

Un nuovo test per la determinazione di un precursore del PSA può migliorare la specificità del PSA totale: il dosaggio Access[®] Hybritech[®] p2PSA

Maria Chiara Anelli

Scientific Project Leader, Beckman Coulter Italia, Milano

INTRODUZIONE

La misurazione nel siero del PSA è ampiamente utilizzata per lo screening e la determinazione precoce del cancro alla prostata (PCa)¹. Il PSA è altamente compartimentalizzato all'interno della ghiandola prostatica normale, che contiene livelli di PSA approssimativamente un milione di volte più alti rispetto al siero. In uomini con malattia prostatica viene rilasciato nel circolo sanguigno un livello maggiore di PSA, generando quindi livelli maggiori di PSA circolante. Il PSA che viene misurato dai dosaggi attualmente in commercio comprende sia le forme libere o non complessate (fPSA), che quelle legate in un complesso con l'alpha-1-antichimotripsina (ACT) e dette PSA complessate (cPSA), che rappresenta dal 70 al 95% del PSA totale (tPSA) misurabile nel siero. Il PSA forma complessi anche con l'alpha-2-macroglobulina, ma questa forma non è rivelabile dagli immunodosaggi, perchè la proteina avvolge completamente il PSA, mascherando tutti i siti di attacco per gli anticorpi monoclonali (Fig. 1). Le forme libere di PSA possono includere PSA maturi, inattivi e varie forme di PSA diversamente legati, così come precursori o zimogeni²⁻⁵.

In pazienti con tPSA moderatamente elevato, soprattutto tra 4 e 10 ng/mL, il rapporto percentuale tra il fPSA e il tPSA nel siero (f/tPSA) si è dimostrato migliorare significativamente la discriminazione tra PCa e ipertrofia prostatica benigna (BPH), con rapporti più elevati correlanti con un basso rischio di PCa, mentre valori di f/tPSA al di sotto del 10% sono altamente associati a PCa^{6,7}.

RAZIONALE PER LA DETERMINAZIONE DI NUOVE FORME DI PSA

Il tPSA è caratterizzato da una ridotta specificità per l'identificazione precoce del PCa a concentrazioni inferiori a 10 ng/mL, perchè anche i pazienti con BPH o con patologie infiammatorie della ghiandola prostatica (prostatiti) possono presentare valori sovrapponibili. Si è stimato che il 30-45% degli uomini con tPSA tra 4 e 10 ng/mL e il 20-30% di quelli con tPSA tra 2 e 4 ng/mL sono portatori di un PCa. L'utilizzo del f/tPSA è meno efficace dell'atteso nel discriminare tra cancro e malattia benigna, soprattutto nell'intervallo di tPSA tra 2 e 4 ng/mL⁸⁻⁹. Nell'analisi dei dati relativi a sette centri europei che hanno partecipato allo studio randomizzato europeo per lo screening del PCa (*European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*, ERSPC), la effettuazione dello screening effettuato utilizzando il tPSA è stato associato a una riduzione assoluta significativa dello 0,7% delle morti per PCa dopo un follow-up medio di 8,8 anni; il tasso di morte per PCa

negli uomini con età compresa tra 55 e 69 anni all'ingresso allo studio corrisponde a una riduzione relativa del 20%. Per riuscire a prevenire un decesso per PCa, dovremmo sottoporre al test di screening 1410 uomini (in realtà 1068 soggetti tenendo conto del tasso di adesione al programma proposto) e di questi 48 dovrebbero essere sottoposti a trattamento. L'elevato numero di individui che avrebbero necessità di essere trattati potrebbe essere ridotto se si riuscissero ad evitare la diagnosi e soprattutto il trattamento dei cosiddetti "cancro indolenti". Il tasso di sovra diagnosi del PCa, definito come la diagnosi in uomini che non avrebbero sintomi clinici nell'arco della vita residua, nel gruppo di screening dell'ERSPC è stato stimato essere superiore al 50%¹⁰.

I più importanti effetti negativi dello screening per PCa sono la sovra diagnosi ed il conseguente eccesso di trattamento; è quindi molto chiaro che i clinici hanno bisogno di un test con una migliore specificità diagnostica da utilizzare per la gestione quotidiana del paziente, indipendentemente dall'adozione di un eventuale programma di screening.

LE ISOFORME DEL PSA

I precursori del PSA libero, ricompresi nel termine proPSA, sono associati al tessuto canceroso prostatico e aumentano nel siero dei pazienti con PCa. Esistono forme di proPSA costituite da peptidi nativi tronchi che contengono 2, 4 o 5 amino acidi identificati rispettivamente con i termini [-2]proPSA, [-4]proPSA, e [-5]proPSA, e il peptide nativo di 7 amino acidi, [-7]proPSA¹¹. Esiste anche un'altra isoforma del PSA libero, chiamata PSA benigno (*benign-PSA*, BPSA), la cui concentrazione, confrontata con quella presente nel tessuto della zona periferica della ghiandola, è aumentata nel tessuto della zona di transizione con BPH nodulare¹²⁻¹⁴.

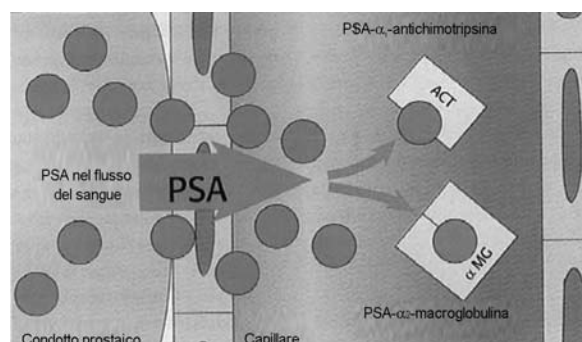


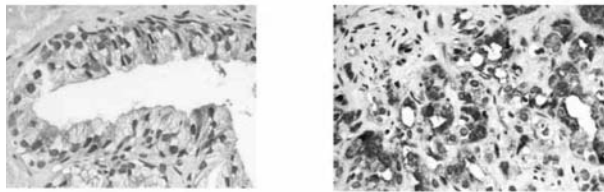
Figure 1
Forme circolanti di PSA

L'isoforma [-2]proPSA è quella che ha ricevuto le maggiori attenzioni da quando è stata trovata in estratti tumorali, e mostra la più intensa colorazione istologica nel PCa rispetto al tessuto benigno (Fig. 2). In vitro, inoltre, il [-2]proPSA è la più stabile delle cinque forme identificate di proPSA¹⁵⁻¹⁸.

IL DOSAGGIO DEL [-2]proPSA: IL TEST ACCESS HYBRITECH p2PSA

Beckman Coulter Inc. ha sviluppato in un primo tempo un metodo ELISA semi automatico, e recentemente il dosaggio Access Hybritech p2PSA^a (p2PSA), per misurare il [-2]proPSA nel siero. In uno studio su uomini con PCa confermato da biopsia, pubblicato da Steven Mikolajczyk nel 2004, si è evidenziato che il [-2]proPSA migliora la specificità per il rilevamento del cancro nell'intervallo di tPSA tra 4 e 10 ng/mL, rispetto al solo f/tPSA¹⁹. L'utilità del [-2]proPSA in uomini con valori di tPSA inferiori a 4.0 ng/mL è di particolare interesse da quando si sono trovati molti pazienti portatori di PCa con questi valori, e anche questo dato è stato recentemente confermato dallo studio "National Cancer Institute Early Detection Research Network Validation Study" pubblicato da Lori Sokoll nel 2008²⁰.

Il test automatizzato p2PSA è un dosaggio immunoenzimatico di tipo *sandwich* a due siti, che impiega anticorpi monoclonali di topo anti-PSA coniugati alla fosfatasi alcalina, particelle paramagnetiche rivestite con un anticorpo monoclonale di topo anti [-2]proPSA, e un agente bloccante. Il [-2]proPSA nel campione si lega all'anticorpo monoclonale anti[-2]proPSA immobilizzato, mentre l'anticorpo monoclonale coniugato anti-PSA-fosfatasi alcalina si lega a differenti epitopi sulla molecola del [-2]proPSA. Dopo incubazione in una cuvetta di reazione, le componenti legate alla fase solida sono trattate tramite l'azione di un campo magnetico, mentre le componenti non legate sono eliminate tramite lavaggio. Infine, viene aggiunto alla cuvetta di reazione il substrato chemiluminescente LumiPhos 530 e si genera un segnale luminoso direttamente proporzionale alla concentrazione di [-2]proPSA del campione. La concentrazione di analita nel campione è determinata utilizzando come riferimento una curva di calibra-



Indagini eseguite presso: Bostwick Laboratories, Glen Allen, Virginia, USA; l'anticorpo monoclonale anti[-2]proPSA utilizzato per la colorazione immunohistochemica è lo stesso impiegato nel dosaggio Access Hybritech p2PSA per la quantificazione del [-2]proPSA nel siero.

Figura 2

Rilevazione immunohistochemica con anticorpi monoclonali anti [-2]proPSA su tessuto normale (A) e su tessuto da carcinoma della prostata con indice di Gleason 7 (4+3)

zione a sette punti (concentrazioni indicative: 0, 10, 20, 50, 100, 500, e 5000 pg/mL); i parametri della calibrazione sono stabili fino a 28 giorni.

Il *Limit of Blank* (LoB), valore più alto atteso dal campione in cui non è presente l'analita, per p2PSA è stato verificato sperimentalmente secondo il protocollo EP17-A del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*). Si sono utilizzati 148 replicati di un campione senza analita (calibratore Access Hybritech p2PSA a 0 pg/mL) determinati in 12 sedute diverse, ed è stato calcolato il 95° percentile con approccio non parametrico; il limite superiore di confidenza di questo calcolo è stato definito come LoB ed è risultato di 0,50 pg/mL²¹.

Il *Limit of Quantitation* (LoQ), la quantità più bassa dell'analita nel campione che può essere determinata quantitativamente secondo criteri definiti per precisione e accuratezza, ovvero la minima concentrazione dell'analita alla quale l'errore totale corrisponde alle esigenze di precisione accettabili per l'uso clinico stabilite dal laboratorio, per p2PSA è stato verificato sperimentalmente secondo lo stesso protocollo EP17-A ed è risultato pari a 3,23 pg/mL (limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95%). Per la determinazione del LoQ sono stati dosati 60 replicati di sette campioni (per un totale di 420 determinazioni); la media e il CV% totale di ciascun campione sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica e si è impiegata una regressione polinomiale per individuare la miglior retta di regressione da cui si sono ricavati la più bassa concentrazione di [-2]proPSA con un CV del 20% ed il relativo intervallo di confidenza al 95%.

Il test p2PSA presenta un'imprecisione totale < 20% a concentrazioni di [-2]proPSA compresi tra il LoQ di 3.23 pg/mL ed i 10 pg/mL ed una imprecisione ≤ 10% a concentrazioni di [-2]proPSA ≥ 10 pg/mL. E' anche disponibile materiale per il controllo di qualità interno dedicato, a tre diversi livelli di concentrazione (approssimativamente a 20, 175 e 1000 pg/mL). E' stata studiata la reattività crociata con una miscela di altre isoforme di PSA (PSA-ACT, fPSA, [-4]proPSA, [-5/-7]proPSA, e BPSA) le cui proporzioni sono riportate in letteratura, che è risultata essere ≤ al 5%.

I campioni di siero contenenti concentrazioni di emoglobina fino a 500 mg/dL, bilirubina fino a 20 mg/dL, trigliceridi fino a 1500 mg/dL e proteine totali fino a 6.2 g/dL non presentano interferenze con il dosaggio p2PSA.

I risultati pubblicati in letteratura supportano la conclusione che i precursori del fPSA stiano emergendo come marcatori serici diagnostici potenzialmente importanti per incrementare la specificità del tPSA e migliorare l'identificazione del PCa²².

phi: Prostate Health Index

Il dosaggio Hybritech p2PSA, se confrontato come combinazione di p2PSA e fPSA e/o tPSA, ed espressa come percentuale di p2PSA (%p2PSA) calcolata dalla relazione: $p2PSA/PSA \text{ libero} \times 100$, non ha dimostrato prestazioni migliori rispetto al suo utilizzo come unico marcatore. Per migliorare ulteriormente la prestazione clinica, il tPSA può essere aggiunto al calcolo per ottenere il *Prostate Health Index* (*phi*). Il *phi* è calcolato secondo la

^anon disponibile negli Stati Uniti.

relazione:

$$phi = (p2PSA/fPSA) * \sqrt{tPSA}.$$

L'indice *phi* viene calcolato automaticamente dagli analizzatori Access2 e Dxl. I risultati riportati in letteratura concordano con la destinazione d'uso dell'inserito di prodotto del dosaggio Access Hybritech p2PSA, che recita che il dosaggio deve essere utilizzato esclusivamente insieme a quelli Access Hybritech tPSA e fPSA, per calcolare l'indice Beckman Coulter *phi*, per l'ulteriore valutazione di soggetti con livelli di tPSA nell'intervallo di concentrazioni tra 2,0 e 10,0 ng/mL.

I valori di *phi* hanno migliorato significativamente la specificità clinica relativa del tPSA e del f/tPSA per l'identificazione del PCa²³. Al 95% di sensibilità clinica, la specificità clinica del *phi* per valori di PSA totale compresi tra 2 e 10 ng/mL è del 18,2%, mentre quella del f/tPSA è del 6,6% (Tab. 1). Il miglioramento della specificità clinica del *phi* nei confronti del f/tPSA rappresenta un sostanziale avanzamento nelle indagini eseguite con l'intento di aiutare a distinguere il PCa dalle condizioni prostatiche benigne in uomini con età uguale o superiore a 50 anni, tPSA tra 2,0 e 10,0 ng/mL, e conclusioni dell'esplorazione digito-rettale (DRE, *Digital Rectal Examination*) che siano non sospette per neoplasia.

Le concentrazioni di tPSA e fPSA in un dato campione determinate con dosaggi di produttori differenti possono variare in base alle differenze tra metodi e alle specificità

dei reagenti. I risultati refertati dal laboratorio al clinico dovrebbero specificare di quale produttore sono i dosaggi utilizzati per tPSA e fPSA. I valori ottenuti con dosaggi di produttori differenti non possono essere utilizzati indifferente, perchè le concentrazioni di tPSA e fPSA dipendono dallo standard utilizzato per calibrare i dosaggi: le concentrazioni di tPSA e fPSA ottenute in base alle preparazioni di riferimento WHO 96/670 (tPSA) o WHO 96/668 (fPSA) sono differenti in maniera significativa da quelle generate dai dosaggi calibrati secondo lo standard Hybritech Tandem™-R originale. Così, poiché le concentrazioni non sono intercambiabili, se la calibrazione viene modificata la buona prassi di laboratorio prevede che si stabiliscano nuovi intervalli di riferimento per il monitoraggio dei pazienti²⁴⁻²⁵. Queste considerazioni fanno chiaramente capire come sia impossibile calcolare il *phi* utilizzando valori di tPSA e fPSA generati con dosaggi diversi da quelli ottenuti sui sistemi Beckman Coulter.

Un'importante implicazione dell'incrementata specificità osservata per la %proPSA e per l'indice *phi* nell'identificazione del PCa è la riduzione del numero di biopsie non necessarie.

Nel 2010, due pubblicazioni documentano l'applicazione del *phi* in un contesto clinico. Sul *Journal of Urology*, Le e collaboratori illustrano i risultati di uno studio prospettico di screening per il PCa su una popolazione di 2.034 uomini: a 322 uomini con tPSA ≥ 2,5 ng/ml o DRE sospetta è stata raccomandata la biopsia, e al momento della pubblicazione 74 di loro (23%) risultano aver accettato l'indica-

Tabella 1

Risultati di uno studio multicentrico per la valutazione di sensibilità e specificità cliniche nell'identificazione di PCa confermati con biopsia prostatica

Sensibilità clinica (%)	Indice <i>phi</i> (cut-off)	Specificità clinica (%)
99	17,78	8,7
98	18,44	10,5
95	21,13	18,2
90	23,82	30,4
88	25,00	33,6
85	26,34	38,8
80	27,58	45,1
75	29,25	49,3
70	30,44	54,2
65	31,69	58,0
60	33,98	66,1
55	36,22	72,7
50	37,63	75,2
45	39,34	80,1
40	42,14	84,6
35	45,11	88,1
30	47,64	90,2
25	50,01	92,0
20	55,08	94,4
15	59,20	95,5
10	68,00	96,9
5	87,23	99,3

Hanno partecipato allo studio 519 uomini di età compresa tra 50 e 84 anni (233 con PCa e 286 senza PCa). I valori di sensibilità e specificità clinica si riferiscono a diversi cut-off dell'indice *phi* Beckman Coulter ottenuto utilizzando valori di tPSA compresi tra 2 e 10 ng/mL e valori di fPSA calibrati secondo i relativi standard Hybritech

zione; tra questi, 63 avevano un tPSA compreso tra 2.5 e 10 ng/mL e DRE non sospetta. Nell'analisi delle curve ROC ed utilizzando come parametro di valutazione l'area sottesa dalla curva ROC (AUC), la %p2PSA (AUC = 0,76) ha avuto prestazioni superiori al tPSA (AUC = 0,50) e al f/tPSA (AUC = 0,68) nel differenziare tra PCa e malattia benigna. Fissando la sensibilità all'88.5%, il p2PSA porta a un sostanziale miglioramento di specificità, e di valore predittivo sia positivo che negativo, e il *phi* (AUC = 0,77) ha le migliori prestazioni rispetto a tutti i parametri studiati²⁶.

In un ulteriore studio pubblicato da Jansen e collaboratori su *European Urology*, sono stati presi in esame 405 campioni di siero provenienti dal braccio di Rotterdam dello studio ERSPC e 351 campioni provenienti dal Dipartimento di Urologia della Facoltà di Medicina dell'Università di Innsbruck. I livelli di p2PSA e *phi* sono risultati significativamente differenti nei soggetti con e senza PCa, e il più alto valore predittivo per PCa in entrambe le popolazioni è stato raggiunto dal *phi* con AUC rispettivamente di 0,750 e 0,709 nel primo e nel secondo centro; se confrontato con il tPSA (AUC = 0,585 e 0,534 nei due centri) e il f/tPSA (AUC = 0,675 e 0,576 per i due centri) si tratta di un aumento significativo; inoltre, al 95% e al 90% di sensibilità, le specificità del *phi* sono risultate del 23% e 31%, mentre per il tPSA erano rispettivamente del 10% e 8%²⁷.

Ridurre le biopsie non necessarie significa anche essere in grado di identificare prima possibile l'aggressività del PCa: p2PSA, %p2PSA e *phi* sono stati studiati fin dall'inizio anche da questo punto di vista.

In un articolo del 2009 su *The Prostate*, Stephan ha riportato i dati relativi ad uno studio su 586 pazienti, 311 dei quali avevano una diagnosi di PCa, mostrando che la %p2PSA e il rapporto p2PSA/(f/tPSA) hanno i valori con la migliore significatività ($P < 0,0001-0,015$). Quando l'autore confronta i PCa con il punteggio di Gleason rispettivamente < 7 e > 7 , la %p2PSA e il rapporto p2PSA/(f/tPSA) mostrano la loro superiorità nell'identificare in modo preferenziale i PCa aggressivi ($P < 0,0001-0,0008$)²⁸.

Uno studio eseguito su 566 soggetti, 245 dei quali con PCa, pubblicato nel 2010 da Sokoll e collaboratori su *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, caratterizza l'utilità clinica del [-2]proPSA serico per il PCa e la sua associazione con l'aggressività dello stesso. L'aggressività è stata studiata confrontando il [-2]proPSA e la %[-2]proPSA con il punteggio di Gleason: sia il [-2]proPSA che la %[-2]proPSA aumentano all'aumentare del punteggio di Gleason ($P < 0,001$)²⁹.

Il test p2PSA ha costantemente mostrato risultati promettenti, entusiasmando i clinici, che sono alla ricerca di un'aumentata specificità del tPSA per poter evitare biopsie che risulterebbero negative per tumore della prostata.

BIBLIOGRAFIA

1. **Kawachi MH, Bahnson RR, Barry M, et al.** National Comprehensive Cancer Network. Prostate cancer early detection. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2007; 5:714-36
2. **Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM.** Purification of human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979; 17: 159-63
3. **Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, et al.** A complex between prostate specific antigen and α 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: 222-6
4. **Christenson A, Bjork T, Nilsson O, et al.** Serum prostate specific antigen complexed to alpha-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* 1993; 150: 100-5
5. **Khan AR, James MNG.** Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 1998; 7: 815-36
6. **Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, et al.** Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA* 1995; 274: 1214-20
7. **Catalona WJ, Southwick PC, Slawin KM, et al.** Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology* 2000; 56: 255-60
8. **Berger AP, Deibl M, Steiner H, et al.** Longitudinal PSA changes in men with and without prostate cancer: assessment of prostate cancer risk. *Prostate* 2005; 64:240-5
9. **Bryant RJ, Hamdy FC.** Screening for prostate cancer: an update. *Eur Urol.* 2008 Jan;53(1):37-44.
10. **Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al.** Screening and prostate cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009; 360:1320-8
11. **Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, et al.** Identification of precursor forms of prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Res* 2001; 61: 957-62
12. **De Vries SH, Raaijmakers R, Blijenberg BG, et al.** Additional use of [-2] precursor prostate-specific antigen and "benign" PSA at diagnosis in screen-detected prostate cancer. *Urology* 2005; 65: 926-30
13. **Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, et al.** "BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2000; 55: 41-5
14. **Canto EI, Singh H, Shariat SF, et al.** Serum BPSA outperforms both total PSA and free PSA as a predictor of prostatic enlargement in men without prostate cancer. *Urology* 2004; 63:905-10, discussion 910-1
15. **Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, et al.** A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000; 60: 756-9
16. **Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, et al.** A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a

- more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 6958-63
17. **Chan TY, Mikolajczyk SD, Lecksell K, et al.** Immunohistochemical staining of prostate cancer with monoclonal antibodies to the precursor of prostate-specific antigen. *Urology* 2003; 62: 177-81
 18. **Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, et al.** Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. *J Urol* 2003;170:2181-5
 19. **Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, et al.** Proenzyme forms of prostate specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem* 2004; 50: 1017-25
 20. **Sokoll LJ, Wang Y, Feng Z, et al.** [-2]proenzyme prostate specific antigen for prostate cancer detection: a national cancer institute early detection research network validation study. *J Urol* 2008;180:539-43
 21. **Tholen DW, Linnet K, Kondratovich M, et al.** Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. 2nd ed. NCCLS publication EP17-A. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004; vol. 24, n.34
 22. **Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, et al.** Serum pro-prostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 to 4 ng/ml prostate specific antigen. *J Urol* 2004;171:2239-44
 23. Access Hybritech p2PSA Instruction for Use, Beckman Coulter Inc, WBA80984B, 2009.
 24. **Stephan C, Köpke T, Semjonow A, et al.** Discordant total and free prostate-specific antigen (PSA) assays: does calibration with WHO reference materials diminish the problem? *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47:1325-31
 25. **Stephan C, Bangma C, Vignati G, et al.** 20-25% lower concentrations of total and free prostate-specific antigen (PSA) after calibration of PSA assays to the WHO reference materials--analysis of 1098 patients in four centers. *Int J Biol Markers.* 2009; 24: 65-9
 26. **Brian V. Le, Christopher R. Griffin, et al.** [-2]Proenzyme Prostate Specific Antigen is More Accurate Than Total and Free Prostate Specific Antigen in Differentiating Prostate Cancer From Benign Disease in a Prospective Prostate Cancer Screening Study. *J Urol.* 2010; 183:1355-9
 27. **Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjens J, et al.** Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA in Combination with Total PSA and Free PSA Improves Diagnostic Accuracy in Prostate Cancer Detection, *Eur Urol* (2010); 57(6): e53-e68
 28. **Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, et al.** A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. *Prostate* 2009; 69:198- 207
 29. **Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, et al.** A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19:1193-200

Per corrispondenza:

Dott.ssa Maria Chiara Anelli
Scientific Advisor
Beckman Coulter Italia
Centro Direzionale Cassina Plaza, Palazzo F1
Via Roma 108 - 20060 Cassina dè Pecchi (MI)
Tel.: 0295392296- Fax: 029516640
e-mail: mcanelli@beckmancoulter.com