

Das neue immunoluminometrische Berilux® PSA – ein Test für das Routinelabor. Ein Methodenvergleich

Immunoluminometric – Berilux® PSA – a new routine test.
A comparison of methods

G. M. Oremek¹, W. W. Meyer², U. B. Seiffert¹, D. Jonas²

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

¹ Klinisch-chemisches Zentrallaboratorium, Zentrum der Inneren Medizin

² Abteilung für Urologie, Zentrum der Chirurgie

Zusammenfassung:

In dieser Studie wurde der immunoluminometrische Berilux® PSA-Test mit zwei radioimmunologischen und einem fluorometrischen Verfahren verglichen. Für den Berilux® PSA wurden an 150 gesunden Probanden (100 Männer und 50 Frauen) die Referenzbereiche ermittelt.

Bei Männern lag die 95%-Perzentile bei 3,77 ng/ml, für Frauen lag die 95%-Perzentile bei 0,1 ng/ml.

Der Korrelationskoeffizient zwischen der immunoluminometrischen Methode und radioimmunologischen Methode liegt bei $r = 0,99$, die analytische Sensitivität von Berilux® PSA liegt bei 0,03 ng/ml. Die Stabilität der Serumproben bei Lagerungstemperaturen zwischen 2°C und 8°C ist über einen Tag garantiert. Über diesen Zeitraum hinaus sollten Serumproben bei -20°C gelagert werden.

Schlüsselwörter:

Prostata-spezifisches Antigen – Chemilumineszenz – immunologische Methoden

Summary:

In this study we compared the immunoluminometric Berilux® PSA test with three other routine tests, two radioimmunological and a fluoroimmunometric one. Therefore we evaluated a reference range for the Berilux® PSA test on 150 healthy volunteers (100 men and 50 women).

In men 95 percentage of the values were by 3.77 ng/ml, in women by 0.1 ng/ml. The correlation between the immunoluminometric and radioimmunologic method is very good with an $r = 0.99$. The sensitivity of the analysis is at a level of 0.03 ng/ml. The specimen remains stable at a storage temperature between 2-8°C for 24 hours. In case of a longer storage period a storage temperature of -20°C should be chosen.

Keywords:

Prostate specific antigen – chemiluminescence – immunologic methods

Einleitung

Zur rechtzeitigen Erfassung einer Progression des Prostatakarzinoms und der Prostataerkrankung wird neben den klinischen Parametern die Bestimmung des prostata-spezifischen Antigen (PSA) herangezogen. Mit prostata-spezifischen Antigen (PSA) steht ein sensitiver sowie hochspezifischer Tumormarker zur Verfügung. PSA ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht 34000 Dalton,

das ausschließlich in der Prostata, in Prostatasekret und Samenflüssigkeit gefunden wird [1].

Immunhistochemisch konnte PSA im Cytoplasma der azinösen Prostatazellen und im duktalem Epithel nachgewiesen werden [2, 3]. Das prostata-spezifische Antigen ist gewebespezifisch, bei anderen Tumoren sind keine erhöhten Konzentrationen nachweisbar.

Wegen seiner außerordentlichen Sensitivität bei Erkrankungen der Prostata ist PSA der aufschlußreichste Tumormarker für die Krebsbiologie [4].

Material und Methode

Der Referenzbereich wurde an 150 gesunden Probanden (100 Männer und 50 Frauen) im Alter von 18 bis 65 Jahren ermittelt.

Unter gesunden Probanden wurden Personen einbezogen, die keine Beschwerden haben und deren 20 Parameter der klinischen Chemie, Blutbild, Urinstatus sowie Gerinnungsstatus keine pathologischen Werte aufwiesen.

Des weiteren wurden 50 Patienten mit benignen urologischen Erkrankungen wie Prostatitis und Prostata-Adenom und 30 Patienten mit einem Prostata-Karzinom untersucht.

Methode 1:

Immunoluminometrische Bestimmung von prostataspezifischen Antigen-BeriLux® PSA [5].

Die Bestimmung von PSA erfolgt hier mit einem Chemilumineszenz-Testverfahren (Behringwerke AG Marburg).

BeriLux® PSA ist ein 1-Schritt-Sandwich-Assay. Es bildet sich ein Komplex aus wandgebundenen Anti-PSA-Antikörpern (monoklonal, Maus), dem PSA der Probe und dem luminogen markierten Anti-PSA-Antikörper (monoklonal, Maus). Nach Ablauf der Komplexbildungs-Reaktion (60 Minuten + 5) wird der nicht gebundene Tracer dekantiert und durch 4-maliges Waschen entfernt. Die Chemilumineszenz des gebundenen Tracers wird automatisch am BeriLux®-Analyser 250 gemessen.

Methode 2:

RIA-gnost PSA® Testkit (Behringwerke AG Marburg) erfolgt nach dem Prinzip eines 2-Schritt-Sandwich-Assays. Der Test verwendet zwei monoklonale Antikörper, der eine ist mit ¹²⁵J markiert.

Die Radioaktivität wird am Riastar® (Hewlett Packard) Gammazintillationszähler gemessen und die PSA-Konzentration über eine Standardkurve ermittelt.

Methode 3:

PSA-MAIAclone® (Serono) ist ein immunradiometrischer Assay mit zwei monoklonalen Antikörpern und magnetischer Trennung über eine Festphase [6].

Die Radioaktivität wird am Riastar® Gammazintillationszähler gemessen und die PSA-Konzentration über eine Standardkurve berechnet.

Methode 4:

Die Bestimmung von PSA erfolgt mit einem fluorometrischen Delfia®-PSA-Testverfahren (Pharmacia). Bei der

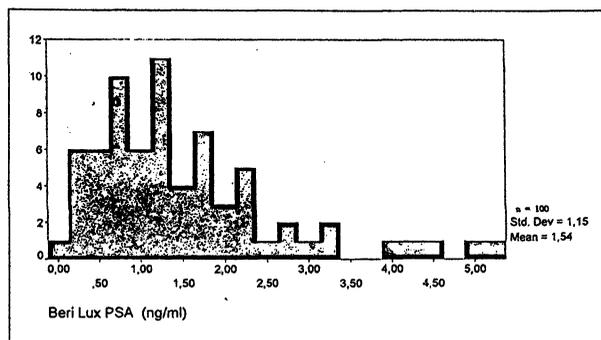


Abb. 1: Normwertverteilung bei Gesunden – BeriLux® PSA.

Methode handelt es sich um einen zweiseitigen fluorometrischen Festphasenassay [7, 8]. Die intensive Fluoreszenz des Europium-Chelatkomplexes ist der in Probe vorliegenden PSA-Konzentration direkt proportional. Die Bestimmung der PSA-Konzentration erfolgt am 1230 ARCUS®-Fluorometer.

Ergebnisse und Diskussion

Die ermittelten Normwerte für 100 männliche gesunde Probanden sind im Histogramm (Abbildung 1) dargestellt. Die 5%-Perzentile liegt bei 0,27 ng/ml, die 95%-Perzentile bei 3,77 ng/ml. Die PSA-Konzentrationen lagen zwischen 0,07 ng/ml und 5,14 ng/ml. Für 50 gesunde Frauen lag die 95%-Perzentile bei 0,1 ng/ml.

Stabilität und Präzision

Die Seren der gesunden Probanden wurden zwischen +2° und 8°C über 24 Stunden gelagert. Die Messung zeigte eine Erniedrigung der PSA-Konzentration um 2,7% gegenüber der Frischmessung. Die Stabilität ist also über diesen Zeitraum bei der angegebenen Temperatur gegeben. Bei Proben, die bei -20°C gelagert waren, betrug die Konzentrationsabnahme im Durchschnitt 1,8%. Bei 10facher Messung einer Serumprobe mit einer Aktivität von durchschnittlich 1,1 ng/ml mit der BeriLux® Methode ergab die Berechnung der Präzision einen Variationskoeffizienten von 2,74%. Eine 10fache Messung eines Serums mit einer Aktivität von durchschnittlich 21,9 ng/ml ergab die Berechnung der Präzision einen Variationskoeffizienten von 4,2%. Die Präzision von Tag zu Tag ergab bei 10

Tabelle 1: Mittelwert und Standardabweichung der mit vier verschiedenen Methoden bei 100 gesunden Probanden gemessenen PSA-Konzentrationen.

Methode	Konzentration	Mittelwert $\bar{x} \pm 2 SD$
1	ng/ml	2,66 \pm 0,4
2	ng/ml	2,4 \pm 1,2
3	ng/ml	1,7 \pm 1,0
4	ng/ml	2,77 \pm 0,8

Tabelle 2: Mittelwert und Standardabweichung der mit dem BeriLux®-Verfahren gemessenen PSA-Konzentration im Serum bei Gesunden, Patienten mit benignen urologischen Erkrankungen und Prostatakarzinom.

	n	Range ng/ml	$\bar{x} \pm 2 SD$
Gesunde	100	0,07– 5,14	2,66 \pm 0,4
benigne urologische Erkrankungen	50	3,9 –14,3	7,5 \pm 5,3
Prostatakarzinom	30	9,95–97,2	31,3 \pm 30,9

Doppelbestimmungen einer Lyphocheck® Tumormarkerkontrolle einen Variationskoeffizienten von 3,89%.

Methodenvergleich:

Die mit der BeriLux®-PSA-Methode erhaltenen Werte der PSA-Aktivität im Serum zeigen eine sehr gute Korrelation zu den mit der radiochemischen Methode erhaltenen Meßwerten. Eine Referenzmethode für die PSA-Messung im Sinne eines „Goldstandard“ ist nicht vorhanden, die radioaktive Methode gilt bislang als die zuverlässigste.

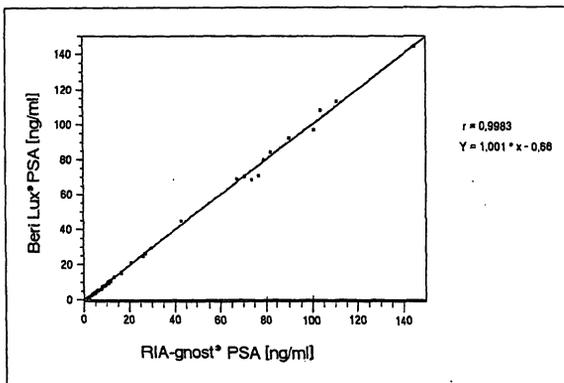


Abb. 2: Korrelation RIA-gnost®-PSA – BeriLux®-PSA.

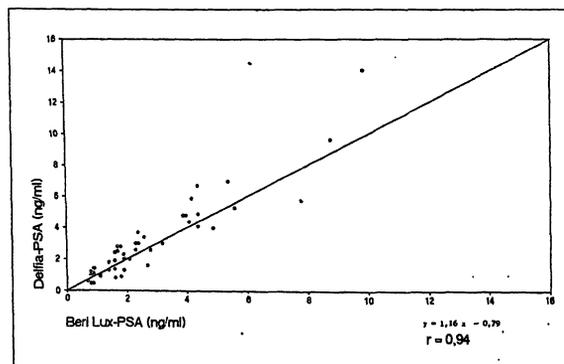


Abb. 3: Korrelation BeriLux® PSA – Delfia® PSA.

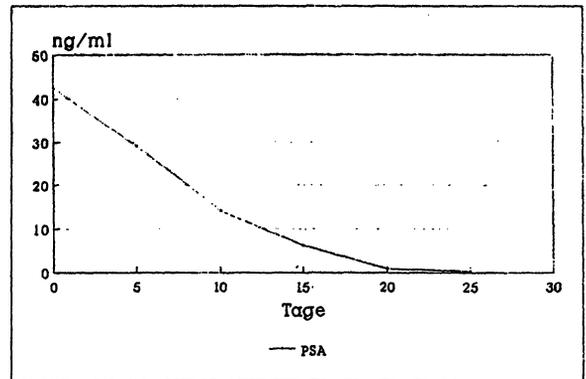


Abb. 4: Verlauf der PSA – Konzentration nach radikaler Prostatektomie (AF, 63a).

Der Korrelationskoeffizient im Vergleich von Methode 1 und 2 beträgt $r = 0,99$ und die Gleichung der linearen Regression lautet $y = 1,001x - 0,66$ und ist aus Abbildung 2 ersichtlich.

Der Korrelationskoeffizient im Vergleich von Methode 1 und 3 beträgt $r = 0,98$ und die Gleichung der linearen Regression lautet $y = 0,9x - 0,25$.

Die Korrelation zwischen dem Chemilumineszenz-Testverfahren und dem Fluoreszenz-Delfia®-PSA-Verfahren stimmt sehr gut überein; der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,94$, die Gleichung der linearen Regression lautet $y = 1,16x - 0,79$ und ist in Abbildung 3 dargestellt.

Für benigne urologische Erkrankungen wurden PSA-Konzentrationen ermittelt, die zwischen 3,9 ng/ml und 14,3 ng/ml lagen.

Die PSA-Konzentrationen der Prostata-Karzinom-Patienten lagen zwischen 9,95 ng/ml und 97,2 ng/ml, damit lagen die Konzentrationen deutlich im pathologischen Bereich und klar über den Normwerten.

Als Beispiel wird in Abbildung 4 der PSA-Konzentrationsverlauf bei einem 63 Jahre alten Patienten nach radikaler Prostatektomie dargestellt.

Der präoperative PSA-Wert von 42,5 ng/ml fällt postoperativ im Zeitraum von 25 Tagen auf 0,3 ng/ml ab, dies ist positiv zu werten. Der Patient wird weiter überwacht.

Der neue BeriLux® PSA-Test erwies sich als sehr praktikabel. Innerhalb 90 Minuten können Ergebnisse geliefert werden, der Testansatz ist einfach, die Präzision in der Serie sehr gut. Besonders hervorzuheben ist auch die Stabilität der Reagenzien, die gute Übereinstimmung mit den radioimmunologischen Methoden und der geringe Zeit- und Arbeitsaufwand. Die Entsorgung von radioaktivem Abfall entfällt. Somit ist der neue BeriLux® PSA-Test sehr praktikabel und einsatzfähig für das Routinelabor.

Schrifttum:

1. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, P. G., Chu, T. M. (1979) Purification of human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* 17, 159-163.
2. Stamey, Th. A., Kabalin, J. N., Ferrari, M. (1989) Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. *J. Urol.* 141, 1084-1087.
3. Stamey, Th. A. (1990) Die Rolle des prostataspezifischen Antigens bei der Diagnose und Behandlung des Prostataadenokarzinoms. *Urologe [A]*-29, 52-64.
4. Bentvelsen, F. M., Schröder, F. H. (1993) Eignet sich Prostata spezifisches Antigen (PSA) für ein Screening auf Prostata-Karzinom. *GIT Lab. Med.* 7/2, 2-7.
5. Neuenhofer, S., Schnorr, G. K., Käsmarker, R., Kraft, A., Oremek, G. M., Merle, P. (1993) Berilux® und RIA-gnost® PSA coated tube Assays zur Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA). *Lab. Med.* 17, 234.
6. Soos, M. (1984) Characterization of monoclonal antibodies for human luteinizing hormone and mapping of antigenic determinants on the hormone. *CCA* 133, 1457-1462.
7. Hemmilä, T., Dakubu, S., Mukkala, V. M., Siitari, H., Lövgren, T. (1984) Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assay. *Anal. Biochem.* 137, 335-343.
8. Lövgren, T., Hemmilä, I., Pettersson, K., Halonen, P. (1985) Time resolved fluorometry immunoassays. In: *Alternative Immunoassays*. Ed. W. P. Collins. John Wiley and Sons Ltd. England, p. 203-217.

Korrespondenzadresse:

Dr. Gerhard Oremek
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium
des Zentrums der Inneren Medizin
Theodor-Stern-Kai 7
D-60590 Frankfurt am Main