

## STUDIO CLINICO

### **ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DELL'IMMUNOCOMPLESSO PSA-IgM NELLA DIAGNOSI PRECOCE DEL CARCINOMA PROSTATICO**

**Coordinatore:      *Dr Andrea Benedetto Galosi***

#### **1. Basi scientifiche**

Nella pratica clinica la diagnosi di carcinoma prostatico (PCa) viene effettuata attraverso il dosaggio dell'antigene prostatico specifico (PSA), l'esplorazione rettale (DRE) e l'ecografia prostatica (TRUS). La bassa specificità (28-74%) e sensibilità (17-90%) diagnostica <sup>(1)</sup> relegano l'ecografia ad un ruolo marginale nella diagnosi del carcinoma prostatico, mentre sia l'esplorazione rettale che il test del PSA – in particolare quest'ultimo – vengono più comunemente utilizzati nella routine diagnostica. D'altro canto l'esplorazione rettale presenta il limite della variabilità soggettiva e dell'impossibilità di apprezzare l'intera prostata (all'alta sensibilità si contrappone una bassa specificità con il rischio di perdere dal 44 al 59% dei tumori) e il PSA, per le caratteristiche intrinseche della molecola, non garantisce un'accuratezza diagnostica accettabile <sup>(1,2)</sup>. Il valore soglia comunemente accettato (4 ng/mL) non assicura una totale discriminazione tra sani e malati (una significativa percentuale di malati, dal 10 al 20% circa, sfugge al test) e, anche nell'intervallo di valori tra 4 e 10 ng/mL, spesso il marcatore non è attendibile. Generalmente, a questo livello subentra il ricorso alla biopsia prostatica eco guidata, una pratica certamente in grado di offrire maggiore attendibilità ma invasiva per il paziente e dispendiosa per le strutture sanitarie.

Nel tentativo di superare le inadeguatezze del PSA ne sono state sviluppate diverse varianti; la densità del PSA, la velocità del PSA, la percentuale di PSA libero sul totale, la velocità con cui il valore di PSA raddoppia nel tempo (PSA Doubling Time) e gli intervalli corretti per età ed etnia. Purtroppo il corrente livello di standardizzazione non ne consente un utilizzo di ampia diffusione.

La questione dell'impiego o meno del PSA in un programma di screening su larga scala rimane comunque aperta e senza una risposta univoca, anche se, recentemente, uno studio realizzato su 182.000 pazienti tra 50 e 74 anni e pubblicato sul *New England Journal* ha evidenziato che l'utilizzo del test del PSA può ridurre il tasso di mortalità a 9 anni del 20% <sup>(3)</sup>.

La recente scoperta di immunocomplessi formati da immunoglobuline della classe M (IgM) e biomarcatori tipici della neoplasia epatica e del colon retto (SCCA e CEA) <sup>(4,5,6)</sup> ha suggerito la messa a punto di un saggio immunometrico, basato sul dosaggio degli immunocomplessi dell'antigene prostatico specifico (PSA-IgM) nel carcinoma prostatico. L'intento di Xeptagen è stato di sviluppare un test diagnostico per la diagnosi di PCa negli stadi precoci. Il confronto tra il PSA con cut-off 4 e 10 ng/mL (rispettivamente PSA 4 e PSA 10) ed il PSA-IgM ha messo in luce l'aumentato livello di specificità del PSA-IgM (SP

= 88%) rispetto al PSA 4 (SP = 4%) e al PSA 10 (SP = 71%). Inoltre, la sensibilità di PSA-IgM rispetto al PSA 10 è quasi raddoppiata (SE, PSA-IgM = 40%; SE, PSA 10 = 22%). È stata presa in esame l'accuratezza del biomarcatore complessato in un intervallo di pazienti con valori di PSA oscillanti tra 4 e 10 ng/mL: ne è risultato che PSA-IgM ha correttamente classificato il 43% dei pazienti con neoplasia prostatica, mantenendo una specificità rispetto ai pazienti iperplastici dell'88%. Ciò che, infine, va evidenziato è l'ottimo livello di complementarità dei due test, dal momento che l'uso combinato di PSA-IgM e PSA 10 porta i livelli di sensibilità e specificità rispettivamente al 60% e al 63% <sup>(7)</sup>.

Nella pratica clinica la ripetizione della biopsia viene suggerita non solo quando il valore del PSA si innalza oltre un certo limite o si mantiene costantemente a livelli elevati, ma anche in presenza di condizioni cliniche che richiedono un attento monitoraggio, come la Neoplasia Prostatica Intraepiteliale di alto grado (High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia, HGPIN) e la Proliferazione Microacinare Atipica (Atypical Small Acinar Proliferation, ASAP); queste patologie vengono diagnosticate su campioni ottenuti tramite ago biopsia prostatica eco-guidata e prevedono il ricorso ad una seconda biopsia, più o meno ravvicinata nel tempo e con un maggiore numero di prelievi bioptici. Entrambe hanno forte valore predittivo nei confronti dell'adenocarcinoma della prostata. Il carcinoma prostatico viene riscontrato nel 60% dei pazienti, con diagnosi di ASAP, che si sottopongono alla seconda biopsia <sup>(8)</sup>. La Neoplasia Prostatica Intraepiteliale di alto grado viene segnalata in circa il 7% delle ago biopsie e le rebiopsie producono tassi di diagnosi di carcinoma compresi tra 25 e 79% dopo una prima diagnosi di HGPIN <sup>(9)</sup>. Con l'introduzione della biopsia prostatica estesa sono stati evidenziati nuovi tassi di incidenza sia del carcinoma prostatico che di HGPIN e ASAP. Mentre dopo una prima diagnosi di HGPIN le possibilità di riscontrare un carcinoma si sono ridotte al 21%, quelle relative ad ASAP sono rimaste invariate, confermandone il forte valore predittivo <sup>(10)</sup>.

Da ciò emerge l'importanza di un confronto tra i livelli sierici di PSA e PSA-IgM nei pazienti che presentino HGPIN e/o ASAP alla prima biopsia, allo scopo di monitorarli per evitare la ripetizione di biopsie laddove non necessario. Abbiamo pertanto, l'opportunità di testare l'accuratezza del biomarcatore nel distinguerli e classificarli correttamente, il che consentirà, in un futuro prossimo un intervento preventivo mirato su una categoria di pazienti a rischio, riducendo le biopsie, con notevole risparmio sul sistema sanitario nazionale.

## **2. Determinazione PSA-IgM**

Prostate-IC è un saggio immunoenzimatico di tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) per misurare la concentrazione degli immunocomplessi PSA-IgM nel siero.

Le piastre ELISA da 96 pozzetti vengono sensibilizzate nei nostri laboratori seguendo uno schema precedentemente illustrato <sup>(7)</sup>. È, pertanto, possibile procedere all'aggiunta di 100 µL/well di calibratore standard (in duplicato), eseguendo direttamente nella piastra le diluizioni seriali di un fattore 2, così da ottenere una curva di calibrazione a sette punti. Nei pozzetti relativi al controllo negativo verrà immesso direttamente il tampone di diluizione.

A questo punto si aggiungono 100 µL/well (in duplicato) della diluizione 1:50 relativa ai campioni e si lascia incubare per circa un'ora a temperatura ambiente.

La fase successiva prevede di aggiungere 100 µL/well della soluzione diluita di anticorpo secondario coniugato con l'enzima e di lasciare incubare un'ora a temperatura ambiente. Infine, si aggiungono 100 µL/well di soluzione cromogena contenente TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Lasciar incubare al buio e leggere i valori di densità ottica (OD) di ciascun pozzetto usando un lettore per micropiastre equipaggiato con un filtro a 650 nm. In alternativa a questo, si possono aggiungere 100 µL/well di soluzione di arresto e misurare i valori di OD di ciascun pozzetto utilizzando il lettore di micropiastre equipaggiato con un filtro a 450 nm. La lettura della reazione va effettuata entro 1 ora.

L'ultimo passo prevede la costruzione della curva standard dai valori di  $\Delta OD$ , con i valori ottenuti eseguendo una media delle densità ottiche di ciascuno dei punti dello standard e dei campioni, e sottraendo la media delle densità ottiche relative al bianco.

Tutte le incubazioni devono essere condotte in una scatola chiusa contenente carta umida sul fondo in modo da prevenire l'evaporazione.

La concentrazione di PSA-IgM viene espressa in unità arbitrarie (AU) per mL (AU/mL) utilizzando come standard di riferimento un bio-coniugato PSA-IgM di origine semi-sintetica.

Le concentrazioni di immunocomplesso dei campioni vengono quantificate mediante interpolazione sulla curva standard dei valori di OD calcolati per ogni campione. La concentrazione ottenuta deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione del campione.

La metodica del saggio è stata standardizzata ed è stata eseguita una valutazione della performance analitica: il coefficiente di variazione inter- ed intrasaggio è stato determinato su 4 curve standard ed è risultato essere inferiore al 10%. L'intervallo di calibrazione è compreso tra 0.7 e 45 AU/mL ed il valore di cut-off di PSA-IgM che consente di differenziare la neoplasia da una patologia non maligna è di 145 AU/mL.

### **3. Obiettivo dello studio**

- Verificare l'utilità diagnostica dei livelli circolanti del marcatore PSA-IgM come indicatore della presenza del PCa in stadio precoce nei pazienti che si sottopongono a seconda biopsia.
- Valutare eventuali correlazioni con il grado di differenziazione della neoplasia ed il suo stadio.

### **4. Disegno dello studio**

*Studio prospettico.*

L'obiettivo è di arruolare almeno **150** pazienti con sospetto clinico di neoplasia prostatica, in precedenza sottoposti a prima biopsia, con esito negativo, e destinati a rebiopsia conseguentemente all'elevato valore di PSA (valore persistente alto o soggetto ad ulteriore innalzamento dopo la prima biopsia) o alla presenza di proliferazione microacinare atipica (ASAP) o alla presenza di HGPIN di alto grado <sup>(11)</sup>.

Il periodo ottimale per la ripetizione della biopsia può dipendere dall'indice di sospetto persistente di carcinoma prostatico (livello di PSA, DRE sospetta, familiarità) <sup>(11)</sup>.

Un'indicazione di massima suggerisce la ripetizione entro 6-12 mesi, con un numero di prelievi aumentato rispetto alla prima serie e comprendenti la zona di transizione <sup>(12, 13)</sup>.

## **5. Diagnosi di Patologia**

Diagnosi istologica di patologia su prelievo bioptico (biopsia transrettale o transperineale a 8-12 prelievi): neoplasia, HGPIN, ASAP o ipertrofia prostatica benigna secondo i parametri UICC.

## **6. Criteri di inclusione**

La biopsia viene ripetuta:

- Se il valore di PSA è costantemente superiore a 10 ng/mL.
- Quando la PSA velocity è superiore a 0.75 ng/mL/anno.
- In presenza di ASAP o HGPIN.
- Se la prima biopsia risulta inadeguata (meno di 6 prelievi, assenza di ghiandole prostatiche, frammenti troppo piccoli o non leggibili) <sup>(11)</sup>.
- Esecuzione dei prelievi ematici presso la struttura ospedaliera (Emocromo, PT, PTT, eventuale ripetizione del PSA)

## **7. Criteri di esclusione**

- Neoplasie concomitanti.
- Malattie auto immuni.
- Infezioni clinicamente in atto.
- Terapia cortisonica.
- Terapia immunosoppressiva.
- Trattamento con inibitori 5-alfa redattasi (Finasteride, Dutasteride)
- Pazienti che non eseguono prelievi ematici preliminari alla biopsia presso la struttura ospedaliera

## **8. Parametri da raccogliere nella scheda di arruolamento del paziente**

Valutazione dei parametri indicati nella scheda di inquadramento clinico (vedi CRF)

## **9. Parametri che saranno valutati per definire l'efficacia diagnostica di PSA-IgM**

### **A. End-point primari:**

- Sensibilità (SE) e specificità (SP).
- Accuratezza diagnostica.
- Correlazione al grado di differenziazione della malattia.
- Correlazione allo stadio TNM.

## **B. End point secondari:**

- Validazione del valore ottimale di cut-off (definito dalla curva ROC).
- Correlazione all'evoluzione clinica del paziente.

## **10. Analisi statistica**

I dati comprendenti la storia clinica, l'esame obiettivo, il panel degli esami di laboratorio e dell'ecografia verranno registrati al momento dell'inserimento dello studio e durante il follow-up in forma elettronica sulla scheda CRF predisposta.

I dati raccolti saranno elaborati per calcolare gli indici di statistica descrittiva allo scopo di organizzare, riassumere e presentare i risultati della distribuzione sierologica di PSA-IgM e PSA nella popolazione analizzata.

In particolare saranno calcolati il valore mediano e il valore medio  $\pm$  deviazione standard (SD) del biomarcatore. Gli indici di statistica descrittiva saranno presentati graficamente con l'analisi box whisker che permette di indicare anche il grado di dispersione dei dati e la forma della distribuzione analizzata. Tale analisi riporta i valori osservati in un grafico sottoforma di box e diamanti.

Inoltre, saranno calcolati i valori di sensibilità diagnostica di PSA-IgM e di PSA in funzione dei valori di cut off utilizzati per i due biomarcatori.

Nel caso del dosaggio di PSA-IgM, utilizzando il valore di cut off di 145 AU/mL, il valore percentuale atteso dei campioni veri positivi, cioè correttamente identificati, è stimato intorno al 40%, mentre ci si attende un valore più basso per il saggio del PSA con cut off 10 ng/mL.

Un numero di circa 30 pazienti veri positivi rappresenta la stima attesa dei pazienti con CaP individuati all'interno del gruppo dei 150 pazienti reclutati per lo studio, mentre con il test del PSA ci si attende di poterne identificare correttamente meno della metà.

Abbiamo effettuato una serie di calcoli volti a quantificare le proprietà statistiche di uno studio diagnostico per la valutazione di sensibilità e specificità di un biomarcatore disponendo di 150 casi e 150 controlli.

In tali condizioni, la semi-ampiezza dell'intervallo di confidenza (assunto come misura del grado di precisione delle stime di sensibilità e specificità) è 18%. In termini di valutazione della performance diagnostica del biomarcatore rispetto a un benchmark, la potenza statistica risulta essere elevata (circa 90%) per incrementi di sensibilità/specificità compresi tra 10% e 15%, partendo da valori attesi sotto l'ipotesi nulla pari, rispettivamente, a 80% e 50%.

Dal momento che le numerosità dello studio in esame è confrontabile con i 150 casi e 150 controlli ipotizzati, i risultati sopra evidenziati possono ritenersi estrapolabili dal protocollo ed essere eventualmente utilizzati in sede di pubblicazione.

## **11. Raccolta spedizione ed analisi dei livelli di PSA-IgM**

I campioni vengono prelevati secondo i protocolli assistenziali vigenti presso le singole strutture ospedaliere nei locali, tempi e modalità stabilite senza devianze dai protocolli vigenti presso le strutture aderenti.

Circa 3-4ml di sangue sono sufficienti all'analisi sperimentale I campioni di siero, derivati dal sangue intero, dovrebbero essere prelevati in condizioni asettiche ed in modo tale da evitare fenomeni di emolisi. I campioni possono essere conservati a 2-8°C se il saggio è effettuato nelle 24 ore che seguono il prelievo, in caso contrario devono essere congelati. Ogni centro partecipante provvederà allo stoccaggio, a -20C°, di 2 ml di siero raccolti al momento dell'inclusione nello studio del paziente.

I campioni saranno prelevati prima della ripetizione della biopsia e l'esecuzione del test del PSA e del PSA-IgM verrà condotta sul medesimo campione di siero, così da preservare il più possibile l'autenticità del confronto.

L'esecuzione dei test analitici di PSA-IgM e PSA sarà centralizzata in un unico laboratorio.

## **12. Periodo di arruolamento**

Gennaio 2011 – OTTOBRE 2011

## **13. Aspetti assicurativi**

Il decreto legislativo del 14/09/2009 14 luglio 2009 riguardante i requisiti minimi per le polizze assicurative a tutela dei soggetti partecipanti alle sperimentazioni cliniche dei medicinali, precisa nell'articolo 4 si chiarisce che tali criteri non sono applicabili agli studi osservazionali.

Il prelievo di sangue che il paziente esegue presso la struttura fa parte dei controlli previsti dalla normale pratica clinica. Tale prelievo ematico è necessario e preliminare alla biopsia prostatica: l'esecuzione dei test emocagulativi, emocromo con conteggio piastrinico e eventualmente associati alla ripetizione del PSA sono ritenute indispensabile alla biopsia. Circa 3-4ml di sangue, prelevato per le ragioni sopra chiarite, sono sufficienti all'analisi sperimentale.

Partecipano pertanto solo i soggetti che eseguono gli esami ematici preliminari alla biopsia presso la struttura Ospedaliera di riferimento (vedi criteri inclusione e esclusione).

In tale modo verranno inclusi nello studio solo coloro che dovranno eseguire il prelievo ematico nella pratica clinica necessaria ed indispensabile al proseguo dell'iter diagnostico della neoplasia. Il prelievo ematico è eseguito secondo i protocolli assistenziali e segue la copertura assicurativa aziendale.

I campioni vengono prelevati secondo i protocolli assistenziali vigenti presso le singole strutture ospedaliere nei locali, tempi e modalità stabilite senza devianze dai protocolli già vigenti presso le strutture aderenti.

#### 14. Centri partecipanti

- Centro Regionale indicatori biochimici di tumore – Venezia (**Gion M.**)
- Ospedale Ca Foncello – Treviso (**Fandella A.**)
- Ospedale S. Orsola Malpighi – Bologna (**Bertaccini A, Schiavina R, Marchiori D.**)
- Villa Tiberia – Roma (**Vincenti G.**)
- Presidio Sanitario Grandenigo – Torino (**Squeo M.S.**)
- Ospedali Riuniti di Ancona (**Galosi A.**)
- Policlinico G.B. Rossi – Verona (**Novella G.**)
- I.N.R.C.A. – Ancona (**Pierangeli T.**)
- Clinica Urologica di Novara (**Marchioro G.**)
- Urologia Torvergata – Roma (**Virgili G.**)
- Urologia S. Raffaele – Milano (**Nava D.L.**)
- Ospedali Riuniti di Bergamo (**Roscigno M.**)
- Ospedale di Asti (**Cussotto M.**)
- Ospedale di Forlì (**Gunelli R.**)
- Ospedale di Castellanza – Varese (**Consonni P.**)
- Ospedale di Fidenza – Parma (**Benecchi L.**)
- Azienda Universitaria Federico II – Napoli (**Montanaro V.**)
- Policlinico Universitario di Palermo (**Serretta V.**)
- Istituto Tumori Regina Elena (**Canitano S, Sentinelli S.**)
- Policlinico di Bari (**Martino P.**)

#### 14. Bibliografia essenziale

1. Consonni P - **Biopsia prostatica ed elastosonografia.** XIX Convegno Nazionale SIUrO, 23-26 Giugno 2009, Milano.
2. Mettlin C, Murphy GP, Babaian RJ, Chesley A, Kane RA, Littrup PJ, Mostofi FK, Ray PS, Shanberg AM, Toi A. - **The results of a five-year early prostate cancer detection intervention.** Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer*, 1996, 77:150-9.
3. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Määttänen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A; ERSPC Investigators - **Screening and prostate cancer mortality in a randomized European study.** *N Engl J Med*, 2009, 360: 1320-8.

4. Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, Beneduce L, Marino M, Bernardinello E, Tono N, Fassina G, Cavalletto L, Gatta A, Chemello L - **Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma.** Int J Cancer, 2006, 119:735-40
5. Castaldi F, Marino M, Belluco C, De Marchi F, Mammano E, Nitti D, Lise M, Fassina G - **Detection of circulating CEA-IgM complexes in early stage colorectal cancer.** Int J Biol Markers, 2005, 20: 204-8.
6. Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegnù L, Calabrese F, Gatta A, Pontisso P, Fassina G -**Squamous cell carcinoma antigen-IgM complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma.** Cancer, 2005, 103: 2558-65.
7. Beneduce L, Prayer-Galetti T, Marcello Grimani Giustinian A, Gallotta A, Betto G, Pagano F, Fassina G - **Detection of prostate-specific antigen coupled to immunoglobulin M in prostate cancer patients.** Cancer Detect Prev, 2007, 31: 402-7.
8. Leite KR, Mitteldorf CA, Camara-Lopes LH - **Repeat prostate biopsies following diagnoses of prostate intraepithelial neoplasia and atypical small gland proliferation.** Int Braz J Urol, 2005, 31:131-6.
9. Leite KR, Camara-Lopes LH, Cury J, Dall'oglio MF, Sañudo A, Srougi M - **Prostate cancer detection at rebiopsy after an initial benign diagnosis: results using sextant extended prostate biopsy.** Clinics (Sao Paulo), 2008, 63:339-42.
10. Bostwick DG, Meiers I. **Atypical small acinar proliferation in the prostate: clinical significance in 2006.** Arch Pathol Lab Med, 2006, 130: 952-7.
11. Heidenreich A, Bolla M, Joniau S, van der Kwast TH, Matveev V, Mason MD, Mottet N, Schmid H-P, Wiegel T, Zattoni F - **Guidelines on Prostate Cancer.** European Association of Urology, 2009.
12. Gruppo Italiano Biopsia Prostatica. **Linee Guida sulla Biopsia Prostatica.** Edizioni Scripta Manent, 2005
13. Djavan B, Waldert M, Zlotta A, Dobronski P, Seitz C, Remzi M, Borkowski A, Schulman C, Marberger M. **Safety and morbidity of first and repeat transrectal ultrasound guided prostate needle biopsies: results of a prospective European prostate cancer detection study.** J Urol, 2001, 166: 856-60.

Fig. 1: Esempio di Scheda CRF per la raccolta dati

Accuratezza del marcatore sierico PSA-IgM nella diagnosi del carcinoma prostatico in stadio precoce

## SCHEDA CRF

Data arruolamento.....

### Dati personali

Data di Nascita		Età	
Etnia			
Codice Paziente			
Centro di Provenienza			
Responsabile Clinico			

### Dati clinici

Familiarità	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Flogosi clinica	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Volume ghiandolare (ml)		
Volume zona transizione(ml)		
Nodulo ecografico	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
PSA (ng/mL)	F/T PSA (%)	
PSA Density		
PSA velocity (ng/mL/anno)		
PSA-IgM (AU/mL) <b>v.n. ≤ 145.1</b>		
DRE	<input type="checkbox"/> Positiva	<input type="checkbox"/> Negativa

### *Criteri di esclusione*

Terapia cortisonica o immunosoppressiva in atto	🍏 SI	🍏 NO
Mal. Autoimmuni	🍏 SI	🍏 NO
Altre neoplasie in atto	🍏 SI	🍏 NO
Terapia con 5ARI	🍏 SI	🍏 NO
Infezione in atto	🍏 SI	🍏 NO

### *Dati istologici*

<i>Data Biopsia I</i>	
<i>Biopsia (tecnica usata)</i>	
<b>Diagnosi</b>	
<i>Data Biopsia II</i>	
<b>Diagnosi</b>	
Flogosi istologica	
PIN o ASAP	
Grado di Gleason	
Punteggio TNM	Percentuale tumore