ORIGINAL ARTICLE

Korean J Clin Lab Sci. 2013, 45(1):5-8
ISSN 1738-3544

KJCLS
KOREAN JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY SCIENCE

The Study of Evaluation for Stability of Serum Free PSA *In Vitro*

Jum Gi Park[1] and Kyung Woong Joo[2]

[1]Department of Laboratory Medicine, Daejeon Veterans Hospital, Daejeon 306-830, Korea
[2]Department of Clinical Laboratory Science, Gwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea

In the specimen of free PSA in the low concentration, the result in % bias from our institution and comparable evaluation institution was −33.7% which is exceeded % bias ±20% ; however, it was the domestically allowable limit recommended by the laboratory accreditation commission for specimen at the low concentration. In this paper, the cause was accredited by instability of free PSA substance within the specimen, and the specimen stability test was performed according to CLSI documents GP29-A2. After the low and high concentration specimen were made, and rapidly cooled down in a deep freezer with −30°C, serum of two concentrations was measured for 10 consecutive days with 3 times a day by Architect i2000 and observed a change in the mean value. As the results of two groups, there were changes in the established target value, and a change level was evaluated by calculating it with % bias. The low concentration specimen had no significant reduction until the 4 day lapse in cold storage. However, % bias were reduced by −17.5% from the 5 day lapse, by 21.5% after the 7 day lapse, and by −26.9% after the 9 day lapse. The frozen specimen had only intra-day variation for 10 days. In the high concentration specimen, bias began to show as −12.2% from the 3 day lapse in cold storage. There was reduction by −28.9% from the 5 day lapse, by −39% after the 7 day lapse, and by −42.9% after the 9 day lapse. In the frozen specimen, there was only intra-day variation like the low concentration specimen in cold storage.

Keywords: Free PSA, % Bias, CLSI GP29-A2, Architect i2000

Corresponding author: Jum Gi Park
Department of Laboratory Medicine, Daejeon Veterans Hospital, Daejeon 306-830, Korea.
Tel: 82-42-939-0405
E-mail: jumgipark@hanmail.net

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 Korean Society of Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: October 26, 2012
Revised: December 5, 2012
Accepted: March 13, 2013

서 론

대한진단검사의학회(2010)의 검사실 신임인증 심사점검표 문항 50.101.200에서는 원내 검사 종목 중 외부정도관리 프로그램에 참여하지 않는 종목은 검사실간 상호 비교 평가를 하도록 규정되어 있으며 대부분의 기관에서 이를 준수하고 있다. 본 연구에서는 검사실간 상호 비교 평가를 수행하고 평가하는 과정에서 저농도 free PSA (Prostate-specific antigen) 검체에서 본원과 비교 평가 기관과 평가한 결과가 검사실 신임위원회에서 권고하는 저농도 검체 국내 허용기준인 % bias ±20%를 초과한 -33.7%의 결과를 보여 그 원인을 규명하기 위하여 장비, 검량물질과 시약, 검체에 대하여 오차의 원인을 검토하였다. 원인은 당일 검사 이후에 혈청분리된 검체 의 보관 온도에 따른 시험관 내 혈청 free PSA 물질의 불안정으로 판단되어 신빙도조사가 불가능한 검사항목의 평가에 대해 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) GP29-A2 권고안에 따라 시험관 내 free PSA의 안정성에 대한 평가를 실시하였다. 평가 결과 냉동 보관 검체가 냉장 보관 검체에 비하여 보다 높은 안정성이 유지되어 환자의 실질적인 free PSA 상태가 반영될 수 있다는 실험 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

평가에 사용된 풀혈청의 제조는 2012년 2월부터 6월까지 본원에 면역 혈청검사를 의뢰한 환자의 검체를 진공 혈청 분리관에 채혈하고 충분히 응고된 검체를 최대 1시간 이내에 1500×g에서 10분간 원심하여 혈청 분리를 한 후 검체를 저농도 검체와 고농도 검체로 따로 구분하여 -30°C 냉동고에 급속 냉동 보관했다. 모아진 두 농도의 혈청은 실온에서 용해 후 교반기로 10분간 진탕 혼합하

고 1500×g에서 30분간 재원심한 후 상청액을 시험관에 저농도와 고농도의 등분체 시료로 만들어 각각 냉장(2~8°C)과 냉동(-18~-20°C) 두 그룹의 검체로 구분하여 보관하고, 보관 1일차에 일내측정으로 20회 연속 검사하여 평균, 표준편차, 변이계수를 구하여 참고 목표치로 설정하였다. 두 그룹의 검체는 우연오차를 최소화하기 위하여 1일 3회씩 10일간 연속해서 측정하고 설정된 참고 목표치에서 변화되는 두 그룹의 결과는 % bias를 계산하여 변화 정도를 평가하였다. Free PSA 측정은 Architect i2000 (Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA)을 이용하였으며 동일 Lot의 Architect 전용시약(Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA)을 사용하여 Lot 간 변이(Lot No 11503 LF00)를 배제하였다.

결 과

일내측정으로 20회 연속 검사한 참고 목표치 결과는 저농도 검체에서 평균 0.446 ng/mL, 표준편차 ±0.02, 변이계수 4.5%였으며 고농도 검체는 평균 21.817 ng/mL, 표준 편차 ±0.53, 변이계수 2.4%였다. 보관 2일 후부터는 저농도 검체와 고농도 검체를 각각 냉장과 냉동 두 그룹의 검체로 구분하여 보관된 검체를 1일 3회씩 10일간 연속해서 측정한 결과, 참고 목표치에서 1일 경과 후부터 냉장과 냉동 보관 검체 모두 감소하는 경향이 있었다. 저농도 검체는 냉장보관 4일이 경과 할 때까지는 유의한 감소는 없었지만 5일 경과 후부터는 당일 측정된 참고 목표치에서 -17.5%, 7일 경과 후 -21.5%, 9일 경과 후에는 -26.9%의 감소가 있었으며 냉동 보관 검체에서는 10일간 일내 변이 수준 이내의 감소만 있었고 고농도 냉장보관검체에서는 3일 경과 후부터 저농도 냉장검체와 유사한 -12.2%의 감소를 보이기 시작하여 5일 경과 후 부터는 -28.9%, 7일 경과 후 -39%, 9일 경과 후에는 -42.9%의 감소가 있었다. 냉동 검체에서는 저농도 냉동 보관 검체와 같은 일내 변이 수준 이내의 감소만 있었다(Table 1).

고 찰

Wang 등(1979), Papsidero 등(1981), Qiu 등(1996)은 PSA는 chymotrypsin과 같은 활성도를 갖는 약 30,000달톤 정도의 세린 단백효소이며, 성숙한 PSA는 237개의 아미노산으로 7~8% 탄수화물을 포함하는 단일 사슬 당단백으로 구성되어 있다고 하였다. Lilja 등(1987)은 PSA가 주로 전립선의 상피세포에서 생성되며 많은 양을 정액 내에 분비되며 정액에서 겔상태의 단백질을 분해하여 액상으로 만듦으로써 정자의 운동성을 증가시킨다고 하였다. Stenman 등(1991) 및 Michael (2011)은 PSA가 혈액 및 소변에서도 존재하며 전립선에서 PSA가 누출될 경우 혈액 속의 PSA 수치는 낮게 나타나지만 전립선염, 양성 전립선비대, 전립선 암일 경우에는 수치가 증가한다고 하였다. PSA는 혈액 속에서 주로 3가지 형태로 존재하는데 주로 면역측정 가능한 세린 단백효소 억제제가 있으며, 결합 복합체인 PSA-ACT (prostate specific antigen-α1-antichymotrypsin)와 어느 것과도 결합하지 않는 free PSA이다. Christensson 등(1990) 및 Stenman 등(1991)은 혈청 내의 대부분의 free PSA는 단백효소 억제제와 결합할 수 없는 비활성 형태 및 PSA zymogen 또는 분해된 PSA 형태, 그리고 A2M (α2-macroglobulin)와 결합한 형태로 A2M에 의해서 PSA 항원결정기가 탐식되어 연속적으로 가려지기 때문에 기존의 면역분석법으로는 검출되지 않는다고 하였다.

외부정도관리 프로그램에 참가하지 않는 종목은 검사실간 상호비교 평가를 실시하여야 하고 검사 결과가 허용범위를 벗어날 경우에는 첫째, 한 검사실 혹은 두 검사실 모두에서 재검을 실시하거나, 둘째, 둘 중 어느 한 검사실의 결과를 참고치로 간주할 것인지의 여

Table 1. Stability of free PSA in serums at 2~8°C and -18~-20°C

	2~8°C				-18~-20°C			
	Low		High		Low		High	
	ng/mL	% bias	ng/mL	% bias	ng/mL	% bias	ng/mL	% bias
1 day	0.446	0.0	21.820	0.0	0.446	0.0	21.820	0.0
2 days	0.428	-4.0	20.542	-5.9	0.434	-2.7	20.714	-5.1
3 days	0.435	-2.5	20.154	-7.6	0.429	-3.8	21.432	-1.8
4 days	0.425	-4.7	19.153	-12.2	0.436	-2.2	20.670	-5.3
5 days	0.416	-6.7	18.742	-14.1	0.417	-6.5	21.681	-0.6
6 days	0.368	-17.5	15.520	-28.9	0.436	-2.2	20.603	-5.6
7 days	0.347	-22.5	14.911	-31.7	0.438	-1.8	20.184	-7.5
8 days	0.350	-21.5	13.304	-39.0	0.440	-1.3	21.192	-2.9
9 days	0.333	-25.3	12.691	-41.8	0.422	-5.4	21.234	-2.7
10 days	0.326	-26.9	12.453	-42.9	0.430	-3.6	20.063	-8.1

부를 결정하거나, 셋째, 제 3의 검사실에 검증을 요청할지 여부를 결정하도록 CLSI GP29-A2에서 권고하고 있다.

Catalona 등(1993)은 total PSA와 free PSA 농도 비교를 통해 결정된 퍼센트 비율을 전립선암 환자와 BPH (benign prostatic hyperplasia) 환자의 감별을 향상시키기 위해 제안되었으며, 특히 혈청 total PSA 수치가 중간을 보이는 남성에서 유용하게 사용되고 있다. Leinonen 등(1993), Stenman 등(1994)에 의하면 free PSA가 total PSA에 비해 불안정하므로 free PSA 검체는 채취 후 3시간 내에 혈청을 분리해야 하며, 2~8°C에서 24시간까지만 보관가능하고 24시간 이후에는 -20°C 냉동보관하도록 되어있다. 또한 검체를 반복적으로 동결하고 해동을 시키지 않도록 해야 하며 검체를 해동한 후에는 교반기를 사용하여 충분히 잘 섞은 다음 검사해야 한다고 기술되어 있다. Leinonen 등(1993)은 당일 검사를 실시하지 않은 경우 free PSA가 낮아진다고 설명되어 있을 뿐 정량적으로 어느 정도 농도로 낮아진다는 설명은 없었는데 이는 각 검사실에서 자체적으로 평가하도록 하기 위함으로 생각된다. Kumari와 Malati (2004)는 검체 분리 후 4°C 냉장에서 1일부터 4일까지는 유의한 변화를 보이지 않으나 5일 경과 후부터 감소하기 시작하여 12일째에는 정상농도에서는 57%의 감소를, 중간농도에서는 67%의 감소를 보이고 고농도에서는 44%가 감소하며, 냉동(-8~-10°C)에서는 농도 변화가 없다는 발표가 있었다. Jung 등(2000)은 4°C 냉장에서 1일 경과 후에 6%, 4일 경과 후에 20%, 7일 경과 후에 40%의 감소가 있었지만, -80°C 냉동에서는 2개월간 평가한 결과 농도 변화는 없다고 발표했고, Woodrum 등(1996)은 4°C 냉장에서 2일 경과 후에 7.5%, 4일 경과 후에 12.3%, 7일 경과 후에는 38.8%의 감소가 있었지만, -20°C 냉동검체에서는 농도 변화는 없었다는 발표를 했다. 본 연구에서는 냉장보관 저농도 검체는 4일이 경과할 때까지는 유의한 감소는 없었으나, 5일 경과 후부터는 당일 측정된 참고 목표치에서 -17.5%, 7일 경과 후 -21.5%, 9일 경과 후에는 -26.9%의 감소가 있었지만, 냉동 검체에서는 10일간 일내변이수준 이내의 감소만 있었다. 고농도 냉장검체에서는 3일 경과 후부터 저농도 냉장검체와 유사한 -12.2%를 보이기 시작하여 5일 경과 후 -28.9%, 7일 경과 후 -39%, 9일 경과 후에는 -42.9%의 감소가 있었으며, 냉동 검체에서는 저농도 냉동 보관 검체와 같은 일내변이수준 이내의 감소만 있었다. 평가 방법에는 Kumari와 Malati (2004)는 % decrease와 % recovery로 평가하였고, 문 등(2012)은 % relative error를 사용하기도 하였으나 본 연구에서는 국내에서 보편적으로 사용되는 % bias({(측정치-참고 목표치)÷참고 목표치}×100)를 사용하였는데 % decrease와 상대오차는 계산 방법만 다를 뿐 %를 사용한다는 면에서 동일한 % 결과를 보여 주었다. 평가물질로 사용된 환자 검체는 pooling하여 측정할 경우에는 검체 상호간 간섭 현상이 나타날 수 있어 정상인 검체와 질환별 고농도의 환자검체로 구분하여 각각 평가하여야 하나, 참고 목표치의 설정과 일간 변이를 모니터링하기 위하여 1일 3회씩 10일간 연속해서 측정해야 하므로 개별 환자 검체로는 충분한 검체를 확보하기 어려워 부득이 검체를 pooling하는 방법을 사용하였다. 검사실간 비교 평가에서도 상황에 따라 고농도의 환자검체가 충분하지 않을 경우 검체를 pooling하여 평가하였는데 우려했던 간섭현상은 나타나지 않았다. 혈청내 free PSA의 안정성 평가 결과 저농도 검체는 4일까지는 냉장 보관이 가능하나, 고농도 검체에서는 3일 이후부터 임상적으로 유의한 농도의 감소가 시작되므로 모든 검체는 금요일 접수 마감 이후 검체부터 토,일요일을 경과하는 검체와 연휴로 인하여 2일 이상의 기일이 경과할 경우 혈청을 분리하여 냉동 상태에서 검체를 보관하는 것이 바람직하다고 판단된다. 검체 안정성 평가 전 저농도 free PSA의 검사실간 상호 비교평가에서 비교평가기관에서는 0.520 ng/mL, 1.486 ng/mL의 결과를 보인 검체가 본원에서는 0.345 ng/mL, 1.241 ng/mL로 % bias가 -33.7%와 -16.5%를 보였으나, 검체 안정성을 평가한 이후에는 검체의 운송 과정에서부터 평가할 때까지 -20°C이하의 온도를 유지하고 평가한 결과 비교평가 기관의 결과가 0.129 ng/mL, 2.266 ng/mL, 9.036 ng/mL인 검체가, 본원에서는 0.123 ng/mL, 2.083 ng/mL, 8.596 ng/mL로, % bias는 -4.7%, -8.1%, -4.9%로 비교적 안정적인 결과를 얻을 수 있었다. 따라서, 검사실간 비교평가 시 첫째, 비교 참고 기관을 미리 선정하고 둘째, 평가날짜를 미리 확인하고 셋째, 검체 보관과 운송 과정에서 반드시 -20°C 이하의 온도를 유지해야 환자의 실질적인 free PSA 상태가 반영될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

Assessment of laboratory tests when proficiency testing is not available; Approved guidline-second edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute* document GP29-A2.Wayne, PA: CLSI, 2011.

Catalona WJ, Smith DS, Rathff TL, Rasler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA.* 1993, 270:945-954.

Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem.* 1990, 194:755-763.

Jung K, Lein M, Brux B, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Different stability of free and complexed prostate specific antigen in serum in relation to specimen hanling and storage conditions. *Clin Chem Lab Med.* 2000, 38:1271-1275.

Kumari GR, Malati T. Stability of total and free prostate specific antigen in serum samples at different storage conditions. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2004, 19:10-13.

Leinonen J, Lovgren T, Vornanen T, Stenman UH. Double-label time resolved immunoflurometric assay of prostatespecific antigen

and of its complex with alpha-1-antichymotrypsin. *Clin Chem.* 1993, 39:2098-2103.

Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest.* 1987, 80:281-285.

Michael JD. Prostate-specific antigen: does the current evidence support its use in prostate cancer screening? *Ann Clin Biochem.* 2011, 48:310-316.

Papsidero LD, Kuriyama M, Wang MC, Horoszewicz JS, Leong SS, Valenzuela L, *et al*. Prostate antigen: a marker for human prostate epithelial cells. *J Nat1 Cancer Inst.* 1981, 66:37-42.

Qiu SD, Young CY, Bilhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW, *et al*. In situ hybridization of pros-38 UROLOGY 48 @AI, 1996 taste-specific antigen mRNA in human prostate. *J Ural.* 1990, 144:1550-1556.

Stenman UH, Hakama M, Knekt P, Aromaa A, Teppo L, Leinonen J. Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with a1- antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer. *Lancet.* 1994, 344:1594-1598.

Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostatespecific antigen and alpha 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.* 1991, 51: 222-226.

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of human prostate specific antigen. *Invest Ural.* 1979, 17:159-163.

Woodrum D, C French C, Shamel LB. Stability of free prostate specific antigen in serum samples under a variety of sample collection and sample storage conditions. *Elsevier Science Inc.* 1996, 33-39.

대한진단검사의학회 검사실 신임 위원회. 인증심사 길라잡이. 2010, p102-105.

문혜란, 장상우. 분석방법의 정도관리, 2012, p359-367. 정문각, 서울.