorgenommen.

Die PSA-Messungen in den Kontrollproben ergaben mit dem AxSYM-Test, nicht jedoch mit den beiden anderen Verfahren eine Abhängigkeit der Höhe der gemessenen PSA-Konzentration vom Anteil des freien PSA in der Probe. In der Kontrollprobe mit einem ausschließlich freien PSA-Anteil wurde mit diesem Test eine doppelt so hohe PSA-Konzentration gemessen wie in der Probe mit einem vollständig an α_1 -Antichymotrypsin gebundenen PSA.

Der Methodenvergleich mit Seren der Patientengruppen zeigte vergleichbare Resultate zwischen dem Tandem-E-Test und dem AxSYM-Test, während die mit dem LIA-mat-Test ermittelten Werte signifikant um ca. 30 % niedriger waren. Die im Modellversuch

aufgezeigten Abhängigkeiten der PSA-Messung vom Anteil des freien PSA bei der Bestimmung der Seren mit dem AxSYM-Test bestanden nicht. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Testen waren nicht auf einen bei Prostatakarzinompatienten beschriebenen höheren Anteil an gebundenem PSA zurückzuführen. Eine ROC(receiver-operation characteristic)-Analyse bewies außerdem, daß die klinische Validität der PSA-Bestimmungen mit den drei Testkombinationen hinsichtlich der Diskrimination zwischen Prostatakarzinompatienten und Gesunden bzw. Patienten mit benigner Prostatahyperplasie nicht differiert, wenn testspezifische PSA-Entscheidungsgrenzen benutzt werden. PSA-Bestimmungsverfahren auf der Basis des α_1 -Antichymotrypsin-PSA-Komplexes werden als Lösungsvariante analytischer Probleme der PSA-Bestimmung diskutiert.

Schlüsselwörter

Prostata-spezifisches Antigen – freies PSA – α_1 -Antichymotrypsin – PSA-Komplex – Prostatakarzinom – benigne Prostatahyperplasie – Screening

Summary

Test combinations Tandem-E*, AxSYM* and LIA-mat* were used to determine prostate specific antigen (PSA) in samples containing known concentrations of free and complexed PSA and in sera of patients with prostate carcinoma, benign prostate hyperplasia and in healthy controls. The PSA-determination by the AxSYM test was influenced by the composition of the PSA in the sample; the LIA-mat test and the Tandem-E test gave equimolar determinations. When PSA was measured in the serum samples of the three groups, the AxSYM test and Tandem-test gave similar PSA-values in contrast to

Anschrift der Autoren:

¹Klinik für Urologie und

²Institut für Pathologische und Klinische Biochemie, Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Korrespondenz-Adresse:

Doz. Dr. K. Jung

Forschungsabteilung der Klinik für Urologie
Universitätsklinikum Charité, Medizinische
Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
Schumannstr. 20/21, D-10098 Berlin

the LIA-mat test which yielded significantly lower values. These differences could not be explained by an altered PSA-composition. Receiver-operation characteristic analysis confirmed that the clinical validity of all three PSA-tests investigated did not differ. However, the use of test kit-related reference limits is necessary. The determination of the complex of α_1 -antichymotrypsin-PSA for measuring of total PSA seems to be suitable to avoid the numerous analytical difficulties.

Key words

Prostate-specific antigen – PSA-forms – prostate cancer – benign prostate hyperplasia – screening

Einleitung

Das PSA gilt in der Diagnostik des Prostatakarzinoms als unverzichtbare Kenngröße [1]. Zusammen mit der digitalen rektalen Palpation und der transrektalen Sonographie bildet die Bestimmung des PSA die Grundlage für die Früherkennung dieses zweithäufigsten Karzinoms beim Mann [2]. Zahlreiche Studien zu dieser Problematik lassen daran keinen Zweifel [3].

PSA kommt im Serum in freier und gebundener Form vor. Die Bindung erfolgt vor allem an α_1 -Antichymotrypsin, im geringeren Ausmaß auch an α_2 -Makroglobulin und Antitrypsin [4]. Dadurch wird die katalytische Aktivität des PSA als Serinprotease blockiert. Das freie PSA mit einem Molekulargewicht von 33 kDa bildet mit dem α_1 -Antichymotrypsin einen Komplex von ca. 90 kDa. Drei Arbeitsgruppen berichteten unabhängig voneinander, daß Patienten mit einem Prostatakarzinom einen höheren Prozentsatz von komplex gebundenem PSA aufweisen als Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [5–8]. Diese Befunde sind sowohl aus klinischer als auch aus analytischer Sicht von erheblicher Bedeutung.

Für die Analytik in der täglichen Praxis ist wesentlich, daß die für die PSA-Bestimmung routinemäßig eingesetzten kommerziellen Testkombinationen das freie und gebundene PSA offensichtlich unterschiedlich erfassen [9]. Das freie PSA wird unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen der einzelnen kommerziellen Tests, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten der Antikörper für die verschiedenen PSA-Fractionen, im Vergleich zum gebundenen PSA bevorzugt erfaßt [9]. Dadurch wird eine äquimolare Bestimmung des freien und gebundenen PSA-Anteils fraglich. Systematische Fehler bei der PSA-Bestimmung können die Folge sein und sind mögliche Ursachen für die unzureichende Vergleichbarkeit der PSA-Werte, die mit verschiedenen Test-

kombinationen erhalten werden. Diese Fehler könnten sich außerdem bei der Differenzierung zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom als nachteilig erweisen. Bisher liegen jedoch keine überzeugenden Untersuchungen vor, die den Einfluß der Variablen „freies und gebundenes PSA“ auf die diagnostische Aussagekraft der PSA-Bestimmung mit den z. Zt. üblichen Bestimmungsverfahren für das Gesamt-PSA erkennen lassen.

Wir haben deshalb in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der häufig verwendeten kommerziellen PSA-Teste Tandem-E (Fa. Hybritech), AxSYM-PSA (Fa. Abbott) und LIA-mat-PSA (Fa. Byk-Sangtec) entsprechende Untersuchungen durchgeführt. Dabei interessierten zwei wesentliche Fragen:

1. wird durch den jeweiligen Test eine äquimolare Bestimmung der freien und gebundenen PSA-Anteile garantiert,
2. wird die klinische Aussagekraft der PSA -Bestimmung bei eventuell unterschiedlicher Erfassung der freien und gebundenen PSA-Anteile durch den jeweiligen Test beeinflußt?

Um diese beiden miteinander verknüpften Fragestellungen zu beantworten, wurden PSA-Bestimmungen sowohl in einem Modellversuch mit Proben von bekannter PSA-Zusammensetzung (freies und gebundenes PSA) als auch in Serien von Probanden definierter Gruppen (gesunde Männer; Patienten mit Prostatakarzinom bzw. benigner Prostatahyperplasie) vorgenommen und miteinander verglichen.

Material und Methoden

Patienten und Probenmaterial

Untersucht wurden insgesamt 92 Probanden, davon waren 27 gesunde Kontrollpersonen (Alter: 57 ± 11 Jahre) ohne Prostataerkrankungen. 31 Patienten (Alter: 66 ± 8 Jahre) wiesen ein virginales Prostatakarzinom der Stadien B, C, D auf, 32 Patienten (Alter: 69 ± 9 Jahre) hatten eine benigne Prostatahyperplasie, die entweder histologisch ($n = 27$) oder klinisch ($n = 5$) gesichert war. Die von den Probanden gewonnenen Blutproben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme zentrifugiert und das Serum bis zur Analytik bei -70°C aufbewahrt.

Im Modellversuch wurden speziell bereitete Proben (Fa. Hybritech) mit bekannter PSA-Zusammensetzung (Probe 1: 100 % freies PSA; Probe 2: 100 % an α_1 -Antichymotrypsin gebundenes PSA; Probe 3: Mischung zu gleichen Teilen von Probe 1 und 2) verwendet. Die PSA-Materialien wurden durch Immunitätschromatographie gewonnen; Reinheitskontrollen erfolgten über Elektrophorese, Säulenchromatographie und Aminosäureanalyse. Die Pro-

ben (20 µl pro Gefäß) wurden bei -20 °C gelagert und bei Verwendung mit 1 ml Diluenslösung (Human-serumalbuminlösung) des LIA-mat-Testes rekonstituiert. Weitere Konzentrationsabstufungen der PSA-Fractionen wurden durch Mischungen der o. g. drei Proben hergestellt.

Durchführung der PSA-Bestimmungen

Verwendet wurden die Testkombinationen Tandem-E PSA (Hybritech GmbH, Köln), LIA-mat PSA (Byk-Sangtec GmbH, Dietzenbach) und Axsym-PSA (Abbott GmbH, Wiesbaden). Die Bestimmungen einschließlich der Kalibrierungen mit den jeweiligen test-spezifischen Materialien erfolgten exakt nach den Angaben der Hersteller.

Der Tandem-E-Test ist ein immunenzymometrischer Test im Sandwichverfahren, der monoklonale Antikörper der Maus gegen zwei verschiedene antigene Determinanten des PSA-Moleküls verwendet. Als Festphase dienen mit Anti-PSA beschichtete Plastik-kugeln. Nach Bildung des Immunkomplexes aus festphasenständigen Antikörpern, PSA und aus mit alkalischer Phosphatase enzymmarkierten Antikörpern wird die Kugel entfernt, gewaschen und mit Substrat (4-Nitrophenylphosphat) versetzt. Die Messungen nach beendeter Inkubation wurden am Immunoassay Analyzer Photon II (Hybritech GmbH, Köln) mit eingespeichertem Auswertprogramm durchgeführt. Die Nachweisgrenze wird mit 0,5 µg/l, der Meßbereich bis 100 µg/l angegeben.

Der Axsym-Test ist ein Mikropartikel-Enzym-immunoassay. Das in der Probe enthaltene PSA bindet sich an Mikropartikel, die mit monoklonalen Antikörpern (Maus) gegen PSA beschichtet sind. Der entstandene Immunkomplex wird an eine Glasfibrermatrix gebunden, gewaschen und mit einem Konjugat aus Anti-PSA (Ziege) und alkalischer Phosphatase versetzt. Nach Entfernung des nicht gebundenen Konjugates durch Waschen wird mit dem fluorogenen Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat inkubiert. Die Messungen wurden am Immunoassay-Analyzer Axsym (Abbott GmbH) vorgenommen. Die Nachweisgrenze wird mit 0,1 µg/l, der Meßbereich bis 100 µg/l angegeben.

Der LIA-mat-Test ist ein immunluminometrischer Test nach dem Sandwichverfahren. Als Festphase dienen beschichtete Röhrchen (coated tubes). Für die Beschichtung und für die Markierung des Tracers werden zwei hochspezifische monoklonale Antikörper (Maus) eingesetzt. Es bildet sich an der Röhrchenwand ein Immunkomplex aus festphaseständigem Anti-PSA, PSA der Probe und dem anti-PSA-Tracer-Konjugat. Als Tracer dient Isoluminol, das luminometrisch erfaßt wird. Die Messungen erfolgten am AutoCliniLumat LB 952 T (Berthold, Wildbad). Die

Nachweisgrenze des Testes wird mit 0,06 µg/l, der Meßbereich bis 120 µg/l angegeben.

Die Bestimmungen wurden mit allen drei Verfahren am gleichen Tag in Serie durchgeführt. Alle Werte lagen im Meßbereich der jeweiligen Methode, so daß Verdünnungen nicht erforderlich waren. Die Qualitätskontrolle der Bestimmungen wurde mit einem Serum-pool bzw. mit Kontrollmaterialien durchgeführt, die Bestandteil der Testkombinationen sind. Die ermittelten PSA-Konzentrationen in den Kontrollmaterialien lagen in den vorgegebenen Vertrauensintervallen. Die zeitabhängige Präzision (Tag-zu-Tag-Variation), die über einen längeren Zeitraum für die drei Verfahren kontrolliert wurde, lag für alle Bestimmungen für ein selbst vorbereitetes Kontrollmaterial (4,5 µg/l; Tandem-E) unterhalb von 5 %.

Statistische Berechnungen

Die Methodenvergleiche wurden mit einem parameterfreien Regressionsverfahren durchgeführt [10]. Signifikanzberechnungen erfolgten mit dem U-Test (Statistikpaket Statgraphics, Version 5.01; Statistics Graphic Corp. Rockville, USA). Die ROC-(receiver-operation-characteristic)-Kurven wurden mit bekannten Standardverfahren ausgewertet [11, 12].

Ergebnisse

Der Einfluß der verschiedenen PSA-Formen, d.h. des freien und komplex an α_1 -Antichymotrypsin gebundenen PSA, auf die PSA-Gesamtbestimmung wurde zuerst in einem Modellversuch ermittelt (Abb. 1). Die Untersuchungen erfolgten mit speziell für diese Fragestellung vorbereiteten PSA-Materialien, in denen das Verhältnis der freien zu gebundenen PSA-Anteile variiert, die PSA-Gesamtkonzentrationen aber konstant (ca. 4 µg/l; siehe Methodik) gehalten wurden. In den verschiedenen Proben wurden mit den Testkombinationen Tandem-E, Axsym und LIA-mat die PSA-Konzentrationen ermittelt und die gemessenen Werte in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil des freien PSA in der Probe als Diagramm dargestellt (Abb. 1). Die mit dem Axsym-Test erhaltenen PSA-Werte waren in deutlicher Abhängigkeit vom Anteil des freien PSA in der Probe. In der Probe mit einem ausschließlich freien PSA-Anteil wurde mit dieser Methode eine etwa doppelt so hohe PSA-Konzentration gemessen wie in der Probe mit einem vollständig an α_1 -Antichymotrypsin gebundenem PSA. Dagegen waren die mit dem Tandem-E-Test und dem LIA-mat-Test bestimmten PSA-Konzentrationen unabhängig vom Verhältnis freies/gebundenes PSA in der Probe. Der LIA-mat-Test ergab jedoch höhere Werte als der Tandem-E-Test (Abb. 1).

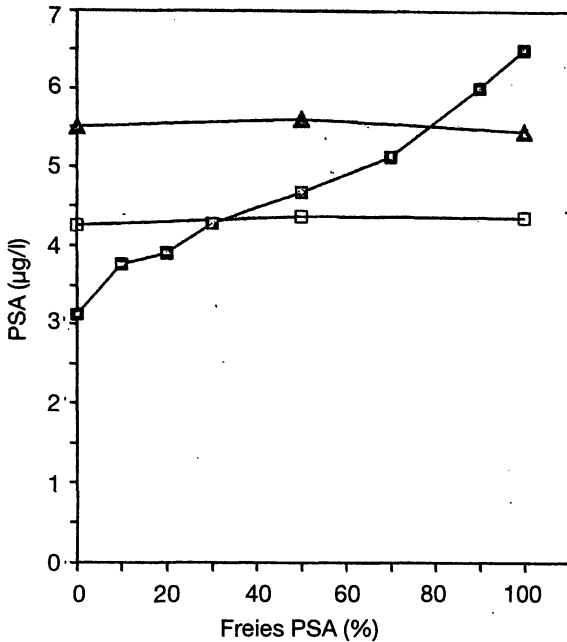


Abb. 1. Einfluß der PSA-Zusammensetzung und der Bestimmungsmethode auf die gemessene PSA-Konzentration. Proben mit gleichen PSA-Konzentrationen (deklarerter PSA-Wert: 4 µg/l), aber mit variablen Anteilen von freiem bzw. gebundenem PSA wurden mit dem Tandem-E-Test (-j-), dem LIA-mat-Test (-c-) und dem AxSYM-Test (-J-) bestimmt und die ermittelten Werte aufgetragen.

In den Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse der vergleichenden PSA-Bestimmungen mit den drei verschiedenen Methoden in Seren von gesunden Probanden, Patienten mit Prostatahyperplasie und mit Prostatakarzinom aufgeführt. Der Methodenvergleich ergab, daß sich die mit dem AxSYM-Test und dem Tandem-E-Test gemessenen PSA-Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dies zeigte sich im Medianvergleich (Tabelle 1) und in der Tatsache, daß kein signifikanter Unterschied des Anstiegs b vom Wert 1 nachzuweisen war (Tabelle 2). Die Anstiege der Regressionsgeraden im Methodenvergleich Tandem-E-Test und AxSYM-Test unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen den drei Gruppen. Mit dem LIA-mat-Test wurden hingegen im Vergleich zum Tandem-E-Test und AxSYM-Test für alle drei Gruppen signifikant niedrigere Werte erhalten. Dies ist wiederum an den Medianwerten (Tabelle 1) und den Anstiegen der Regressionsgeraden (Tabelle 2) ersichtlich.

In Abbildung 2 sind die ROC-Kurven der drei Tests für Patienten mit Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie dargestellt. Der Verlauf

Tabelle 1. Vergleich der PSA-Bestimmungen mit dem Tandem-E-, AxSYM- und LIA-mat-Test im Serum von Gesunden und Patienten mit Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie. Angabe der Werte als Mediane einschließlich unterer und oberer Quartile. Signifikante Differenzen (U-test) innerhalb der Gruppen und zwischen den Tests bei mindestens $p < 0,05$: a, Unterschied zum Tandem-Test; b, Unterschied zum AxSYM-Test.

Probanden	Tandem-E	AxSYM Median (untere und obere Quartile) µg/l	LIA-mat
Gesunde (n=27)	1,20 (0,8 – 2,14)	1,45 (0,77 – 2,60)	0,72 ^{a,b} (0,36 – 1,85)
Prostatakarzinom (n=31)	9,15 (5,53 – 16,3)	8,72 (5,87 – 13,9)	4,97 ^{a,b} (2,92 – 9,78)
Prostatahyperplasie (n=32)	4,17 (2,27 – 8,71)	4,59 (1,81 – 7,70)	2,10 ^{a,b} (0,84 – 4,10)

der Kurven und die Flächen unter den Kurven lassen keine Unterschiede erkennen. Damit ist belegt [12], daß sich die drei Tests in ihrer Diskriminationsfähigkeit hinsichtlich dieser beiden Patientengruppen nicht unterscheiden. Auch für die Unterscheidung der gesunden Probanden von Karzinompatienten (nicht dargestellt) ist diese Feststellung zutreffend.

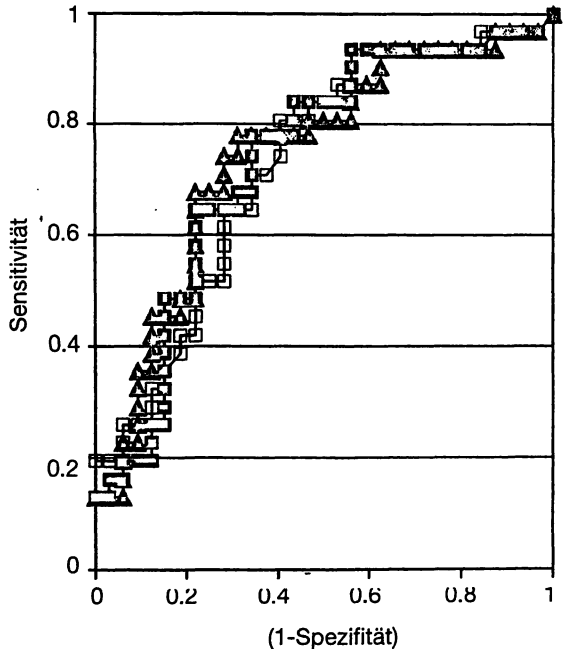


Abb. 2. Receiver-operation-characteristics (ROC)-Kurven der verschiedenen PSA-Methoden bei Patienten mit Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie. Symbole: -j- Tandem-E-Test; -c- LIA-mat-Test; -J- AxSYM-Test. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Tabelle 2. Methodenvergleich der PSA-Bestimmungen mit dem Tandem-, AxSYM- und LIA-mat-Test im Serum von Gesunden und Patienten mit Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie. Die Berechnungen der Regressionsgeraden ($y = a + bx$) und Korrelationskoeffizienten (r) wurden nach einem Standardverfahren für Methodenvergleiche berechnet [10]. In Parenthesen sind die 95% Konfidenzintervalle der Kenngrößen der Regressionsgeraden (a = Achsenabschnitt; b = Anstieg) angegeben. Signifikanzen: *, signifikanter Unterschied (mindestens $p < 0,05$) des Achsenabschnittes von 0 bzw. des Anstieges von 1 innerhalb eines Methodenvergleichs; signifikante Unterschiede der Kenngrößen zwischen den drei Probandengruppen innerhalb eines Methodenvergleichs (a, signifikant different zu den Gesunden; b, signifikant different zu den Karzinompatienten; c, signifikant different zu den Patienten mit benigner Prostatahyperplasie).

Methodenvergleich	Gesunde (n = 27)	Prostatakarzinom (n = 31)	benigne Prostatahyperplasie (n = 32)
AxSYM(y) vs. Tandem (x)			
a	0,02 (-0,09 bis 0,19)	-0,30 (-0,70 bis 0,26)	-0,11 (-0,50 bis 0,03)
b	0,99 (0,90 bis 1,08)	0,99 (0,93 bis 1,07)	0,92 (0,87 bis 1,02)
r	0,98	0,99	0,96
LIA-mat(y) vs. AxSYM (x)			
a	-0,21* (-0,44 bis -0,10)	-0,80* (-1,88 bis -0,38)	-0,27* (-0,47 bis -0,02)
b	0,65* (0,53 bis 0,81)	0,74* ^c (0,67 bis 0,86)	0,59* ^b (0,49 bis 0,66)
r	0,86	0,97	0,96
LIA-mat(y) vs. Tandem (x)			
a	-0,31* (-0,46 bis -0,08)	-1,31* ^{a,c} (-2,12 bis -0,64)	-0,31* ^b (-0,59 bis -0,08)
b	0,74* (0,60 bis 0,89)	0,79* ^c (0,69 bis 0,85)	0,54* ^b (0,47 bis 0,62)
r	0,87	0,98	0,94

Für die drei Tests gelten entsprechend den Ergebnissen des Methodenvergleichs keine einheitlichen Diskriminationsgrenzen. Anhand der ROC-Analysen ergaben sich in unserer Studie z. B. bei einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 80 % hinsichtlich der Trennung zwischen Gesunden und Prostatakarzinompatienten folgende PSA-Konzentrationen: 3,7 µg/l für den Tandem-E-Test, 3,3 µg/l für den AxSYM-Test und 1,6 µg/l für den LIA-mat-Test.

Diskussion

Die klinische Aussagekraft der PSA-Bestimmung für die Diagnostik des Prostatakarzinoms ist durch eine Reihe von Faktoren limitiert (Tabelle 3). Für die Laboratoriumsmedizin stellen die durch die analytischen Faktoren bedingten Mängel der PSA-Teste eine besondere Herausforderung dar. Die unterschiedliche Erfassung des freien und gebundenen PSA mit den z. Zt. verfügbaren kommerziellen Testen der Gesamt-PSA-Bestimmung ist eine dieser Faktoren [13].

Patienten mit einem Prostatakarzinom weisen im Serum, wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, einen höheren Anteil von komplex gebundenem

PSA auf als Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [5–7, 14]. Die Angaben über das an α_1 -Antichymotrypsin gebundene PSA schwanken je nach Autoren zwischen 50 bis über 90 % bei Karzinompatienten und 40 bis 85 % bei Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [5–8]. Die unterschiedlichen Angaben erklären sich aufgrund der verschiedenen Bestimmungsmethoden. Das differente Vorkommen der PSA-Formen beim Prostatakarzinom und der benignen Prostatahyperplasie wird als Möglichkeit angesehen, zwischen beiden Patientengruppen besser zu diskriminieren [14, 15]. Da bei beiden Patientengruppen PSA-Erhöhungen typisch sind, ist für klinische Belange die Differentialdiagnostik mit einfachen, nichtinvasiven Methoden von aktuellem Interesse [16]. Leider stehen z. Zt. für die Differenzierung des freien und gebundenen Anteils des PSA keine kommerziellen Tests zur Verfügung. Prospektive Studien zur Klärung dieser Problematik sind dringend erforderlich [16].

Die neuen Erkenntnisse über das Vorliegen verschiedener PSA-Fractionen im Serum bedingen grundlegende analytische Schwierigkeiten der PSA-Bestimmung unter Nutzung unterschiedlicher kommerzieller Testkombinationen (Tabelle 3). Dies belegt der in Abbildung 1 wiedergegebene Modellversuch, der für den AxSYM-Test eine deutliche Abhängigkeit der ermittel-

Tabelle 3. Faktoren, die die Aussagekraft des PSA als Marker des Prostatakarzinoms einschränken

Faktoren	Mögliche Abhilfen und Verbesserungen
Biologische Faktoren hohe Organspezifität, aber unspezifisch für Karzinom	- altersabhängige Referenzgrenzen - PSA/Prostatavolumen (PSA density) - PSA-Anstieg/Zeit (PSA velocity) - α_1-Antichymotrypsin/PSA-Komplex - multivariate Analyse
Analytische Faktoren mangelnde Vergleichbarkeit der PSA-Werte zwischen verschiedenen Methoden bedingt durch:	
1. Fehlen einheitlicher Kalibratoren/Standards	- Herstellung eines international verbindlichen Standards - Bezug auf α_1-Antichymotrypsin/PSA-Komplex
2. Unterschiedliche Antikörperspezifität und-affinität gegenüber freiem PSA und PSA-Komplexen	- Antikörper gegen α_1-Antichymotrypsin/PSA-Komplex
3. Unterschiedliche Epitoperkennung durch polyklonale und monoklonale Antikörper	- monoklonale Antikörper für definierte Epitope des α_1-Antichymotrypsin/PSA-Komplexes
4. Testbedingungen	
- Art der Festphase	- große Oberfläche, z. B. Mikrobeads
- Platte/Beads	
- Inkubationszeit	- Gleichgewichtstest
- Gleichgewicht/Kinetik	
- Sandwich/Kompetition	- Sandwichtest
5. Matrixeffekte	
- Albumineffekt	- definierte Verdünnungsbedingungen für Proben und Kalibratoren
6. Unzureichende analytische Empfindlichkeit im unteren Meßbereich	- ultrasensitive Tests, z. B. mit Chemolumineszenz, Fluoreszenz

ten PSA- Konzentration vom Verhältnis freies/gebundenes PSA in der Probe nachwies. Dies war bei den beiden anderen Methoden nicht der Fall. Der Axsym-Test verwendet im Gegensatz zu den beiden anderen Testen als zweiten Antikörper einen polyklonalen Antikörper gegen PSA. Von anderen Methodenvergleichen ist bekannt, daß PSA-Tests auf der Basis polyklonaler Antikörper die verschiedenen PSA-Formen unterschiedlich erfassen [17]. Es wird angenommen, daß polyklonale Antikörper multiple Epitope des PSA erkennen [18]. Man kann von mindestens 3 verschiedenen Antigen-Determinanten im PSA-Molekül ausgehen, da durch monoklonale Antikörper freies PSA, an α_1 -Antichymotrypsin gebundenes PSA und auch Gesamt-PSA differenziert werden konnte [5]. Die unterschiedliche Spezifität der in den verschiedenen Testkombinationen benutzten Antikörper könnte somit systematische Unterbestimmungen des komplex gebundenen PSA bedingen und damit zu differenten Werten zwischen den Testen führen [19].

Im Gegensatz zum Axsym-Test erfassen der Tandem-E-Test und der LIA-mat-Test das PSA unabhängig von der vorliegenden Form; sie werden aufgrund dieser Eigenschaft als äquimolare Tests bezeichnet [19]. Beide Tests verwenden ausschließlich monoklonale Antikörper. Wie Abbildung 1 jedoch zeigt, werden mit dem LIA-mat-Test höhere Konzen-

trationen ermittelt als mit dem Tandem-E-Test. Dies ist offensichtlich ein Kalibrationsproblem. Das Resultat läßt sich nicht als Matrixeffekte [13] erklären, da alle Proben mit dem Diluensreagens (Humanserumalbuminlösung) des LIA-mat-Testes rekonstituiert wurden und mit dem Tandem-Test die deklarierten Werte erzielt wurden.

Es war daher von grundsätzlichem Interesse zu untersuchen, ob sich die an präparierten PSA-Fractionen beschriebenen Differenzen auch bei PSA-Bestimmungen in den Seren der drei Patientengruppen manifestieren. Vergleiche der PSA-Bestimmungen mit den drei Methoden wurden für die Probandengruppen separat ausgewertet, um die möglichen Unterschiede des freien und gebundenen PSA auf die PSA-Bestimmung besser zu erkennen. Da gebundenes PSA mit dem Axsym-Test unterbestimmt wird, wäre demnach im Methodenvergleich zwischen Axsym-Test und Tandem-E-Test bei Karzinompatienten, charakterisiert durch einen höheren Anteil an gebundenem PSA, ein geringerer Anstieg der Regressionsgeraden im Vergleich zu den beiden anderen Probandengruppen zu erwarten. Dies ist aber nicht der Fall. Unsere Daten stimmen mit Beobachtungen anderer Autoren [20] überein, die mit dem IMx-Test der Fa. Abbott eine äquimolare PSA-Bestimmung bis zu einem Anteil von 20 % frei-

em PSA in der Probe erzielten. Erst oberhalb dieses Bereiches kam es zur Überbestimmung des PSA. Aus der Abbildung 1 ist zu entnehmen, daß die PSA-Werte mit dem AxSYM-Test bei einem freien PSA-Anteil von ca. 30 % mit den Werten des Tandem-E-Testes übereinstimmen. Neuere Angaben zum Verhältnis der PSA-Fraktionen [21, 22] im Serum lassen vermuten, daß die Unterschiede im Verhältnis des freien zum gebundenen PSA zwischen Prostatakarzinompatienten und Patienten mit benigner Prostatahyperplasie in diesem Bereich liegen und sich damit nicht im Methodenvergleich widerspiegeln.

Der LIA-mat-Test ergab in allen drei untersuchten Probandengruppen geringere PSA-Konzentrationen als der Tandem-E-Test und AxSYM-Test. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen des Modellversuches mit den Proben von variabler PSA-Zusammensetzung (Abb. 1), die mit dem LIA-mat-Test höhere Werte als mit dem Tandem-Test aufwiesen. Sie wurden dort als kalibrationsbedingte Differenz gedeutet, wie dies auch von anderen Methodenvergleichen her bekannt ist [13]. Die in den Probandengruppen mit dem LIA-mat-Test im Vergleich zum Tandem-Test nachgewiesenen geringeren Konzentrationen im Zusammenhang mit den in den Proben des Modellversuches ermittelten höheren PSA-Werte machen einen Matrixeffekt sehr wahrscheinlich. Bisher ist der Effekt verschiedener Matrixbestandteile (z. B. Albumin) auf die PSA-Bestimmung nur unzureichend untersucht worden [13]. Bemerkenswert ist weiterhin, daß der Anstieg der Regressionsgeraden in der Gruppe der Prostatakarzinompatienten signifikant höher war als im Vergleich zu Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (0,79 vs. 0,54 beim LIA-mat/Tandem-Vergleich; 0,74 vs. 0,59 beim LIA-mat/AxSYM-Vergleich). Da der LIA-mat-Test ebenso wie der Tandem-E-Test freies und gebundenes PSA äquimolar erfaßt (Abb. 1), sind diese Unterschiede nicht auf diesen Einflußfaktor zurückzuführen. Die Befunde verdeutlichen, daß durch die Komplexität der methodischen Variablen von PSA-Immunoassays (Antikörper; Kalibration; Matrixeffekte; Testprinzip) z.T. widersprüchliche Ergebnisse die Folge sein können [13, 19]. Zur Klärung des Einflusses der Matrix und der verschiedenen Kalibratoren sind weitere Untersuchungen erforderlich, die im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch nicht vorgesehen waren.

Entscheidend für die Bewertung der klinischen Validität eines Parameters sind u. a. die Kenngrößen diagnostische Sensitivität und Spezifität. Dabei ist es sinnvoll, diese Kenngrößen nicht an ausgewählten Diskriminationspunkten (z. B. der 90er oder 95er Perzentile) zu ermitteln, sondern dafür das ROC-Verfahren (receiver-operation-characteristic) zu nutzen [11]. Die Analyse der Daten beweist, daß die Diskriminationsfähigkeit der drei PSA-Teste sich nicht

unterscheidet. Berücksichtigt werden muß dabei natürlich, daß für jeden Test separate Diskriminationsgrenzen zu wählen sind. In unserer Untersuchung ergaben sich für die Trennung zwischen Gesunden und Prostatakarzinompatienten bei einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 80 % Diskriminationsgrenzen von 3,7 µg/l für den Tandem-E-Test, 3,3 µg/l für den AxSYM-Test und 1,6 µg/l für den LIA-mat-Test. Die Zahl der Probanden ist selbstverständlich nicht ausreichend für die Festlegung von gut definierten Diskriminationsgrenzen. Die Ergebnisse verdeutlichen aber, daß aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit der PSA-Werte zwischen den verschiedenen Methoden testspezifische Diskriminationsgrenzen notwendig sind. Keinesfalls ist es richtig, von einem allgemeingültigen Wert von 4 µg/l auszugehen, wie dies auch in den Instruktionen der drei Testkits angegeben wird.

Wir schließen folgend aus unseren Untersuchungen, daß die beobachteten Unterschiede zwischen den Testen und innerhalb der untersuchten Patientengruppen Ausdruck der in der Tabelle 3 zusammengestellten analytischen Faktoren bei der PSA-Bestimmung sind. Ein unmittelbarer Einfluß des Verhältnisses freies/gebundenes PSA auf diese Unterschiede ist nicht zu erkennen, so daß sich kein Nachteil für einen der verwendeten Tests im Rahmen der Prostatakarzinomdiagnostik ergibt. Die fehlende Vergleichbarkeit der mit den verschiedenen Methoden ermittelten Werte (z. B. Tandem-E-Test mit LIA-mat-Test) ist dagegen wesentlich. Sie erfordert die Festlegung von testspezifischen Entscheidungsgrenzen. Ähnliche Schlußfolgerungen bei der Überprüfung verschiedener kommerzieller Test wurden auch kürzlich von anderen Autoren gezogen [23]. Es ist anzunehmen, daß ein PSA-Test auf der Basis des α_1 -Antichymotrypsin-PSA-Komplexes (Standard; monoklonale Antikörper) diese Probleme beseitigen könnte.

Danksagung

Den Firmen Hybritech GmbH, Köln und Byk-Sangtec GmbH, Dietzenbach danken wir für die Bereitstellung von Reagenzien und Geräten zur Durchführung dieser Studie. Der SFB 330 „Organprotektion“ unterstützte uns durch die gebotene Möglichkeit der Gerätemitnutzung.

Literatur

1. Armbuster, D.A. (1993): Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem* 39, 181–195.
2. Oesterling, J.E. (1991): Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 145, 907–923.

3. Cooner, W.H.; Mosley, B.R.; Rutherford, C.L., Jr.; Beard, J.H.; Pond, H.S.; Terry, W.J.; Igel, T.C.; Kidd, D.P. (1990): Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol* 143, 1146–1152.
4. Christensson, A.; Laurell, C.-B.; Lilja, H. (1990): Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine protease inhibitors. *Eur J Biochem* 194, 755–763.
5. Lilja, H.; Christensson, A.; Dahlen, U.; Matikainen, M.-T.; Nilsson, O.; Pettersson, K.; Lövgren, T. (1991): Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α_1 -antichymotrypsin. *Clin Chem* 37, 1618–1625.
6. Stenman, U.H.; Leinonen, J.; Alfthan, H.; Rannikko, S.; Tukkanen, K.; Alfthan, O. (1991): 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* 51, 222–226.
7. Wood, W.G.; Van der Sloot, E.; Böhle, A. (1991): The establishment and evaluation of luminescent-labelled immunometric assays for prostate-specific antigen- α_1 -antichymotrypsin complexes in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29, 787–794.
8. Christensson, A.; Björk, T.; Nilsson, O.; Dahlen, U.; Matikainen, M.-T.; Cockett, A.T.K.; Abrahamson, P.-A.; Lilja, H. (1993): Serum prostate specific antigen complexed to α_1 -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* 150, 100–115.
9. Zhou, A.M.; Tewari, P.C.; Bluestein, B.I.; Caldwell, G.W.; Larsen, F.L. (1993): Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem* 39, 2483–2491.
10. Passing, H.; Bablok, W. (1988): A new biometrical procedure for testing the equality of measurement from two analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 709–720.
11. Zweig, M.H.; Campbell, G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561–577.
12. Hanley J.A.; McNeil, B.J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29–36.
13. Wu, J.T. (1994): Assay for prostate specific antigen (PSA): problems and possible solutions. *J Clin Lab Anal* 8, 51–62.
14. Catalona, W.J.; Smith, D.S. (1994): Comparison of different serum prostate specific antigen measures for early prostate cancer detection. *Cancer* 74, 1516–1518.
15. Leinonen, J.; Lövgren, T.; Vornanen, T.; Stenman, U.H. (1993): Double-label time resolved immunofluorimetric assay of prostate-specific antigen and of its complex with α_1 -antichymotrypsin. *Clin Chem* 39, 2098–2106.
16. Vessella, R.L. (1993) Trends in immunoassays of prostate-specific antigen: serum complexes and ultrasensitivity. *Clin Chem* 39, 2035–2039.
17. Stephenson, R.A.; Creskovich, F.J.; Fritsche, H.A.; James, B.C. (1991) Ratio of polyclonal-monoclonal antigen levels: discrimination of nodal status in prostate tumors that produce low marker levels. *Urol Clin North Am* 18, 467–471.
18. Chu, T.M.; Kawinski, E.; Hibi, N.; Croghan, G.; Wiley, J.; Killian, C.S.; Corral, D. (1989) Prostate-specific antigenic domain of human specific antigen identified with monoclonal antibodies. *J Urol* 141, 152–156.
19. Strobel, S.A.; Sokoloff, R.L.; Wolfert, R.L.; Rittenhouse, H.G. (1995) Multiple forms of prostate-specific antigen in serum measured differently in equimolar- and skewed-response assays. *Clin Chem* 41, 125–126.
20. Bankson, D.; Lyon, M.E.; Costales, L.V.; Haver, V.M. (1994) The response of assays for total prostate specific antigen to changing proportions of free and α_1 -antichymotrypsin bound PSA. *Clin Chem* 40, 1009.
21. Densel, M.; Rittenhouse, H.; Cazares, L.; Wolfert, R. (1993) Detection of prostate specific antigen complexed to α_1 -antichymotrypsin (PSA/ACT) and uncomplexed PSA in serum from patients with benign prostate hyper trophy (BPH) and prostate cancer (PCA) using dual monoclonal assays. *J Urol* 149, 333A.
22. Wilson, L.; Stephenson, R.; Meikle, W.; Wu, J. (1994) Measurement of serum PSA/ACT complex in patients with BPH and prostate cancer: feasibility and advantages. *Clin Chem* 40, 1004.
23. Christensen, S.E.; Zhang, P.; Wang, T.; Stephenson, R.; Wu, J. (1994) The effect of prostate specific antigen (PSA) complex formation on current PSA assays. *Clin Chem* 40, 1011.

Erfahrungen mit Accutrend alpha im hyperbaren Betrieb

Das Hyperbaric Oxygen Committee der UHMS (Undersea and Hyperbaric Medical Society) überprüft regelmäßig die Indikationen für die hyperbare Oxygenation (HBO) und nimmt dazu Stellung.

Anerkannte Indikationen für HBO der UHMS:

- Luft- und Gasembolie
- Dekompressionserkrankung (Caisson-Krankheit)
- Kohlenmonoxidvergiftung, Cyanidvergiftung
- Traumatische Ischämien wie Compartment- und Crush-Syndrom
- Schleitheilende Wunden (z. B. Unterschenkelgeschwüre bei Diabetikern, Dekubitus)
- Hoher Blutverlust
- Gasbrand bzw. gasbildende Infektionen
- Schwere nekrotisierende Entzündungen
- Osteomyelitis, die nicht auf Basistherapie mit Antibiotika und Operation primär anspricht.

Fallabhängig anerkannte hyperbare Oxygenationsindikationen

- Akuter Hörsturz
- Tinnitusleiden mit Wahrnehmungsstörungen
- Periphere Ischämie unterschiedlicher Genese

Am Druckkammerzentrum Hannover wurden bislang ca. 15.000 Patientenbehandlungen (ischämische Innenohrerkrankungen mit Tinnitus, Osteomyelitiden sowie Wundheilungsstörungen) durchgeführt.

Die bei uns mit hyperbarem Sauerstoff behandelten diabetischen Patienten reagierten alle mit einer Senkung des Blutzuckerspiegels während der Therapie.

Durch die erhöhte Beanspruchung der Atemmuskulatur bei den Bemühungen um Druckausgleich (Preßversuche) in der Phase der Druckerhöhung und bei der Inhalation von Sauerstoff aus einem geschlossenen System unter 1,5 bar Überdruck sowie einer bei vielen Patienten nicht unerheblichen hohen psychischen Anspannung erhöht sich der Grundumsatz.

Die Stoffwechsellage des Patienten verschiebt sich in Richtung des hypoglykämischen Bereichs, mit der Möglichkeit des Auftretens eines hypoglykämischen Schocks muß gerechnet werden.

Aus diesem Grund halten wir eine Kontrolle des Blutzuckerspiegels bei diabetischen Patienten während der HBO-Therapie für unabdingbar.

In Zusammenarbeit mit dem Krankenhauslabor wurden vor und nach der ersten Druckkammertherapie stets Blutzuckerkontrollen durchgeführt. Aufgrund zunehmender Zahl an Diabetes mellitus Patienten entschieden wir uns, ein Blutzuckermessgerät auch unter hyperbaren Bedingungen zu testen, um eine kontinuierliche Überwachung zu ermöglichen, wie das für alle Vitalparameter inklusive kontinuierlicher tpO_2 Messung an unserem Institut üblich ist.

Durch die positiven Erfahrungen einer Patientin angeregt, entschlossen wir uns zur Testung des Accutrend alpha der Firma Boehringer Mannheim.

Zur Anschaffung des Accutrend alpha bewog uns die leichte Handhabung, sofortige Einsatzbereitschaft, störungsfreier Betrieb auch in der Druckkammer, jederzeitiger Zugriff der im Speicher vorhandenen letzten neun Meßwerte, gute Ablesbarkeit durch großes Display sowie die Drucktauglichkeit.

Unsere Kontrollmessungen unter normobaren Bedingungen ergaben eine Abweichung von 2 % im Mittelwert gegenüber hyperbaren Messungen. Die im Hauslabor durchgeführten Parallelmessungen bestätigten die Meßergebnisse des Accutrend alpha. Mit dem Accutrend alpha wurde die Überwachung unserer Diabetes mellitus Patienten deutlich verbessert.

Unsere positiven Erfahrungen mit diesem Meßgerät rechtfertigen trotz fehlender Vergleichsmöglichkeit mit ähnlich flexiblen Geräten anderer Hersteller eine Empfehlung für den Einsatz des Accutrend alpha zur Überwachung von diabetischen Patienten während der HBO-Therapie

Dr. med. W. Pranko - Ärztlicher Leiter
B. Kohmann - Assistenzärztin
K. Pflaum - Technischer Leiter

Autoklavieren - sicher und komfortabel mit neuer Technik

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine bakteriologisch einwandfreie Laborpraxis ist die Verwendung sterilisierter Gefäße, Geräte, Nährböden und Lösungen. Die Technik der Wahl ist für diesen Zweck die Dampfsterilisation. Über die vielen Gerätegenerationen hat ein erheblicher Wandel in Bezug auf Sicherheit, Bedienbarkeit aber auch Energie- und Wasserverbrauch stattgefunden. Während ältere Autoklaven zum Beispiel noch eine unbequeme Mehrfachverriegelung des Deckels erforderten, besitzen aktuelle Modelle überwiegend einen vergleichsweise eleganten Zentralriegel-Schnellverschluß.

Entsprechend den Anforderungen der modernen Laborpraxis hat die im Bereich Medizin- und Labortechnik tätige Fritz Gössner GmbH bereits eingeführte Autoklaven überarbeitet und mehrere neue Typen entwickelt.

Der Dampftopf DT 630 dient der drucklosen Dampfdesinfektion hitzeempfindlicher Nährböden und zur rationellen Warmhaltung zum Beispiel von Agar und Lösungen im Temperaturbereich von +30° bis +100° Celsius. Der im untere Geräteteil erzeugte Dampf umströmt die Proben. Er wird automatisch über großflächige Kühler entlüftet, wobei nicht-kondensierbare Gase nach außen geleitet werden. Der vollkommen überarbeitete Typ sorgt mehrfach für Senkungen des Wasserverbrauchs. Das neukonstruierte Wrasenkühlsystem spart gegenüber dem Vorgängermodell 50% Kühlwasser. Diese Einsparung wird zum einen durch einen Kühlwasserstop während der Aufheizphase, zum anderen durch die Rückführung strömenden Dampfes als Kondensat gesteigert. Andere Einrichtungen dienen der Arbeitssicherheit. So wird bei geöffnetem Deckel die Heizung unterbrochen, wodurch neben dem Stromverbrauch vor allem die Dampfabgabe an den Raum verringert wird. Die selbstdichtende Silikondichtung des Deckels verhindert das Austreten von Wrasen.

Mit den aktuellen Gössner Autoklaven wurde ein Problem der Dampfsterilisation beseitigt - die restlose Beseitigung, der beim Start in der Sterilisationskammer vorhandenen Luft. Ein automatisches Entlüftungsventil sorgt in der Anheizphase mit einem großen Strömungsquerschnitt für ein rasches Ableiten der eingeschlossenen Luft. In der anschließenden Sterilisationsphase wird durch dieses Ventil die Dauerströmung reguliert. Der Tischaufoklav GLA 30 bietet 60 L Inhalt. Trotz der kompakten Bauweise ist auch dieses Modell mit allen Sicherheits- und Überwachungs-

Anzeige

Aggregationsgeräte / Reagenzien
Blutsenkungsautomaten
Blutkörperzähler
Blutbilddifferenziergeräte
Drogen Urin Tests
Mikropipetten / Zubehör
Zellzähler f. Sonderanwendungen



Verbindungsstraße 27
40723 Hilden
Telefon: (0 21 03) 68 36 0
Telefax: (0 21 03) 8 83 47

einrichtungen gemäß den TÜV-Vorschriften ausgerüstet. Die größeren Modelle GVA 4.6 und GLA 40 haben 77 beziehungsweise 130 L Inhalt. Neben der automatischen Entlüftung gehören bei allen drei Modellen ein vollautomatischer Programmablauf sowie eine Wassermangelsicherung zur Grundausstattung. Der GLA 40 ermöglicht zudem eine freiprogrammierbare Mikroprozessor-Steuerung, Klartextanzeige des Programmablaufes und der Fehlermeldungen.

Eine preiswerte Alternative wird mit dem Autoklaven GVA 460 angeboten. Bei diesem Gerät wurde auf die aufwendige Zentralverriegelung des Deckels, die medientemperaturabhängige Deckelverriegelung, die Schnellrückkühlung sowie die automatische Einspeisung verzichtet. Ansonsten entspricht die technische Ausrüstung den erwähnten Autoklaven.

Die Produktpalette der Firma Gössner wird durch den neuen Muttermilchpasteurisateur GMP 200 erweitert. Er kann mit bis zu 40 Milchflaschen à 250 ml plus einer Referenzflasche bestückt werden. Eine Niveauautomatik sorgt unabhängig von der Flaschenanzahl immer für den notwendigen Wasserstand. Durch ein Kühlaggregat kann bei der Rückkühlung Trinkwasser gespart werden.

Die konsequente Umsetzung technischer Standards gehört zu den Selbstverständlichkeiten. Darüberhinaus werden bei den genannten Geräten durch Grundausstattungen und zahlreichen Optionen zur Geräteerweiterung ergonomische, ökologische Aspekte sowie Sicherheitsfragen in einem sehr hohen Maß berücksichtigt.

Bezugsadresse: Fritz Gössner GmbH,
Sperberhorst 23, 22459 Hamburg
Tel.: 040/ 551 50 61-62
Fax: 040/ 552 24 05