

Aus der Klinik für Urologie
des Helios Klinikums Bad Saarow

DISSERTATION

Analytische und klinische Validierung zweier
Harnblasentumormarker:
UBC® Rapid (Zytokeratin 8 + 18) und Survivin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Norman Arndt

aus Köln

Datum der Promotion: 13.12.2019

Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a multicentre-study for Urinary Bladder Cancer Antigen (UBC) rapid as Tumour Marker for Urinary Bladder Cancer
Anticancer Res 2014; 34: 11-12

Ecke TH, Arndt C, Stephan C, Hallmann S, Lux O, Otto T, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a Multicentre Study of the UBC Rapid Test for Detection of Urinary Bladder Cancer
Anticancer Res 2015; 35(5): 2651-5

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
New Results of a Multicentre-study for UBC rapid as Marker for Urinary Bladder Cancer
Tumor Biol 2015; 36 (Suppl 1): S56

Ecke TH, Arndt C, Gützlaff S, Lux O, Stephan C, Otto T, Hallmann S, Gerullis H
Results of a multicenter-study for UBC® *Rapid* as marker for urinary bladder cancer with focus on high risk tumours
Urologia Fennica 2016; 1: 38

Gleichenhagen J, Arndt C, Casjens S, Meinig C, Gerullis H, Raiko I, Brüning T, Ecke T, Johnen G
Evaluation of a New Survivin ELISA and UBC® Rapid for the Detection of Bladder Cancer in Urine.
Int J Mol Sci. 2018 Jan 11;19(1)

Ecke TH, Weiß S, Stephan C, Hallmann S, Arndt C, Barski D, Otto T, Gerullis H.
UBC® Rapid Test—A Urinary Point-of-Care (POC) Assay for Diagnosis of Bladder Cancer with a focus on Non-Muscle Invasive High-Grade Tumors: Results of a Multicenter-Study
Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(12), 3841.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	II
Inhaltsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abstract	IX
Abstract (englisch)	XI
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen	1
1.1.1 Das Harnblasenkarzinom	1
1.2 Marker und ihre Bedeutung für das Harnblasenkarzinom.....	10
1.2.1 Zytokeratine / UBC® Rapid.....	11
1.2.2 Survivin	12
1.2.3 Zukünftiges Potential urinbasierter Marker für die Harnblasenkarzinomdiagnostik	14
1.3 Zielstellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Patientenkollektiv	16
2.2 UBC® Rapid Test.....	17
2.2.1 Testprinzip.....	17
2.2.2 Probengewinnung und –lagerung.....	18
2.2.3 Inhalt des Kits.....	18
2.3 Survivin	20
2.3.1 Erforderliches Material	21
2.3.2 Uringewinnung	21
2.3.3 Urinaufbereitung	21
2.3.4 Pellets	22
2.3.5 Überstände.....	22
2.3.6 ELISA.....	22
2.4 Statistische Auswertung	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Patientenkollektiv	28
3.2 UBC® Rapid Test – Auswertung	31
3.3 Survivin – Auswertung	35
3.4 Kombination der Tumormarker UBC® Rapid und Survivin	40
3.5 Möglicher Einfluss durch Hämaturie	42
4 Diskussion	43
4.1 Patientenkollektiv	43
4.2 Urinmarker allgemein.....	43
4.3 Diskussion UBC® Rapid Test.....	44
4.3.1 Ein-/Ausschlusskriterien UBC® Rapid Test.....	48
4.4 Diskussion Survivin.....	49
4.4.1 Ein-/Ausschlusskriterien Survivin.....	53
4.5 Kombination beider Marker UBC® Rapid und Survivin.....	54
4.6 Zusammenfassung der Eingangsfragen (1.3)	56
5 Schlussfolgerung	58
5.1 Ausblick.....	58
Literaturverzeichnis.....	59

Anhang	67
Eidesstattliche Versicherung	73
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen.....	74
Curriculum Vitae Christian Arndt.....	76
Publikationsliste	77
Danksagung	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades (UICC) [3]	2
Tabelle 2: TNM – Klassifikation von Blasen Tumoren[13].....	3
Tabelle 3: Behandlungsstrategie beim Harnblasenkarzinom [3]	7
Tabelle 4: Übersicht Referenzkurve/Standards	25
Tabelle 5: Charakteristika der Studienpopulation	28
Tabelle 6: Charakteristika der Tumorgruppe	29
Tabelle 7: Optische Auswertung mittels qualitativem UBC® Rapid	31
Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität des UBC® Rapid Test	32
Tabelle 9: Einflussfaktoren für den UBC® Rapid Test anhand logistischer Regression	32
Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität für Survivin	37
Tabelle 11: Einflussfaktoren für Survivin anhand logistischer Regression	37
Tabelle 12: Signifikanzen UBC® - Rapid und Survivin.....	40
Tabelle 13: Tabellarische Gegenüberstellung Survivin, UBC® Rapid und deren Kombinationen	40
Tabelle 14: Sensitivität und Spezifität Survivin oder UBC® Rapid in Kombination.....	41
Tabelle 15: Sensitivitäten und Spezifitäten anderer Studien im Vergleich UBC.....	47
Tabelle 16: Sensitivitäten und Spezifitäten anderer Studien im Vergleich Survivin	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T – Klassifikation beim Harnblasenkarzinom	3
Abbildung 2: 3D - Strukturdarstellung des Proteins Survivin basierend auf Kristallstrukturanalyse [58].....	13
Abbildung 3: Durchführung UBC® Rapid Test und optische Auswertung (qualitativ) (a)	18
Abbildung 4: Concile omega 100 Reader (a).....	20
Abbildung 5: UBC® – Rapid Test Kontrollen vs. Tumorpatienten.....	31
Abbildung 6: ROC – Analyse mit AUC für UBC® Rapid	33
Abbildung 7: Box - Plot – Diagramm UBC® Rapid Test EORTC – Risk	34
Abbildung 8: Box – Plot – Diagramm UBC® Rapid Test Grading.....	34
Abbildung 9: Vier - Parameter - Kurve für den Survivin – ELISA	35
Abbildung 10: Survivin: Kontrollen vs. Tumorpatienten	36
Abbildung 11: ROC – Analyse mit AUC für Survivin	38
Abbildung 12: Box - Plot – Diagramm Survivin EORTC - Risk.....	39
Abbildung 13: Box – Plot – Diagramm Survivin Grading.....	39
Abbildung 14: Venn – Diagramm: Testergebnisse: Fälle vs. Kontrollen (n=244)	41
Abbildung 15: ROC – Analyse mit AUC für Survivin, UBC® Rapid und in Kombination ...	42

Abkürzungsverzeichnis

µl = Mikroliter
5 – JÜR = 5 Jahre – Überlebensrate
Abb. = Abbildung
ABST = 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
adj. = adjuvant
AK = Antikörper
AUC = Area under the curve
AUG = Ausscheidungsurogramm
BCG = Bacillus Calmette Guérin
BIR – Domäne = baculovirus IAP repeats
bspw. = beispielsweise
BTA = bladder tumor antigen
c = clinical = klinisch
CA = Karzinom
CCD – Sensoren = charge-coupled device – Sensoren = ladungsgekoppeltes Bauteil
CCT = kraniale Computertomographie
CIS = Carcinoma in situ
CK = Zytokeratin
CT = Computertomographie
CYFRA 21-1 = Cytokeratin-Fragment 19
ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EORTC = European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FDA = Food and Drug Administration
FDP = fibrin degradation product
FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
ICD = International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IPA Bochum = Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der DGUV (IPA)
IQR = Interquartilsabstand
KM = Kontrastmittel
LA = Lymphadenektomie
LOD = Limit of detection
m = männlich
M = Metastasierung
met. = metastasiert
ml = Milliliter
mRNA = messenger ribonucleic acid = messenger Ribonukleinsäure
MRT = Magnetresonanztomographie
N = Node = Lymphknoten
NGC = Next Generation Chromatography System
nm = Nanometer
NMI-LG = non muscle invasiv – low grade
NMI-HG = non muscle invasiv – high grade
NPV = negative predictive value = negativer Vorhersagewert
NWG = Nachweisgrenze
MI-LG = muscle invasiv – low grade
MI-HG = muscle invasiv – high grade
OR = odds ratio
p = pathologisch

Pat. = Patient(en)
PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST = Phosphate buffered saline with Tween-20
PCR = polymerase chain reaction = Polymerase - Kettenreaktion
PJ = Packyears
POC – Test = Point of care Test
PPV = positive predictive value = positiver prädiktiver Wert
RKI = Robert Koch Institut
ROC = Receiver-Operating-Characteristic-Kurve
STRP-HRP = Streptavidin Poly-HRP80 Conjugate (65R-S105PHRP)
s.u. = siehe unten
T = Tumor
Tab. = Tabelle
TPA = tissue polypeptide antigen
TUR - B = Transurethrale Resektion der Blase
UBC® Rapid = Zytokeratin 8 + 18
UICC = Union internationale contre le cancer
w = weiblich
YI = Youden-Index

Abstract

Einleitung:

Für Diagnose und Nachsorge von Patienten mit Harnblasenkarzinom werden Urinmarker dringend benötigt. Bisher konnte kein alleiniger Marker mit einer ausreichenden Sensitivität, Spezifität und einer einfachen Handhabung qualifiziert werden.

Ein möglicher Ansatz wäre, mehrere Marker zur Detektion von Harnblasenkarzinomen heranzuziehen.

Material und Methoden:

Ziel dieser Fall-Kontroll-Studie war es, die Leistungsfähigkeit eines vom IPA Bochum entwickelten enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) für Survivin, den UBC® Rapid Test und die Kombination beider Assays zu evaluieren.

Insgesamt wurden 292 Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, rekrutiert. Die Urinproben von 111 Patienten mit histologisch nachgewiesenem Harnblasenkarzinom und 133 klinischen Kontrollen wurden im Zeitraum von Januar 2014 bis Juli 2015 untersucht.

48 Patienten wurden aufgrund eines nicht bestätigten Blasentumors (TUR – B Nachresektion ohne Anhalt für Malignität als histologisches Korrelat) ausgeschlossen.

Die Untersuchung erfolgte mittels POC – Test für UBC® Rapid Test und ELISA für Survivin. Die Analyse der Receiver-Operating-Characteristic (ROC) wurde verwendet, um die Markerleistung zu bewerten.

Es wurden Antikörper verwendet, die aus rekombinantem Survivin erzeugt wurden, um einen Sandwich-ELISA zu entwickeln. Der UBC® Rapid Test und der ELISA für Survivin wurden auf alle Urinproben angewendet.

Ergebnisse:

Der UBC® Rapid Test zeigte eine Sensitivität von 56% und eine Spezifität von 96%.

Der Survivin-ELISA zeigte eine Sensitivität von 35% mit einer Spezifität von 98%. Die Kombination beider Assays erhöhte die Sensitivität auf 66% mit einer Spezifität von 95%.

Bei high - grade Tumoren zeigte die Kombination eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 95%.

Schlussfolgerung:

Die Kombination der Urinmarker UBC® Rapid (Zytokeratin 8 + 18) und Survivin konnte noch besser zwischen Harnblasentumorpatienten und Kontrollen unterscheiden als jeder Marker für sich alleine gesehen. Bevorzugt wurden vor allem high grade und high risk - Tumoren detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl UBC® Rapid ($p < 0,001$) als auch Survivin ($p < 0,001$) signifikant höher gemessen wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Leistung jedes einzelnen Markers ist jedoch moderat, und Anstrengungen zur Verbesserung des Survivin-Assays sollten verfolgt werden. Weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl müssen zeigen, ob sich diese Ergebnisse bestätigen.

Abstract (englisch)

Introduction:

For diagnosis and aftercare of patients with urinary bladder carcinoma, urinary markers are urgently required. So far, no single marker with sufficient sensitivity and specificity as well as simple handling has been qualified.

One possible approach would be to use multiple markers for the detection of urinary bladder carcinoma.

Material and methods:

The aim of this case-control study was to evaluate the performance of an IPA self-developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for survivin, the UBC® rapid test and the combination of both assays.

Overall, 292 patients meeting the inclusion criteria, were recruited. Urinary samples of 111 patients with histologically confirmed urinary bladder carcinoma and 133 clinical controls were investigated from January 2014 to July 2015. 48 patients were excluded due to unverified urinary bladder carcinoma (TUR – B additional resection without indication for malignancy as histological correlate).

The investigation took place by means of POC test for UBC® and ELISA for survivin. The analysis of the receiver operating characteristic (ROC) was used to assess marker performance. Antibodies produced of recombinant survivin were used to develop a sandwich ELISA. The UBC® rapid test and ELISA for survivin were applied to all urine specimens.

Results:

The UBC® rapid test showed a sensitivity of 56% and a specificity of 96%. The survivin ELISA showed a sensitivity of 35% with a specificity of 98%. The combination of both assays increased the sensitivity to 66% with a specificity of 95%. For high - grade tumors, the combination showed a sensitivity of 82% and a specificity of 95%.

Conclusion:

The combination of the urinary markers UBC® Rapid (cytokeratin 8 + 18) and survivin was even better to differentiate between bladder cancer patients and controls than any marker alone. In particular high-grade and high-risk tumors were detected preferably. It could be demonstrated that both UBC® ($p < 0,001$) and survivin ($p < 0,001$) were measured significantly

higher in comparison with the control group. However, the performance of each single marker is moderate and efforts should be made to improve the survivin assay. Further studies with an increased number of patients will be necessary to show whether these results may be confirmed.

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

1.1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist in Deutschland der viert häufigste Tumor bei Männern und der 14. häufigste bei Frauen (Stand 2012) [1]. Im Fachgebiet der Urologie ist es die zweit häufigste Tumorerkrankung und die häufigste Krebserkrankung der Harnwege [2].

An einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom erkrankten im Jahre 2012 insgesamt ca. 15.400 Menschen, 13.500 zusätzlich an einem nicht-invasiven papillären Karzinom und CIS. 2012 wurden in ganz Europa 151.297 neue Fälle diagnostiziert. Die Lokalisation tritt in den gesamten ableitenden Harnwegen zufällig auf, entsprechend der urothelialen Oberfläche (4% im Nierenbecken, 3% im Harnleiter, 93% in der Harnblase) [3].

Die Tumorverteilung des urothelialen Harnblasenkarzinoms zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stellt sich folgendermaßen dar: Männer: T1: 47%, T2: 34%, T3: 13%, T4: 7%; Frauen: T1: 37%, T2: 39%, T3: 18%, T4: 7% [4].

Zu beachten ist bei diesen Zahlen, dass das RKI nur die Statistik der Neuerkrankungen mit der Diagnose C67 berücksichtigt. pTa – Tumore und das CIS werden unter dem ICD – Code D09 verschlüsselt und werden somit nicht berücksichtigt. Durch Hinzuziehen der Diagnoseschlüssel ICD D09 und D41.1 verdoppeln sich Neuerkrankungsrate und Prävalenz. Somit machen bei der Erstdiagnose die nicht invasiven Urothelkarzinome (pTa und CIS, exklusive pT1, da diese erfasst werden) etwa 70% aus [2].

Vor dem 20. Lebensjahr ist das Harnblasenkarzinom sehr selten. Im Kindes- und Jugendalter handelt es sich in der Regel um mesenchymale Tumore, meist Rhabdomyosarkome.

Der häufigste klinische Vorstellungsgrund (>80%) ist die schmerzlose Makrohämaturie, gefolgt von einer irritativen Symptomatik wie Dysurie [5].

1.1.1.2 Risikofaktoren

Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom sind zunehmendes Lebensalter und männliches Geschlecht. Die Häufigkeitsverteilung Männer gegenüber Frauen liegt bei 4:1. Weitere Faktoren sind genetische Prädisposition [6] [7], Giftstoffe wie aromatische Amine, Cyclophosphamid, Chlornaphazin, Phenacetin, Aristolochiasäure [8] und Nikotinabusus [9].

Die Zeitdauer und die Menge der gerauchten Zigaretten sind dabei wesentlich entscheidend [10] [11]. Chronische Entzündungen können die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms fördern [12], ebenso wie die Strahlentherapie des kleinen Beckens nach mehreren Jahren Latenz.

Ebenfalls treten Harnblasenkarzinome gehäuft durch eine (dauerhafte) Schädigung (allein oder mit Karzinogenexposition) des Urothels auf. Dies ist z.B. bei der Phenacetinniere, der Balkanephropathie im Nierenbecken oder bei der Bilharziose, bei Dauerkatheterträgern oder einer Cyclophosphamidzystitis der Fall [13].

1.1.1.3 Pathologie und Stadieneinteilung

Ca. 95% aller Blasentumore sind Urothelkarzinome, dabei unterscheidet man zwischen einem papillären und einem soliden Tumorwachstum. Etwa 5% der Tumoren entsprechen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen [13].

Der Differenzierungsgrad (G) und die Klassifikation der Tumorausbreitung (TNM) werden gemäß der Richtlinien der Internationalen Union gegen Krebs (UICC) und der in Europa weniger gebräuchlichen Stadieneinteilung nach Marshall (1952) eingeteilt [3].

Tabelle 1: Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades (UICC) [3]

Gx: Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1: Gut differenziert
G2: Mäßig differenziert
G3: Schlecht differenziert
G4: Undifferenziert, anaplastisch

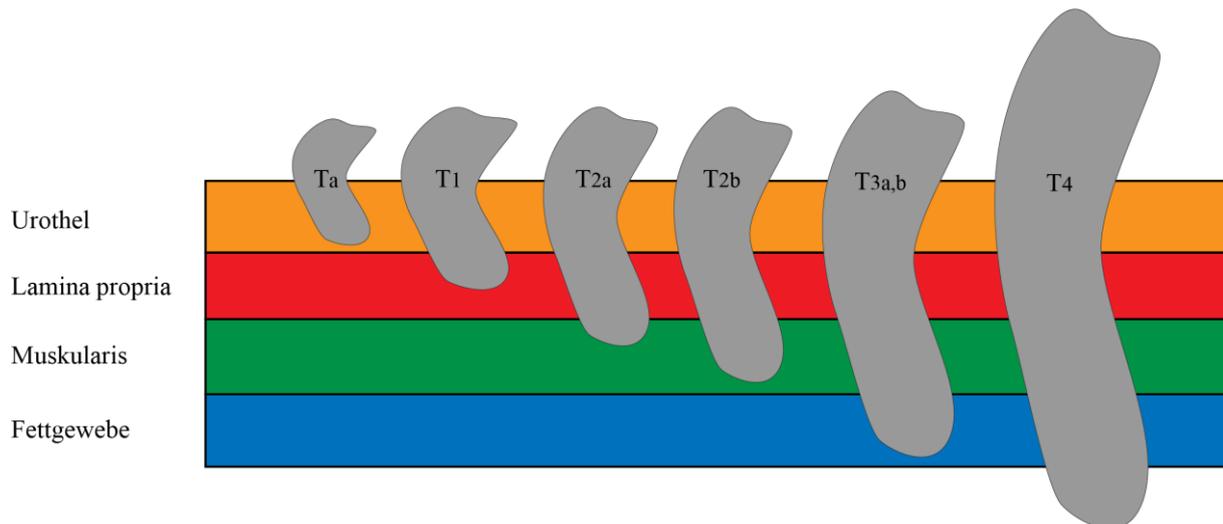


Abbildung 1: T – Klassifikation beim Harnblasenkarzinom

Tabelle 2: TNM – Klassifikation von Blasentumoren[13]

T - Tumorausbreitung

Tx: Tumor kann nicht beurteilt werden

T0: Kein Anhalt für Primärtumor

Ta: Nichtinvasiver papillärer Tumor

TIS: CIS

T1: Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe

T2: Tumor infiltriert die Muskulatur

T2a: Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)

T2b: Tumor infiltriert äußere Muskulatur (äußere Hälfte)

T3: Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe

T3a: mikroskopisch

T3b: makroskopisch (extravesikaler Tumor)

T4: Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina oder Becken-/Bauchwand

T4a: Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina

T4b: Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand

N – Regionäre Lymphknoten

Nx: Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0: Kein Anhalt für regionäre Lymphknoten

N1: Metastase in solitärem Lymphknoten ≤ 2 cm in größter Ausdehnung

N2: Metastase in solitärem Lymphknoten > 2 cm in größter Ausdehnung, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung oder multiple Lymphknoten ≤ 5 cm

N3: Metastasen in Lymphknoten > 5 cm in größter Ausdehnung

M – Fernmetastasen

M0: Keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Die regionären Lymphknoten betreffen die iliakalen und pelvinen Lymphknoten unter der Bifurkation der A. iliaca communis. Fernmetastasen finden sich vor allem in der Lunge, Leber und Knochen.

Die WHO klassifizierte 2004 das histopathologische Grading neu.

Dies berücksichtigt die tumorbiologischen Eigenschaften wie Stabilität und Instabilität des Tumors [13].

Die papillären Tumoren werden nach der neuen WHO Klassifikation in drei Kategorien eingeteilt:

1. Nicht invasive low – grade – Karzinome (= genetisch stabil)

Dabei ist eine Textur- / Schichtungsstörung des Urothels sichtbar, jedoch ist eine deutliche Übereinstimmung zum normalen Urothel erkennbar. Zu dieser Gruppe zählt man ebenfalls die PUNLMP (papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrig malignem Potenzial). Dabei handelt es sich um hochdifferenzierte papilläre Tumoren, die nicht als maligne eingestuft werden.

Sowohl die PUNLMP als auch die nicht invasiven Low – grade – Karzinome sind genetisch stabile Tumore.

2. Nicht invasive high – grade – Karzinome (= genetisch instabil)

Dabei kommt es zu einer zusätzlichen Schichtungsstörung. Diese Tumore werden als genetisch instabil bezeichnet.

3. CIS (Carcinoma in situ)

Bei diesem Typus finden sich in einem Areal deutliche Kernpolymorphien, ohne dass eine komplette Schichtungsstörung vorliegen muss [13].

1.1.1.4 Diagnostik

Das häufigste Symptom eines Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie, je nach Studie tritt diese zu 68% - 97,5% auf [14] [15].

Bei Vorliegen einer Mikrohämaturie liegt die Wahrscheinlichkeit für ein Malignom jedoch nur bei 10 – 15% [16] [17]. Vor allem Patienten mit einem CIS weisen eine Mikrohämaturie und häufig eine positive Urinzytologie (s.u.) auf [16].

Zu ca. 20% - 25% treten irritative Symptome, wie z.B. Dysurie, Drangsymptomatik oder Pollakisurie auf. Begründet wird dies mit einer meist (40% der Fälle) begleitenden Harnwegsinfektion [18] [19]. Weitere Gründe können sein: tumorbedingte Schmerzen, eine Blasenhalsostruktion durch lokales Tumorwachstum, Reduktion der Blasenkapazität durch den Tumor, Tumornekrose mit begleitender Entzündung [20].

Die folgende Basisdiagnostik (konsensbasierte Empfehlung) bezieht sich auf die aktuelle S3 – Leitlinie des Harnblasenkarzinoms [2]:

a) Urinzytologie oder andere urinbasierte Tumormarker

Der Urin für die Zytologie soll aus frischem Morgenurin abgenommen werden. Bei negativem Ergebnis ist ein high – grade Urothelkarzinom/CIS mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen.

Der Vorteil der Urinzytologie liegt darin, dass es ein nicht invasives, sehr spezifisches diagnostisches Verfahren ist. Dabei werden abgeschilferte maligne Urothelzellen nachgewiesen. Diese weisen Kernveränderungen, wie bspw. Kerngröße, -form, Hyperchromasie und Anisokaryose auf.

Dieses Verfahren ist abhängig von der Qualität des Urins, seiner Verarbeitung, vom Pathologen, dem Grading des Tumors und der Masse der Zellabschilferung [2].

Die Sensitivität und Spezifität variieren je nach Studie sehr stark. Es werden Sensitivitäten von 19 – 70% und Spezifitäten von 73 – 100% beschrieben [21].

Zum Stand der Diagnostik mit Hilfe von Tumormarkern siehe Kapitel 1.2.

b) Sonographie

Diese erfolgt zum Ausschluss einer Harnabflussstörung durch den Tumor sowie dem Nachweis von Lymphknotenvergrößerungen, Organmetastasen oder großen Blasentumoren.

c) Weißlicht- und Fluoreszenz - Zystoskopie

Dabei kann entweder mit einem flexiblen oder mit einem rigiden Zystoskop gearbeitet werden. Die Effektivität der beiden Verfahren ist gleich.

Es kann eine Fluoreszenz – basierte Zystoskopie durchgeführt werden.

Bei Verdacht wird während der Zystoskopie eine Resektion des tumorsuspekten Gewebes durchgeführt.

d) Bildgebende Diagnostik:

Die Erforderlichkeit einer Bildgebung ist u.a. abhängig vom TNM – Stadium des Tumors. Bei Erstbefund eines nicht invasiven Harnblasentumors ist keine bildgebende Diagnostik notwendig. Bei Rezidiven nicht invasiver Blasenkarzinome und zur Abklärung des oberen Harntrakts werden CT – Urographie, alternativ MRT, AUG empfohlen.

Bei Erstbefund eines muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms werden zum Staging ein CT – Abdomen (mit CT – Urographie), Becken, Thorax mit KM; statt CT – Becken, MRT Becken möglich, empfohlen. Ein CCT ist nur bei klinischer Symptomatik indiziert.

Das Harnblasenkarzinom metastasiert neben der lymphogenen Ausbreitung, v.a. in die Lunge, Knochen und Leber.

Daher ist es notwendig, ein Schnittbildverfahren (CT / MRT jeweils mit KM) im Abdomen und Thorax einzusetzen [22].

Im Verlauf sollten alle bekannten Metastasierungslokalisationen überprüft werden, dazu sind dann weitere Untersuchungsmethoden, wie z.B. ein CCT, eine Szintigraphie oder die konventionelle Röntgenaufnahme, nötig.

1.1.1.5 Therapie

Die Behandlungsstrategie richtet sich nach folgender Einteilung:

1. Oberflächliche Harnblasenkarzinome (Ta,T1,CIS)
2. Muskelinvasive Harnblasenkarzinome (T2-T3b, N0, M0)
3. Lymphogen metastasiertes Harnblasenkarzinom (T4/N1/N+)
4. Fortgeschrittenes oder metastasiertes Harnblasenkarzinom (T4/M1)

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Therapie:

Tabelle 3: Behandlungsstrategie beim Harnblasenkarzinom [3]

<u>Oberflächliches Harnblasenkarzinom:</u>	<u>Ta/T1/CIS</u>
Geringes Risiko (Ta, G1/G2)	TUR - B
Mittleres Risiko (Ta, G3/T1, G1/G2)	TUR – B, adj. Chemo- oder Immuntherapie, Kontrollzystoskopie/TUR – B Nachresektion
Hohes Risiko (T1 G3/CIS)	Radikale Zystektomie; alternativ: TUR – B + adj. Therapie mit BCG oder Mitomycin
<u>Muskelinvasives Harnblasenkarzinom:</u>	
T2-T3b, N0, M0	Bilaterale LA + radikale Zystektomie, ggf. neoadjuvante Chemotherapie
<u>Fortgeschrittenes/lymphogen met. CA:</u>	
T4/N+	Induktive Chemotherapie, ggf. palliative Zystektomie
<u>Metastasiertes Harnblasenkarzinom:</u>	
M1	Induktive Chemotherapie, ggf. palliative Zystektomie

Die jeweilige Therapieoption entscheidet sich individuell nach Alter, Gesundheitsstatus und Wunsch des Patienten.

1.1.1.6 Prognose

Die Prognose ist abhängig vom Stadium, Infiltrationstiefe, Differenzierungsgrad, Größe, Multiplizität und Rezidivstatus des Tumors.

Es ist dabei bekannt, dass ein enger Zusammenhang zwischen Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad besteht. Während nicht invasive Urothelkarzinome zu mehr als 60% hochdifferenziert sind (G1), weisen die meisten invasiven Karzinome ein mäßig bis schlecht differenziertes Stadium (G2-G3) auf [23].

Die 5 – Jahres – Überlebensrate beträgt bei oberflächlichen Tumoren (Ta - T1, G1 – G2) 84 – 95%, bei T1 G3 Tumoren 64% [3].

Bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen nach radikaler Zystektomie liegen folgende 5 – Jahres – Überlebensraten vor: <pT3a = 78,9%, >pT3b = 36,8%.

Des Weiteren ist die Prognose abhängig vom Lymphknoten- und Metastasierungsstatus:

N0 = 66,7%, N+ = 31,2%

Während Patienten mit nicht invasiven Tumoren (pTa) lediglich zu 0,7% eine Metastasierung aufweisen, sind es bei Infiltration der Lamina propria bereits 14-23% [23].

Die meisten erst diagnostizierten Harnblasenkarzinome sind zu 75% nicht – muskelinvasiv (Ta, T1, CIS) und haben daher eine gute Prognose. Zu 30% – 80% rezidiert der Tumor weiterhin nicht – muskelinvasiv. Die Wahrscheinlichkeit für einen Progress in ein höheres, muskelinvasives Stadium innerhalb von 5 Jahren liegt bei 1% – 45% [24].

Dann sinkt die 5 – JÜR jedoch immens.

Einen Sonderfall stellt das CIS dar, welches als high – grade Tumor klassifiziert wird. Es durchdringt zunächst nicht die Basalmembran, weist jedoch hochmaligne Merkmale auf und gilt als Vorläufer des invasiven Harnblasenkarzinoms [25].

Daher sind die Früherkennung und regelmäßige Nachsorge obligat.

Bisher ist es noch nicht möglich, die Zystoskopie als Nachsorge durch einen kommerziell verfügbaren Serum- oder Urinmarker abzulösen [26].

1.1.1.7 Nachsorge

Beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom erfolgen nach primärer Tumorerkrankung eine Zystoskopie und urinzytologische Untersuchungen in den ersten zwei Jahren alle drei Monate, im dritten bis zum fünften Jahr alle sechs Monate. Danach kann auf jährliche Intervalle übergegangen werden. Des Weiteren kann je nach Tumorstadium eine weitere Instillationstherapie, z.B. mit Mitomycin oder BCG erfolgen.

Die Nachsorge des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms richtet sich nach der Therapie (radikale Zystektomie oder Radio-(Chemo-) Therapie). Es soll eine regelmäßige Nachsorge erfolgen, um sowohl Tumorrezidive als auch funktionelle Störungen zu erfassen. Diese beinhaltet eine Bildgebung, wie CT – Thorax / - Abdomen, zellbasierte Urinuntersuchungen, die Untersuchung des Harnröhrenstumpfes nach radikaler Zystektomie mittels Urethroskopie und Urin-Spülzytologie, Blutgasanalysen und Labor- / Urinuntersuchungen, Sonographie, Stomakontrollen, Anamneseerhebungen und Erfassung des psychoonkologischen Sozialstatus in vorgegebenen Nachsorgeintervallen.

1.1.1.8 Kosten

Aufgrund des langfristigen Überlebens und der Notwendigkeit einer lebenslangen routinemäßigen Überwachung und Behandlung sind die Kosten pro Patient für Blasenkrebs von der Diagnose bis zum Tod die höchsten aller Krebserkrankungen und liegen in den USA bei US \$ 96.000 bis 187.000 (Jahr 2001). Insgesamt ist Blasenkrebs der fünft-teuerste Krebs in Bezug auf die Gesamtausgaben für medizinische Versorgung. Dies machte in den USA fast \$ 3,7 Milliarden an direkten Kosten in 2001 aus [27][28].

Daher benötigt man zuverlässige Tumormarker, um schmerzhafte Untersuchungen, wie z.B. die Zystoskopie zu vermeiden und die Kosten zu senken.

1.1.1.9 Früherkennung und Screening

Momentan ist es Konsens, dass (noch) kein diagnostischer Marker zum Screening in der Gesamtbevölkerung oder in Risikopopulationen empfohlen werden kann. Bei Hochrisikogruppen, wie beispielsweise Rauchern oder berufsbedingten Risikogruppen, kann durch die Untersuchung des Urins auf Mikrohämaturie ein Karzinom früher erkannt werden, als bei symptomatischen Patienten [29]. Nach einer wiederholt festgestellten, asymptomatischen Mikrohämaturie sollte eine weitere urologische Abklärung (Zystoskopie) erfolgen. Weitere diagnostische Verfahren/Marker, die einen Hinweis auf ein Blasenkarzinom geben können, sind folgende:

1. Urinzytologie (hohe Sensitivität aber geringe Spezifität, v.a. bei gut bis mittelgradig differenzierten Blasentumoren) [30]
2. Zytokeratine (z.B. CK20, CYFRA 21-1) (Sensitivität anderen Markern unterlegen, Spezifität schlechter als Urinzytologie) [31] [32]
3. Nukleäres Matrixprotein 22 (NMP22) (Sensitivität: 54 – 100%, Spezifität: 28-90%) In den USA ist dieser Test als Zusatzdiagnostik für das Harnblasenkarzinom zugelassen [33].
4. Fluoreszenz – in – situ Hybridisierung (FISH Test (UroVysion) detektiert Aneuploidien und Veränderungen an Chromosomen [34]; Sensitivität: 75%, Spezifität 65-96%) [35]
5. Blasen tumor assoziiertes Antigen (BTA) (Sensitivität: 51 – 90%; Spezifität: 54 – 93%) [21]
6. Immunocyt/uCyt (Sensitivität: 39 – 100%, Spezifität: 73 – 84%) [21]

1.2 Marker und ihre Bedeutung für das Harnblasenkarzinom

Bei den markerbasierten Urindiagnoseverfahren werden Zellkomponenten im Urin nachgewiesen, die bei Urothelkarzinomen vermehrt über den Urin ausgeschieden werden.

Diese zeigen entweder einen erhöhten Zellumsatz an (z.B. NMP22) oder sind spezifisch für maligne Zellen (z.B. Telomerase, Survivin) [2].

Basierend auf Urin oder Urinzellen wurden bisher nur wenige molekulare Marker (NMP22, FISH, BTA) von der amerikanischen Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln (FDA) zugelassen. Diese Marker werden lediglich als Unterstützungsinstrumente zur Überwachung von Blasenkrebspatienten genutzt, anstatt die Zystoskopie zu ersetzen [36].

Das nukleare mitotische Apparatus Protein 1 (NUMA1) kann durch den kommerziellen NMP22®-Test quantifiziert oder durch den BladderChek®-Test nachgewiesen werden [37]. Die berichteten Sensitivitäten der NMP22-Assays in Fall-Kontroll-Studien variieren zwischen 47% und 100%, während die Spezifitäten zwischen 58% und 91% liegen [38] [39]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Fall-Kontroll-Studien erreichte der Test in einer prospektiven Studie (UroScreen) eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 29% [39]. Die Leistungsfähigkeit von NMP22 wurde durch eine relativ hohe Anzahl von falsch-positiven Testergebnissen begrenzt, die beispielsweise durch Hämaturie oder Infektionen verursacht werden können. Die begrenzte Leistung einzelner Marker kann durch die Kombination von zwei oder mehr Markern in einem Panel verbessert werden. Zum Beispiel erreichte die prospektive Studie UroScreen, eine Kombination von UroVysion und NMP22®, eine Sensitivität von 67% und einer Spezifität von 95% [40]. Es gibt jedoch immer noch einen Mangel an leicht anwendbaren und kosteneffektiven Assays mit angemessener Leistung, die sich als Kandidaten für ein Biomarker-Panel eignen würden.

Um weitere Assays von Biomarkern im Urin zu evaluieren wurden in dieser Arbeit UBC® Rapid und Survivin ausgewählt und ihre Fähigkeit, Blasenkrebs nachzuweisen, getestet. Diese werden im Folgenden näher beschrieben:

Das Blasentumor Assoziierte Antigen (BTA) findet sich häufig bei Patienten mit Harnblasenkarzinom. Sie zeigen einen unspezifisch erhöhten Zellumsatz [2]. BTA kann derzeit mit zwei von der FDA zugelassenen Verfahren nachgewiesen werden (BTA stat und

BTA TRAK). Die Zulassung gilt für die Nachsorge in Kombination mit der Urinzytologie [34] [41] [42]. Dieser Test wird jedoch stark durch Hämaturie und Harnwegsinfektionen beeinflusst. Daher wird er nicht zur Früherkennung oder zum Screening empfohlen [34] [43]. BTA Stat ist ein relativ kostengünstiges, wenig zeitaufwändiges immunchromatographisches Verfahren, wo hingegen BTA TRAK ein antikörperbasierter Sandwich-Immunoassay ist und daher zeit- und arbeitsintensiv. Im direkten Vergleich wurden ähnliche Sensitivitäten wie für die Urinzytologie beschrieben (63% vs. 68%, Spezifität 63% vs. 73%) [44].

1.2.1 Zytokeratine / UBC® Rapid

Zytokeratine sind Intermediärfilamente, diese sind wiederum Bestandteile des Zytoskeletts.

Ihre Hauptaufgabe ist es, die Zelle bei mechanischen Widerständen zu stützen.

Sie werden in 20 Untergruppen eingeteilt, dabei unterscheidet man:

- a) Saure Typ A Subfamilie: CK9 – CK20
- b) Neutral – basische Typ – B – Subfamilie: CK1 – CK8

In den 1980er Jahren stieg das Interesse an den Zytokeratinen explosionsartig an, wobei das Hauptaugenmerk auf die Erforschung ihrer grundlegenden biologischen Funktionen gerichtet war, die jedoch praktische Anwendungen in der Histopathologie fanden [45].

Keratin ist vor allem in der Tumordiagnostik wichtig. Der Nachweis von Keratin lässt darauf schließen, dass der Tumor epithelialen Ursprungs ist. Durch die weitere immunhistochemische Untersuchung der Subtypen (CK1 – CK20) kann der Ursprung noch weiter eingegrenzt werden.

Vor allem die Zytokeratine 8, 18, 19, 20 stehen in engem Zusammenhang mit dem Harnblasenkarzinom [45].

CK 19 kann mittels Immunradiometrie oder Elektrochemilumineszenz nachgewiesen werden; Studien zeigten hier eine Sensitivität von 75% - 97% und eine Spezifität von ca. 70% [46].

In einer Studie von Gomez et al. wurde CK 19 an 446 nicht – muskelinvasiven Harnblasentumorpatienten getestet. Zur Kontrolle wurde der Urin von 185 Patienten ohne Tumor untersucht. Bei einem Cut – Off – Wert von 1,5 mg/ml ergaben sich eine Sensitivität von 73,8% und eine Spezifität von 41%. In Kombination mit Urinteststreifen auf Hämoglobin und Urinzytologie konnte die Sensitivität auf 91,3 % für alle nicht-muskelinvasiven und auf 93,3% für alle muskelinvasiven Tumoren angehoben werden.

CK 20 wird von den Deckzellen des normalen Urothels gebildet. Bei einem Urothelkarzinom exprimieren alle Zellen CK 20, sodass die Gesamtmenge zunimmt, damit wird es v.a. erst in fortgeschritteneren Tumorstadien detektiert [45].

Es ist möglich CK 20 auf Urothelzellen immunhistochemisch oder per PCR nachzuweisen. In Studien wurden Sensitivitäten von 65% - 77% und Spezifitäten von 83% – 91% beschrieben [47] [48] [35].

Vor allem die Zytokeratine 8, 18 (\cong UBC® Rapid) und 19 sind besonders vielversprechend, da sie von höheren Ebenen des Urothels gebildet werden und so aufgrund erhöhter Zellumsatzrate schneller ansteigen könnten [49]. CK 8 und 18 haben eine strukturbildende Funktion in einfachen Epithelzellen. Sie spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion. Diese steuert die Zellbindung, die Proteinsynthese und die G1/S Phasenübergänge [50]. CK 18 kann bei der Erkennung der therapieinduzierten Apoptose und Nekrose unterstützen [51].

Beim Nachweis von Zytokeratinen besteht jedoch bisher das Problem, dass das Ergebnis durch Störgrößen, wie z.B. durch begleitende Entzündungen, beeinflusst werden kann.

1.2.2 Survivin

Survivin ist ein unlösliches apoptosehemmendes Protein, das fast ausschließlich von Krebszellen gebildet wird. In der Embryonalentwicklung ist es dafür zuständig, die Weitergabe der Chromosomen in sich teilenden Zellen zu überwachen und ist in adulten, ruhenden, gesunden Zellen kaum noch aktiv und gar nicht bis nur noch in geringsten Mengen vorhanden. Im Gegensatz dazu wird Survivin von fast allen Tumorzellen produziert, damit diese unkontrolliert wachsen können und sich gegen Therapien von außen besser schützen können [52] [53].

Das Gen zur Expression von Survivin ist 14,7 kb groß und liegt auf Chromosom 17q25 [54]. Es beinhaltet drei Introns und vier Exons [55]. Survivin besteht aus 142 Aminosäuren und weist eine molare Masse von 16.390 Da auf. Es ist ein Klasse – 3 – Inhibitor der Apoptose und verhindert die apoptotische Funktion [56].

Das Survivin – Monomer besteht aus einer BIR – Domäne, drei alpha – Helices und einem dreisträngigen β – Faltblatt. Die Proteinstruktur der Domäne wird durch einen Zink – Finger stabilisiert. Die Dimer – Formation wird durch van – der Waals – Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten [57].

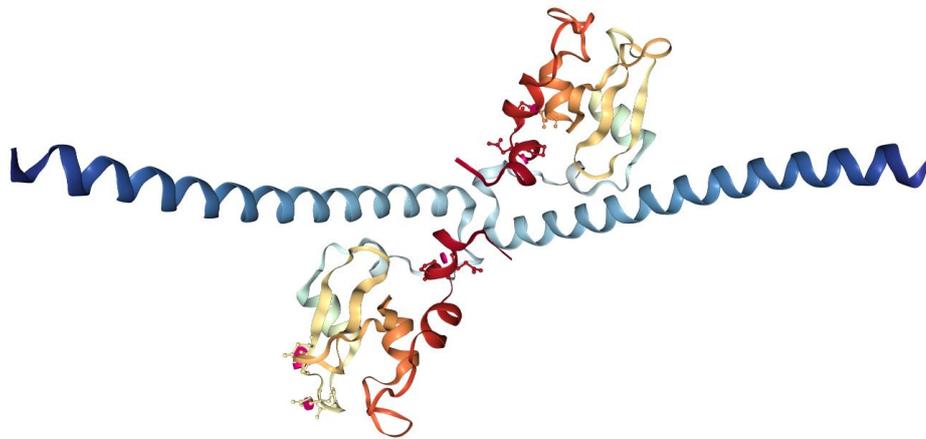


Abbildung 2: 3D - Strukturdarstellung des Proteins Survivin basierend auf Kristallstrukturanalyse [57]

Der Funktionsmechanismus ist noch nicht abschließend erforscht. Soweit bekannt, antagonisiert es den intrinsischen Apoptoseweg (mitochondrienabhängig) [58] [59]. Dies soll über eine Inaktivierung der Zelltodprotease Caspase – 9 und einem Kofaktor (HBXIP) erfolgen [60] [61].

Survivin weist eine große Bedeutung in der Apoptoseregulation in transformierten Zellen auf. Es ist weiterhin an der Zellproliferation und Angiogenese beteiligt [21].

Dadurch bietet es sich gut als Biomarker für Diagnostik und Prognose von Krebserkrankungen an. Es wird vor allem vermehrt von Blasen Tumoren gebildet, aber nicht von normalem Urothel [52] [53]. Wird Survivin exprimiert, geht dies mit einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegenüber Radio-/Chemotherapie einher [21]. Dies konnte mit einer Studie von Als et al. gezeigt werden [62].

Survivin wird über mRNA durch quantitative oder qualitative Reverse Transkriptase Reaktion (RT - PCR) nachgewiesen. Die Sensitivität von Survivin – mRNA wird in prospektiven Untersuchungen mit 87,5% beschrieben [63]. In einer Studie von Watson konnte eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 95% erreicht werden. Dabei wurde Survivin mRNA im Urinsediment mittels RT – PCR gemessen [64]. Schulz et al. beschrieb den Marker als sehr vielversprechend, v.a. was die Dauer des rezidivfreien Intervalls von Patienten mit einem primären Ta – Urothelkarzinom betrifft [65]. In einer weiteren Studie mit 222 Blasen tumorpatienten konnte gezeigt werden, dass Survivin bei Patienten mit

Harnblasenkarzinom und einem positiven Lymphknotenstatus besonders stark exprimiert wurde (94% vs. 64 %). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass die Expression mit der Progressionsfreiheit, dem tumorspezifischen Überleben und dem Gesamtüberleben statistisch signifikant korreliert [66].

Es gibt viele weitere Survivin - Studien [67], die nicht miteinander vergleichbar sind, da unterschiedliche Populationen, Matrix, andere Handhabung des Urins, Nachweisverfahren (RT - PCR vs Gel o.ä.) und verschiedene PCR – Primer verwendet werden.

Die meisten Studien, die die Expression von invasiv verwendetem Survivin analysieren, untersuchten histologisch Gewebeproben oder beruhen auf dem Nachweis von Survivin-mRNA in sedimentierten Zellen aus Urin [68] [69] [70]. Der für diese Arbeit etablierte ELISA des IPA Bochum konzentrierte sich auf das Survivin-Protein, da frühere Erfahrungen gezeigt haben, dass die Stabilität von mRNA begrenzt ist. Eine etablierte Methode zur Messung von Proteinen in der Labordiagnostik ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). ELISAs zum Nachweis von Survivin sind im Handel erhältlich, haben jedoch häufig keine ausreichende Leistung, insbesondere wenn Urin als Probenmatrix verwendet wird [71].

Survivin gilt als potentiell wertvoller Marker und könnte dazu beitragen, bei einer Subgruppe von Patienten auf eine unnötige Zystoskopie zu verzichten [21].

Die endgültige Bewertung von Survivin als Urinmarker ist jedoch bis dato noch nicht möglich und ist ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Ziel dieser Studie war es, einen neuen ELISA zur Quantifizierung von Survivin in Urinproben zu entwickeln und die Leistungsfähigkeit des ELISA in Kombination mit UBC® Rapid Test zur Urin-basierten Erkennung von Blasenkrebs zu evaluieren.

1.2.3 Zukünftiges Potential urinbasierter Marker für die Harnblasenkarzinomdiagnostik

Aufgrund der hohen Rezidivrate und des möglichen weiteren Fortschreitens der Tumoren ist die Nachsorge sehr wichtig. Zusätzlich werden zuverlässige Marker für die Früherkennung benötigt. Es wäre daher schmerzloser, einfacher und kostengünstiger einen Test zu entwickeln, basierend auf Tumormarkern, der zuverlässig in der Früherkennung und Nachsorge eingesetzt werden könnte. Momentan gibt es bereits einige dieser Methoden, wie z.B. BTA, FDP, CYFRA 21-1, TPA, Immunocyt - Test [72], die eine höhere Sensitivität und

Spezifität aufweisen als die Zytologie, aber noch nicht zugelassen sind und als alleiniger Marker nicht ausreichen, um die Diagnose zu sichern.

1.3 Zielstellung

Insgesamt sind die Methoden der Tumormarkerbestimmung nach heutigem Stand noch nicht ausgereift, z.B. hinsichtlich Sensitivität und Stabilität.

Mit dieser Arbeit (Fall – Kontroll – Studie) sollte untersucht werden, ob die Urinmarker UBC® Rapid und Survivin eine ausreichende Performance zur Detektion eines Harnblasenkarzinoms aufweisen. Die gewählten Marker wurden in der Literatur als besonders erfolgversprechend beschrieben [21]. So wurde das Protein Survivin bereits im Rahmen der prospektiven Studie UroScreen auf mRNA – Ebene im Urin untersucht [64]. Da Proteine in der Regel eine höhere Stabilität als RNA aufweisen, erschien Survivin als Marker besonders vielversprechend.

Es fehlen jedoch weitere aussagekräftige Daten und Studien.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, nun weitere Marker UBC® Rapid und Survivin oder ihre Kombination zu testen bzw. zu etablieren und Rückschlüsse hinsichtlich ihrer Eignung bei Diagnose und Nachsorge von Harnblasenkarzinomen zu ziehen.

In dieser Fall – Kontroll – Studie mit insgesamt 244 Urinproben, jeweils 111 Blasentumore und 133 Kontrollen, wurden die Tumormarker Zytokeratin 8 + 18 mittels UBC® Rapid Test und Survivin mittels ELISA bestimmt und miteinander verglichen.

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

- Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität der beiden Tests?
- Sind die Tests zur Früherkennung in der Praxis geeignet?
- Welche Parameter beeinflussten bei der Erhebung der Messwerte das Ergebnis?
- Reicht die Performance einer der beiden Marker zur Früherkennung aus?
- Ist eine quantitative UBC® Rapid Test Auswertung wirklich notwendig, wenn bereits die visuell qualitative Auswertung mittels Testkassette vorliegt?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Diese Fall – Kontroll - Studie wurde anhand von 292 Patientendaten, die die Einschlusskriterien erfüllten, des Lukaskrankenhauses Neuss durchgeführt, davon 111 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom und 133 Kontrollpatienten. 48 Patienten wurden ausgeschlossen, da sie mit Verdacht auf einen Blasentumor oder zur Nachresektion bei Zustand nach TUR – Blase vor sechs Wochen reseziert wurden, es sich jedoch kein Anhalt für Malignität in der Histologie zeigte. Die Harnblasenkarzinome wurden per histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen des resezierten Gewebes durch den Pathologen bestätigt. Der Urin wurde vor der transurethralen Resektion gewonnen. Es erfolgte ein matching nach Alter und Geschlecht. Die Patientendaten wurden von Januar 2014 bis Juli 2015 erhoben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg (AS 147(bB)/2013) und der Ruhr Universität Bochum (4785-13) genehmigt.

Es erfolgte das Patienteneinverständnis.

Alle Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen Harnblasenkarzinom erhielten eine leitliniengerechte Diagnostik und Therapie: Zystoskopie, Ultraschall der Blase und Nieren und TUR – B bei weiteren auffälligen Befunden.

Die Ausschlusskriterien für den UBC® Rapid Test lauteten:

1. Manipulationen am Urogenitaltrakt, wie z.B. Zystoskopien, transrektaler Ultraschall, liegender Harnblasenkatheter, Operation, Instillation von bspw. BCG oder Mitomycin innerhalb von zehn Tagen vor der Urinabgabe
2. Weitere Kriterien waren: benigne Prostatahyperplasie, Nieren- / Harnleiter- / Blasensteine, andere Tumorerkrankungen, Diabetes mellitus, Harnwegsinfektionen, Neoblase, Spermakontamination und Schwangerschaft, Temperaturen > 40°C und anästhesierende Gels

Diabetes – Patienten und Patienten mit einer Harnwegsinfektion wurden explizit nicht ausgeschlossen, da Diabetes als Volkskrankheit [73] häufig vorkommt und Harnwegsinfektionen oft mit einem Harnblasenkarzinom vergesellschaftet sind [18].

Für die Kontrollgruppe galten identische Ausschlusskriterien. Das Patientenkollektiv dafür wurde aus anderen Fachabteilungen des Lukaskrankenhauses rekrutiert. Von einem Großteil wurde der Urin vor einer elektiven OP abgenommen.

Die Anamnesedaten, die bei der Patientenaufnahme erhoben wurden, wie z.B. Alter, Geburtsdatum, Geschlecht, Größe, usw. sind im Anhang I Patientenbogen dargestellt.

2.2 UBC® Rapid Test

Der UBC® Rapid Test (concile GmbH, Freiburg / Breisgau, Deutschland) wurde gemäß den zuvor beschriebenen Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Die Testkassetten wurden mit dem photometrischen Point-of-Care (POC) -System concile® Ω100 reader (concile GmbH) nach Herstellerangaben ausgelesen, was eine quantitative Analyse der Testergebnisse ermöglichte. Es handelt sich um einen kommerziell erhältlichen Point-of-Care-Test, bei dem die Zytokeratinfragmente 8 und 18 im Urin gemessen werden. Er soll zur Diagnose und Nachkontrolle bei Patienten mit Harnblasenkarzinom dienen.

Kostengünstigkeit und Benutzerfreundlichkeit sind Faktoren, die die Implementierung in der Routinediagnostik unterstützen würden.

2.2.1 Testprinzip

Der UBC® Rapid Test basiert auf der Immunchromatographie.

Die Testvorrichtung beinhaltet eine chromatographische Membran, mit zwei immobilisierten Antikörper enthaltene Zonen, ein rehydriertes mobiles Konjugat und einen Filter. Zur Durchführung des Tests werden einige Tropfen einer verdünnten Urinprobe in das Probenfenster der UBC® Rapid-Testvorrichtung gegeben. Die Probe fließt durch den Filter und wird von der Membran adsorbiert, wo sie in Kontakt mit den verschiedenen Reagenzzonen kommt. In der ersten Zone wird das Konjugat rehydriert und eine Urinprobe, die die Zytokeratinfragmente 8 und 18 enthält, reagiert mit den spezifischen goldmarkierten Antikörpern und bildet mit diesen einen Komplex. Dieser Komplex wandert zur ersten Reaktionszone, der Testlinie, wo er an einen anderen spezifischen Antikörper bindet, sodass die zwei Antikörper und die Zytokeratinfragmente eine Art Sandwich bilden.

Dies ist als Linie sichtbar und bedeutet ein positives Ergebnis. Der Überschuss an goldmarkierten Antikörpern wandert weiter in die zweite Reaktionszone, die Kontrolllinie, wo er an einen Mausantikörper bindet und eine zweite Linie bildet“ (a).

2.2.2 Probengewinnung und –lagerung

Der Urin wird in einem sterilen Urinbecher gesammelt. (Urinbecher der Marke Sarstedt)

Es wird Mittelstrahlurin verwendet. Ein Mindestvolumen von 0,5 ml ist notwendig.

Gekühlt (bei 2 – 8 °C) ist die Probe bis zu 3 Tagen haltbar.

Da der Urin für die Survivin – Testung schnell verarbeitet werden musste, (gekühlt innerhalb von ca. 4 Stunden bei +4 °C) wurde dieser Zeitrahmen auch bei der Verarbeitung der Proben für den UBC® Rapid Test nicht überschritten.

2.2.3 Inhalt des Kits

UBC®-Rapid Cassettes: 1 Kassette und eine Pipette, verpackt in einer Folientasche

UBC®-Rapid Diluent: Fläschchen mit proteinstabilisierendem Puffer (pH 7,4) mit Konservierungsmittel (0,5 ml) in einem Plastikbehälter

Der Test ist bis zum Verfalldatum haltbar, die Lagerung sollte bei 2 – 25 °C erfolgen.

UBC® concile® omega 100 Reader (quantitative Auswertung) Point of care Test.

Testdurchführung:

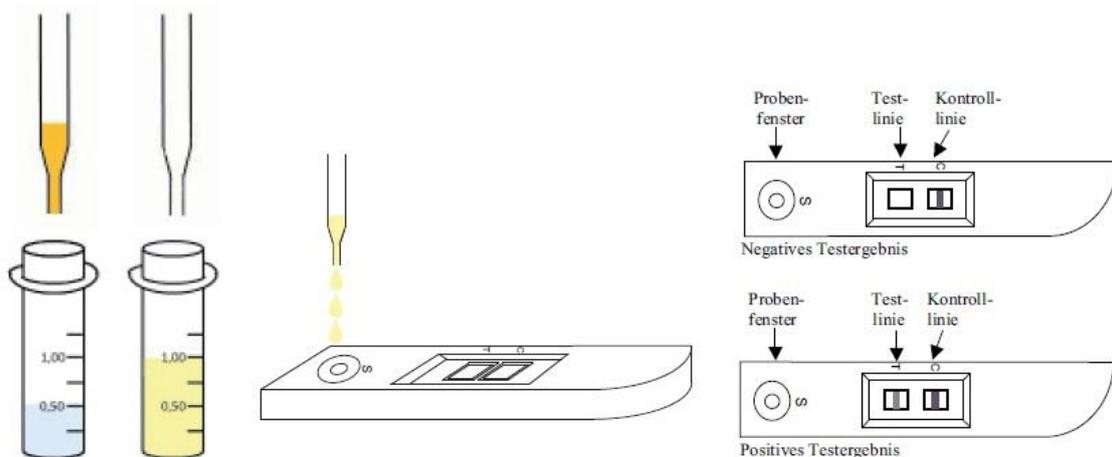


Abbildung 3: Durchführung UBC® Rapid Test und optische Auswertung (qualitativ) (a)

Der Test ist bei Raumtemperatur durchzuführen (22 +/- 6 °C).

Zunächst werden Einmalhandschuhe angezogen. Der zu untersuchende Urin wird auf Raumtemperatur gebracht, um Kondensationen zu vermeiden. Die geöffnete Kassette wird sofort nach dem Öffnen verwendet und mit den korrekten Patientendaten versehen. Nun wird der Urin des Patienten bis zur 1 ml - Marke in den UBC®-Rapid Diluent – Behälter pipettiert. Die Lösung wird daraufhin vorsichtig gemischt. Daraufhin werden drei Tropfen des verdünnten Urins in das Probefenster gegeben. Pro Patient wird jeweils eine neue Pipette und Kassette verwendet. Das Ergebnis muss nach 10 Minuten abgelesen werden.

Interpretation des Testergebnis (siehe Abb.3):

Wenn sowohl eine sichtbare Testlinie und eine sichtbare Kontrolllinie erscheinen, ist das Ergebnis als positiv zu werten. Erscheint nur die Kontrolllinie, ist das Ergebnis negativ. Falls keine Linie erscheint, ist das Ergebnis ungültig. Auch eine schwach ausgeprägte Linie (= leicht positiv) zeigt ein positives Testergebnis an.

Im Anschluss wird die Testkassette, nach Eingabe der Patientendaten, in den concile omega 100 Reader eingelegt, um eine quantitative Messung durchzuführen. Das Ergebnis inklusive der Patientendaten konnte direkt gedruckt und gespeichert werden.

Der Reader arbeitet auf Basis 2 - dimensionaler CCD – Sensoren mittels Photometer. (Abb. 4)



Abbildung 4: Concile omega 100 Reader (a)

2.3 Survivin

Die Messung des Antiapoptosemarkers Survivin (Protein) wurde mittels AK – ELISA durchgeführt.

Der ELISA war bereits zu Beginn der Arbeit durch das IPA Bochum etabliert, stand somit zum Nachweis von Survivin zur Verfügung und wurde dort in Kooperation durchgeführt.

Die Sammlung und Aufbereitung bis hin zum Einfrieren der Urinproben erfolgte im Tissue Engineering Labor des Lukaskrankenhauses Neuss.

Da für diesen Test noch keine Ausschlusskriterien etabliert waren, wurden hier ebenfalls die Kriterien des UBC® Rapid Tests angewandt.

2.3.1 Erforderliches Material

sterile Urin-Sammelbecher, 100 ml

Falcon-Tubes, 50 ml

Cryotubes, 2 ml

RNAlater (in 2 ml-Cryotubes vorgelegt)

Phosphatgepufferte Salzlösung

Einweg-Transferpipetten (Eppendorf, LD-PE, 3,5 ml)

Zentrifuge mit Ausschwingrotor (für 50 ml Falcon-Tubes)

Gefrierschrank (-20°C)

2.3.2 Uringewinnung

Die Uringewinnung erfolgte analog der Sammlung des Urins bei UBC® Rapid in einem sterilen Plastikgefäß mit Schraubdeckel.

Es wird ebenfalls Mittelstrahlurin empfohlen. Die Menge sollte möglichst 100 ml betragen.

Die Uhrzeit der Probenentnahme wurde gemäß Laborlaufzettel (siehe Anhang II) dokumentiert. Die für die Routinediagnostik des Urins (Urinstatus, -sediment, mikrobiologische Untersuchung) erforderlichen Mengen wurden anschließend abgenommen. Da bei wenigen Patienten nicht die empfohlene Mindestmenge an Urin gewonnen werden konnte, musste auf einen Teil der Routine - Urinuntersuchungen verzichtet werden. Zumeist wurde die mikrobiologische Untersuchung ausgelassen, da diese einen Großteil der Urinmenge benötigte. Der Urinstatus war für die klinische Routine obligat.

2.3.3 Urinaufbereitung

Der Urin wurde umgehend durchmischt und zwei Milliliter mit einer Pipette abgenommen und in ein zwei Milliliter - Cryotube überführt (Vollurin). Dieses zwei ml - Cryotube wurde sofort bei -20 °C gelagert. Der restliche Urin wurde direkt im Anschluss mit einer Pipette zu gleichen Teilen auf zwei 50 ml Falcon Gefäße aufgeteilt. Die Proben wurden sofort weiterverarbeitet.

Die Falcon - Tubes wurden für zehn Minuten bei 1500 x g in einer Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor bei 10 °C zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde auf eine mittlere

Einstellung gesetzt. Die Uhrzeit der Zentrifugation wurde im Probenlaufzettel (siehe Anhang II) festgehalten.

Die beiden Überstände wurden direkt im Anschluss an die Zentrifugation vorsichtig und möglichst vollständig in einen Sammelbecher dekantiert. Der Becher und das Pellet standen dabei auf Eis.

2.3.4 Pellets

Die verbleibenden Pellets aus der Zentrifugation wurden zügig verarbeitet. Dazu wurde jedes Pellet im Resturin resuspendiert. Die zwei Pellets wurden im Folgenden getrennt voneinander behandelt:

Das erste Pellet wurde in ein zwei ml - Cryotube überführt, welches bereits 1,6 ml RNAlater enthielt. Der Inhalt des Tubes wurde gründlich gemischt. Die Probe mit RNAlater wurde zunächst über Nacht bei 4 °C gelagert und dann bei -20 °C eingelagert. Erfolgte die Probennahme an einem Freitag, konnte das zwei ml – Tube über das Wochenende bei 4 °C weiterhin im Kühlschrank gelagert werden und am darauffolgenden Montag zur Lagerung bei -20 ° C überführt werden. Dies wurde ebenfalls auf dem Probenlaufzettel dokumentiert.

Die temporäre Lagerung bei 4 ° C diente dem besseren Eindringen des RNAlater in die Zelle. Das zweite Pellet wurde in ein zwei ml - Cryotube überführt. Anschließend wurde zu diesem Pellet PBS gegeben, sodass das Endvolumen ca. 1 ml beträgt. Der Inhalt des Tubes wurde gründlich gemischt und direkt bei -20 °C eingelagert.

2.3.5 Überstände

Die im Sammelbecher vereinigten Überstände wurden ebenfalls zügig verarbeitet. Dazu wurden diese für das Biobanking aliquotiert. Es wurden vier zwei ml - Aliquots zurückgestellt. Die Tubes mit den Überständen wurden sofort bei -80 °C eingefroren.

Dieser Vorgang wurde ebenfalls auf dem Probenlaufzettel dokumentiert. (siehe Anhang II)

2.3.6 ELISA

2.3.6.1 Material

Geräteliste:

Platte: Maxisorp Nunc-Immuno Module 469949

Washer: Hydro Flex – Tecan

Reader: Spectra_{max} Plus – Molecular Devices

Besondere Reagenzien:

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium *salt* – Sigma Aldrich

STRP-HRP: Streptavidin Poly-HRP80 Conjugate (65R-S105PHRP)

Survivin-AK: Eigenproduktion IPA

PBST: PBS mit 0,05% Tween-20

2.3.6.2 Herstellung des Survivin-AK (IPA Bochum)

Die Survivin Template-cDNAs (BIRC5) wurden von Sino Biologicals, Peking, China bezogen. Die Survivin-kodierende DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Primer p1 (5'-GTATACCATATGGGTGCCCGG-3') und p2 (5'-CGGATCCTCAATCCATGGCAGC-3') amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) für eine In-Frame-Ligation in den Vektor pET16b (Merck Millipore Novagen, Darmstadt, Deutschland) kloniert. Daraus resultierte ein Fusionsprotein bestehend aus einem n-terminalem Polyhistidin-tag und dem Survivin Protein.

Die Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das resultierende pET16b_His-Survivin-Plasmid wurde in Zellen von E. coli BL 21 CodonPlus RIPL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) zur heterologen Proteinexpression transformiert. Die Zellen einer 1 l-Kultur wurden gewonnen und durch Harnstoffdenaturierung in 20 mM Hepes, 100 mM NaCl (pH 8) lysiert. Die Reinigung des His₁₀-Survivin-Fusionsproteins wurde, wie von Shen C et al. beschrieben, durchgeführt [86]. Kurz zusammengefasst wurde Zelllysat zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der lösliche Überstand wurde auf eine Affinitätschromatographiesäule (HisTrap HP, GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Nach dem Waschen wurde das gereinigte Protein mit Elutionspuffer (20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 250 mM Imidazol, pH 8) eluiert. Affinitätsgereinigtes His₁₀-Survivin zeigte eine hohe Reinheit und wurde weiter auf einer Größenausschluss-Chromatographiesäule (SuperdexTM 75, Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) zur Proteinrückfaltung verarbeitet. Das so gewonnene Survivin Protein wurde in PBS bei -20 ° C gelagert und für Immunisierung von Kaninchen zur Erzeugung von polyklonalen Antikörpern verwendet.

Die Immunisierung erfolgte bei Charles River (Charles River Laboratories, Chatillon-sur-Chalaronne, Frankreich) nach Standard-Immunisierungsprotokollen. Nach 70 Tagen erhielt man 90 ml Endsera und 20 ml davon wurden zur Antikörperreinigung weiterverarbeitet. Zu diesem Zweck wurden Seren auf eine Profinity-Protein-A-Säule (Bio-Rad, München, Deutschland) geladen, die mit einem Chromatographie-System (NGC Bio-Rad) verbunden war. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und die gereinigten Antikörper wurden mit 100 mM Glycin (pH 2,8) eluiert. Gereinigte Anti-Survivin-Antikörper wurden sofort gegen PBS dialysiert. Die finale IgG-Konzentration wurde mittels spektroskopischer Absorption bei 280 nm bestimmt und betrug 2,87 mg/ml.

Biotinylierung von Anti-Survivin-Antikörper:

Für die ELISA-Entwicklung wurde eine Teilmenge des Survivin-Antikörpers teilweise biotinyliert. Der gereinigte Antikörper wurde mit 33x molarem Überschuss von NHS-Biotin (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) in 10 mM NaHCO₃ (pH 8,4) gemischt, für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich gegen PBS dialysiert. Die Endkonzentration an biotinyliertem Antikörper betrug 2,18 mg / ml (5 ml).

2.3.6.3 Vorbereitung

Die eingefrorenen Proben wurden zunächst aufgetaut, danach gut gemischt und invertiert. Man entnahm 250 µl Suspension und überführte diese in ein Mikroreaktionsgefäß.

Um daraus ein neues Zellpellet herzustellen wurde das Gefäß fünf Minuten bei 1500 x g und + 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl CytoBuster resuspendiert. Dieses Gemisch wurde gewortext und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch erneute Zentrifugation bei 1500 x g bei +4 °C für zehn Minuten wurden unlösliche Bestandteile der Probe pelletiert. Der Überstand wurde via Vivaspin auf 50 µl aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde mit PBST ad. 250 µl versetzt.

Die verbleibende Menge an CytoBuster in der Probe hatte keinen Einfluss auf den ELISA.

2.3.6.4 Durchführung

Für das Coating wurde der Fang – Antikörper 1:5.000 in Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, pH 9,6) verdünnt und 100 µl jeweils in ein Well pipettiert.

Die Platte wurde nun über Nacht bei + 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde die Kopplungslösung verworfen und die Wells mit 200 µl Blocking Buffer (1,5% Casein in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Folge wurde die Platte dreimal mit 250 µl PBST gewaschen. Für die Referenzkurve wurden die Survivin - Standards frisch angesetzt. Der Referenzstandard 1 beinhaltete 5000 ng/ml Survivin. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) bis (Referenz-) Standard 9 angesetzt. Als Blank (Leerprobe) wurde PBST ohne Survivin verwendet.

Tabelle 4: Übersicht Referenzkurve/Standards

Name	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	Std8	Std9	Std10
Survivin [ng/ml]	5,000	2,500	1,2500	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,020	0

Jeweils 100 µl Standard und 100 µl Probe wurden in ein Well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 250 µl PBST gewaschen.

Der Detektionsantikörper (biotinylierter Anti-Survivin Antikörper) wurde 1:10000 in PBST verdünnt und 100 µl jeweils hinzugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Platte wurde erneut dreimal mit 250 µl PBST gewaschen.

Je Well wurden 100 µl STRP-HRP-Konjugat (zuvor 1:10000 in PBST verdünnt) hinzugegeben. Erneute Inkubation des Ansatzes für einer Stunde bei Raumtemperatur, danach erneutes dreimaliges Waschen der Platte mit 250 µl PBST. Zu jedem Well wurden 100 µl Substratlösung gegeben (1 Tablette ABTS aufgelöst in 12 ml 50 mM Phosphat-Citrat Puffer pH 4,2 und 6 µl 30% H₂O₂).

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 0,32% NaF gestoppt und die Absorption wurde bei 414 nm abgelesen. Eine 4 - Parameterkurve wurde mit Hilfe der Softmax Pro 5.4.1 Software berechnet.

Die untere Nachweisgrenze des Tests wurde basierend auf der Standardabweichung des Hintergrundwertes (= Blank) von 20 Platten definiert. Proben wurden als positiv für Survivin betrachtet, wenn die gemessene Konzentration über dem Grenzwert lag. Der Cut-off wurde als Nachweisgrenze definiert.

Die Reproduzierbarkeit der Survivin-Messung wurde mittels Proben verschiedenster Survivin-Konzentrationen getestet. Die Messungen wurden mit Proben durchgeführt, die eine niedrige (0,168 ng / ml), eine mittlere (0,667 ng / ml) und eine hohe (2,240 ng / ml) Survivinkonzentration aufwiesen.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Daten wurden mit SAS / STAT- und SAS / IML-Softwareversion 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), die Plots mit Graph – Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), der ELISA mit Softmax Pro 5.4.1 berechnet und für die weiteren Auswertungen und Darstellungen die Standardbürossoftware (Office, Word, Excel, Paint) verwendet.

Der Median- und Interquartilsabstand (IQR) wurde verwendet, um die Verteilung von kontinuierlichen Variablen zu beschreiben. Gruppen wurden unter Verwendung des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Spearmans Korrelationskoeffizienten (r_s) und 95% -Konfidenzintervalle wurden verwendet, um Rangkorrelationen zwischen Variablen zu beschreiben.

Die ROC – Kurve ist eine Methode zur Bewertung und Optimierung von Analyse-Strategien. Anhand der ROC – Analyse wurde die Leistung der einzelnen Biomarker und ihre Kombination ausgewertet. Für das Panel wurde eine „oder“ Kombination beider Marker verwendet.

Sie stellt visuell die Abhängigkeit der Effizienz mit der Fehlerrate für verschiedene Parameterwerte dar. In diesen Berechnungen wurden Spezifitäten bei gegebener Sensitivität verglichen. P – Werte $\leq 0,05$ werden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 244 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 111 Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen Harnblasenkarzinom und 133 Kontrollpatienten. Die Kontrollpatienten wurden nach Alter und Geschlecht den Tumorpatienten zugeordnet (matching). 83 der Tumorpatienten waren männlich, 28 weiblich; die Kontrollgruppe zählte 92 männliche und 41 weibliche Patienten (s. Tab. 5).

(Patienten, bei denen ein Urothelkarzinom vermutet wurde oder die sich in der Nachkontrolle (TUR – B) befanden, bei denen jedoch histologisch keine Malignität nachgewiesen wurde, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.)

Unter allen Gruppen betrug das mediane Urinvolumen 30 ml mit einer Retentionszeit von etwa 2 Stunden innerhalb der Blase vor der Entleerung. Der mittlere pH-Wert der Urinproben betrug 5,0 in allen Gruppen.

Tabelle 5: Charakteristika der Studienpopulation

	Tumorpatienten	Kontrollgruppe	Gesamtpopulation	P – value
Geschlecht	(absolut und in %)			
Männlich	83 (34%)	92 (37,7%)	175 (71,7%)	
Weiblich	28 (11,5%)	41 (16,8%)	69 (28,3%)	
Total	111 (45,5%)	133 (54,5%)	244 (100%)	0,333
Alter	(in Jahren)			
Median	74,1	71,5	73,0	
IQR	64,8 – 80,4	60,1 – 78,9	62,4 – 79,6	0,066
Raucher	(absolut und in %)			
Raucher	35 (14,4%)	31 (12,7%)	66 (27,1%)	
Ex – Raucher	51 (20,9%)	50 (20,5%)	101 (41,4%)	
Nie – Raucher	23 (9,4%)	52 (21,3%)	75 (30,7%)	
Keine Angabe	2 (0,8%)	0	2 (0,8%)	
Insgesamt	111 (45,5%)	133 (54,5%)	244 (100%)	

Tabelle 6: Charakteristika der Tumorgruppe

Merkmal	Status	Anzahl (abs. und in %)
Tumorstadium	pTa	61 (55%)
	pT1	14 (12,6%)
	pT2	23 (20,7%)
	pT3	9 (8,1%)
	nur CIS	3 (2,7%)
	keine Angabe	1 (1%)
Grading	G1	26 (23,4%)
	G2	58 (52,3%)
	G3	24 (21,6%)
	G4	1 (0,9%)
	keine Angabe	2 (1,8%)
EORTC – Risk (nur Ta und T1 – Tumore)	Low risk	9
	Intermediate risk	43
	High risk	27
Anzahl der Tumore in der Blase	1	50
	2-7	39
	≥ 8	8
	keine Angabe	14
Größe der Tumoren (Durchmesser)	Ø < 3 cm	56
	Ø > 3 cm	43
	keine Angabe	12
Anzahl Primärtumore vs. Rezidive	Primärtumor	58
	Rezidiv	52
	keine Angabe	1
Anzahl der Rezidive	1	25
	2	6
	3	6
	≥ 4	14
	keine Angabe	1
Makrohämaturie	Ja	66
	Nein	45

Algurie	Ja	33
	Nein	78
Pollakisurie	Ja	51
	Nein	60
Diabetes mellitus Typ II	Ja	12
	Nein	99

Der Altersmedian der Studienpopulation lag bei 73,0 Jahren bei einem IQR von 62,4 – 79,6 Jahren. Die Altersspanne betrug 26 – 92 Jahre. Die Aufteilung nach Tumorpatienten und Kontrollen ist Tabelle 5 zu entnehmen. Weder die Verteilung des Alters ($p = 0,066$), noch des Geschlechts ($p = 0,333$) waren signifikant.

Von den 111 Tumorpatienten hatten 55 ein low – grade und 55 ein high – grade Blasenkarzinom, bei einem Patienten war eine definitive Zuordnung nicht möglich.

79 Patienten (71,2%) wiesen ein nicht invasives Blasenkarzinom auf, 32 Patienten (28,8%) hatten einen muskelinvasiven Tumor.

Ein Carcinoma in situ (CIS) wurde insgesamt bei 16 (14,4%) Tumorpatienten diagnostiziert.

Das Risiko für ein Harnblasentumorrezidiv und das Fortschreiten in ein höheres Tumorstadium kann mit Hilfe des EORTC – Risk – Table für Ta und T1 - Tumore berechnet werden. Die Risikostufen unterteilen sich in low risk, intermediate risk und high risk.

Diese Einstufung basiert auf sechs verschiedenen Faktoren. Diese beinhalten die Anzahl der Tumore, die Tumorgröße, die Rezidivrate innerhalb eines Jahres, die T – Kategorisierung (Ta/T1), das Vorliegen eines CIS und das Grading [74].

Es konnte gezeigt werden, dass es eine signifikante Korrelation zwischen dem Ergebnis des UBC® Rapid Test ($p < 0,0002$) / Survivin – Test ($p < 0,012$) und des Risikostatus gibt, d.h. je größer das Risiko (LR - IR - HR), desto sicherer kann der Nachweis durch den UBC® Rapid Test bzw. Survivin-Test geführt werden.

Der Raucherstatus ist ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt. Wie Tabelle 6 zu entnehmen, befanden sich unter den 244 Patienten 27 mit einem Diabetes mellitus Typ 2, davon 12 in der Gruppe der Tumorpatienten und 15 in der Kontrollgruppe. Eine Harnwegsinfektion ließ sich bei insgesamt 17 Patienten nachweisen, jeweils 7 in der Gruppe der Tumorpatienten und 10 in der Kontrollgruppe.

3.2 UBC® Rapid Test – Auswertung

Die zunächst optische, qualitative Auswertung des UBC® Rapid ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 7: Optische Auswertung mittels qualitativem UBC® Rapid

	Positiv	Leicht positiv	negativ
Tumorpatienten	60	5	46
Kontrollgruppe	3	3	127

Nach der optischen Auswertung wurden mittels UBC® omega 100 Reader die Ergebnisse quantitativ erfasst. Der Cut – off – Wert wurde auf 10 µg/L festgesetzt.

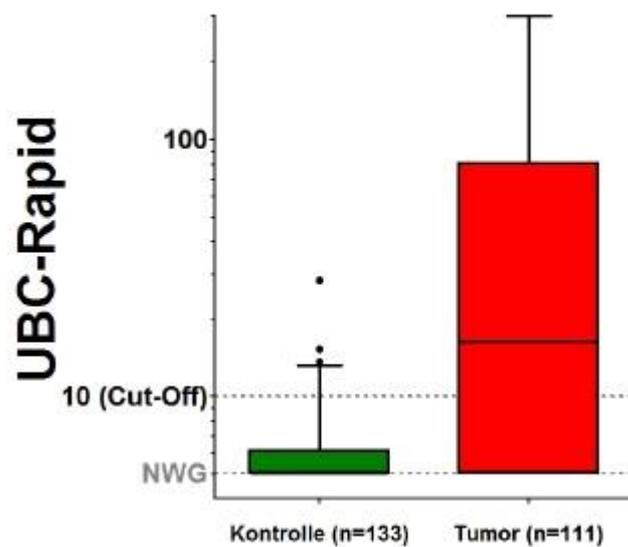


Abbildung 5: UBC® – Rapid Test Kontrollen vs. Tumorpatienten

Der mediane UBC® Rapid Wert betrug <5,0 mg/l für klinische Kontrollen und 16,3 mg/l für die Tumorgruppe.

Es ergab sich eine Sensitivität von 56%, eine Spezifität von 96%, ein PPV von 92,5% und ein NPV von 72,3% für den UBC® Rapid. Richtig positiv waren 62 der gemessenen Ergebnisse, 128 waren richtig negativ, falsch positiv waren 5 und falsch negativ 49. Wie ebenfalls bei Survivin beobachtet, stieg die Sensitivität des Tests bei high - grade Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen auf 73% an, bei low – grade Tumoren nahm sie ab (40%).

Vergleicht man die qualitative (optische) (71 pos. (incl. leicht pos.), 173 neg.) mit der quantitativen (Omega reader) (67 pos., 177 neg.) Auswertung, sind die Ergebnisse ähnlich, aber nicht gleich.

Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität des UBC® Rapid Test

Gruppe	Cut – Off	Sensitivität (in %)	Spezifität (in %)	Richtig pos. (n)	Richtig neg. (n)	Falsch pos. (n)	Falsch neg. (n)
Tumor vs. Kontrollen	10 mg/L	56	96	62	128	5	49
High - grade vs. Kontrollen	10 mg/L	73	96	40	128	5	15
Low – grade vs. Kontrollen	10 mg/L	40	96	22	128	5	33

Bezüglich des UBC® Rapid Test ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe. Die Werte bei den Tumorpatienten waren signifikant erhöht. Wie aus der Übersichtstabelle 9 ersichtlich, haben folgende Parameter keinen Einfluss auf die Testgenauigkeit: Diabetes, Harnwegsinfektionen, die Menge des Urins (Mittelwert: Tumorpatienten 26,9 ml, Mittelwert: Kontrollpatienten 34,1 ml)

oder die Urin – Retentionszeit (= Zeit der letzten Miktion bis zur Abgabe des Urins).

Die Kontrollpatienten haben im Mittel ein höheres Volumen an Urin abgegeben als die Tumorpatienten, dies beeinflusste das Testergebnis jedoch nicht (Der p-value in Tabelle 9 bezieht sich auf die OR).

Tabelle 9: Einflussfaktoren für den UBC® Rapid Test anhand logistischer Regression

		„Wahrscheinlichkeit für einen positiven Test“			Statistisch signifikant? p value
		OR	95% CI		
Kontrollen VS Tumor-Patienten					
Modell für UBC					
Konstante: UBC=ja		0,111	0,026	0,477	
Gruppe	Kontrolle	1			
	Tumor	33,513	11,94	94,067	<0,001
Menge Urin (ml)		0,999	0,974	1,025	0,957
Urin-Retentionszeit [h]		0,826	0,585	1,165	0,276
Diabetes mellitus Typ2	nein	1			
	ja	1,72	0,482	6,133	0,403

Ebenfalls wurde eine ROC – Analyse durchgeführt (Abb. 6).
Dabei wurde eine AUC für UBC® Rapid von 0,77 berechnet.

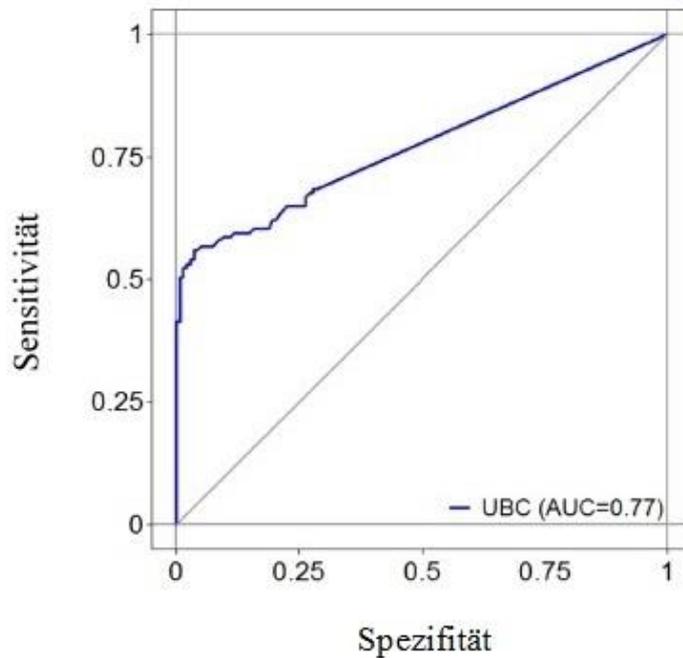


Abbildung 6: ROC – Analyse mit AUC für UBC® Rapid

Die folgenden Boxplot – Diagramme zeigen die Variation der UBC® Rapid – Werte in Abhängigkeit von der Risikostratifizierung nach EORTC (Abb. 7) und des Gradings (Abb. 8). Es konnte gezeigt werden, dass die UBC® Rapid – Werte, v.a. in der Hochrisikogruppe und bei den high – grade Tumoren deutlich höher sind, als der Cut – Off – Wert und die Werte der Kontrollgruppe.

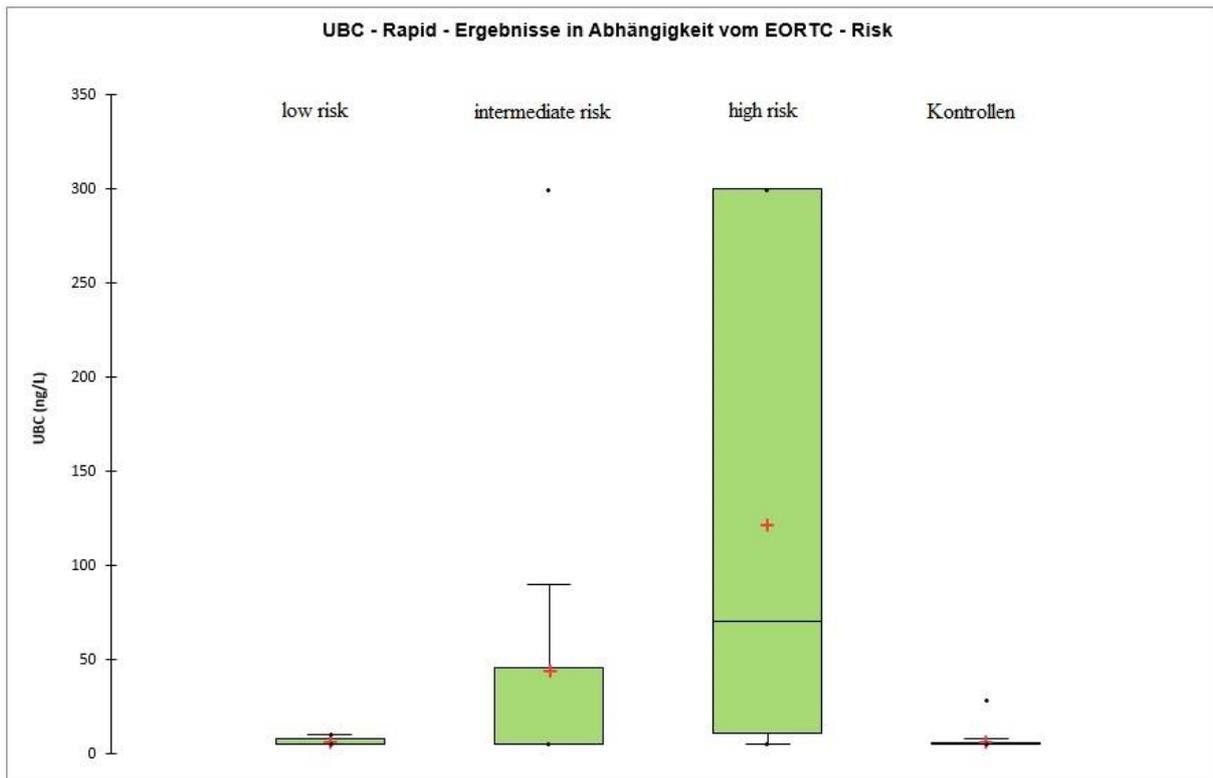


Abbildung 7: Box - Plot – Diagramm UBC® Rapid Test EORTC – Risk

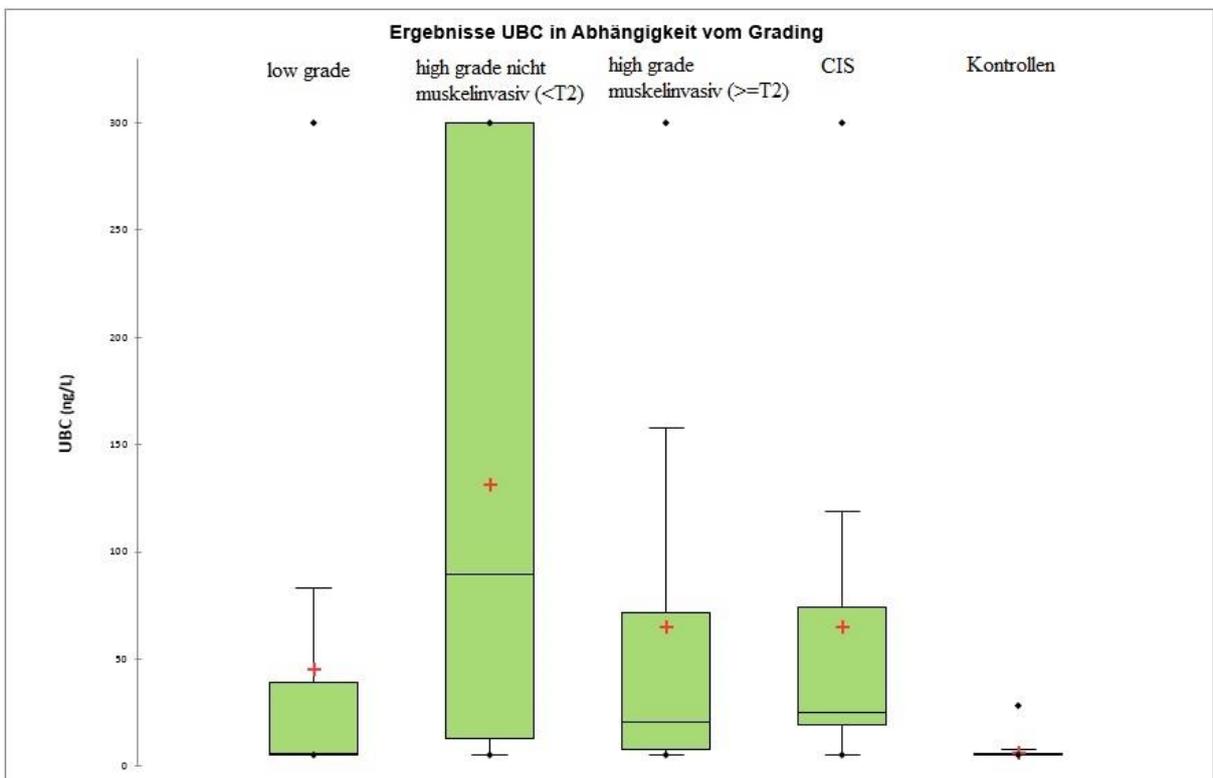


Abbildung 8: Box – Plot – Diagramm UBC® Rapid Test Grading

3.3 Survivin – Auswertung

Survivin Herstellung und ELISA – Entwicklung:

Nach Klonierung, Expression und Affinitätsreinigung ergaben sich etwa 2,5 mg His10-Survivin-Fusions-Protein, das für die Antikörperbildung in Kaninchen geeignet war.

Die Antikörper wurden zur Anwendung in einem Sandwich-ELISA gereinigt und teilweise biotinyliert. Für Anti-Survivin-Antikörper wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet. Das beste Signal-Rausch-Verhältnis ergab sich bei einer Verdünnung von 1:5000 für den Fangantikörper und einer Verdünnung von 1:10.000 für den Nachweisantikörper.

Die resultierende sigmoide Kurve konnte im Bereich von 0,025-5 ng/ml interpoliert werden, mit einer Nachweisgrenze (LoD) von etwa 0,033 ng / ml für den neuen Survivin-ELISA. (Abb. 9)

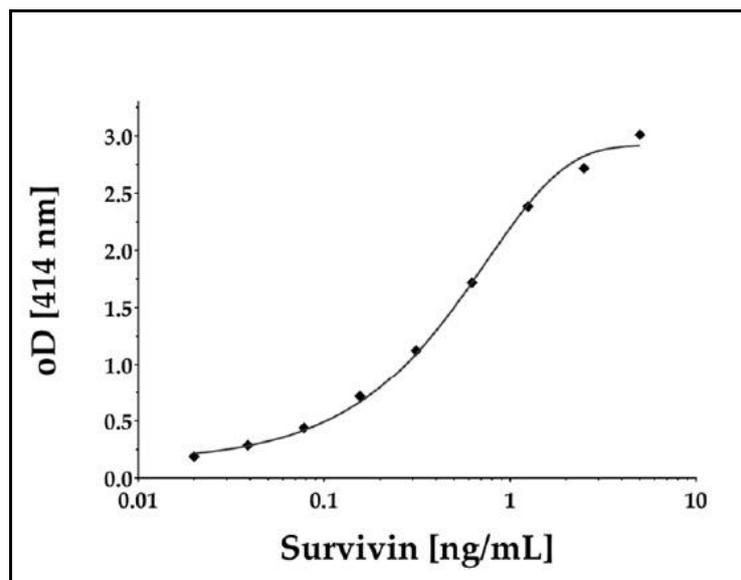


Abbildung 9: Vier - Parameter - Kurve für den Survivin – ELISA

Dieser ELISA wurde mit den kommerziell erhältlichen Survivin-ELISA-Kits von R&D und EnzoLife Sciences verglichen. Die Standardkurve des vom IPA entwickelten ELISA war vergleichbar mit der der kommerziellen ELISA-Kits. Die Reproduzierbarkeit des neuen Survivin-ELISA wurde untersucht, indem drei definierte Proben mit niedrigen, mittleren und hohen Survivinkonzentrationen mehrere Male gemessen wurden (n = 24). Die resultierenden Variationskoeffizienten (CVs) betragen 7,2% für das Niedrig-, 4,6% für das Medium- und 6,5% für das Hochkonzentrationsmuster. Zusätzlich wurde die Wiederholbarkeit mit zwei verschiedenen Proben der mittleren Survivinkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten

getestet. Die resultierenden Variationskoeffizienten betragen 8,8% und 19,4%. Zusätzlich wurden Matrixeffekte durch Spike-In-Experimente untersucht. Definierte rekombinante Survivinkonzentrationen wurden in Survivin-freie Urinproben gespiked. Die Verwertungsquote lag zwischen 74,8 und 88,9%.

Auswertung Survivin:

Analog der statistischen Auswertungen für UBC® Rapid Test wurden folgende Daten für Survivin erhoben.

Der Nachweis von Survivin im Urin mittels ELISA gelang am besten aus dem Zellpellet im Gegensatz zum Überstand oder Vollurin. Im vom IPA etablierten ELISA lag die Nachweisgrenze von Survivin bei 0,033 ng/ml für beide Gruppen (Abb. 10). In dieser Studie zeigte sich bei angegebenem cut – off Wert von 0,033 ng/ml eine Sensitivität für Survivin von 35%, eine Spezifität von 98%, ein PPV von 95,1 % und ein NPV von 64,5% (Tab. 10).

Das Tumorstadium hatte einen Einfluss auf die Markerleistung, so lag die Sensitivität für high - grade Tumore bei 51%, die der low – grade Tumoren nur bei 18% (Tab. 10).

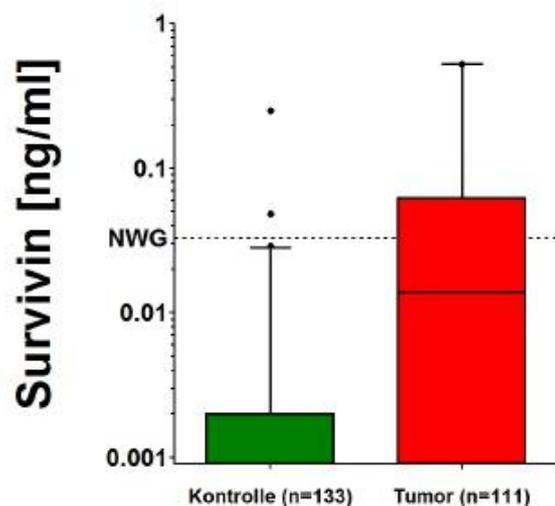


Abbildung 10: Survivin: Kontrollen vs. Tumorpatienten

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität für Survivin

Gruppe	Cut – Off	Sensitivität (in %)	Spezifität (in %)	Richtig pos. (n)	Richtig neg. (n)	Falsch pos. (n)	Falsch neg. (n)
Tumor vs. Kontrollen	0,033 ng/mL	35	98	39	131	2	72
High - grade vs. Kontrollen	0,033 ng/mL	51	98	28	131	2	27
Low – grade vs. Kontrollen	0,033 ng/mL	18	98	10	131	2	45

Der Survivin ELISA wies ebenfalls eine Signifikanz ($p < 0,001$) für die Detektion von Harnblasenkarzinomen im Vergleich der Tumorgruppe zu den Kontrollpatienten auf. Die Übersichtstabelle 11 zeigt den Einfluss verschiedener Parameter auf die Testgenauigkeit, wie z.B. Urinmenge, Urin – Retentionszeit und Diabetes mellitus.

Das Vorliegen eines Diabetes Typ 2, Retentionszeit in der Blase, Geschlecht und Urinmenge hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse. (Der p-value in Tabelle 11 bezieht sich auf die OR).

Tabelle 11: Einflussfaktoren für Survivin anhand logistischer Regression

Kontrollen VS Tumor-Patienten		„Wahrscheinlichkeit für einen positiven Test“			Statistisch signifikant?
		OR	95% CI		p value
Modell für Survivin					
Konstante: Survivin_cutoff_LOD=ja		0,006	0,001	0,047	
Gruppe	Kontrolle	1			
	Tumor	43,148	9,548	194,987	<0,001
Menge Urin (ml)		1,037	1,007	1,068	0,016
Urin-Retentionszeit[h]		0,743	0,485	1,137	0,171
Diabetes mellitus Typ2	nein	1			
	ja	2,265	0,605	8,482	0,225

Auch für Survivin wurde die AUC (0,77) mittels ROC – Analyse berechnet (Abb. 11)

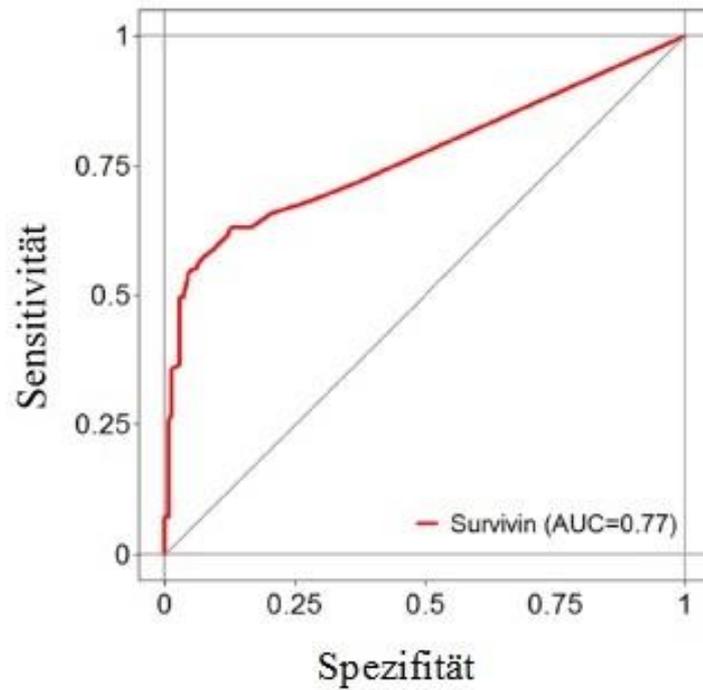


Abbildung 11: ROC – Analyse mit AUC für Survivin

Die folgenden Boxplot – Diagramme zeigen die Variation der Survivin – Werte in Abhängigkeit von der Risikostratifizierung nach EORTC (Abb. 12) und des Gradings (Abb. 13). Es konnte auch für Survivin gezeigt werden, dass die Werte v.a. in der Hochrisikogruppe und bei den high – grade Tumoren deutlich höher sind, als der Cut – Off – Wert und die Werte der Kontrollgruppe.

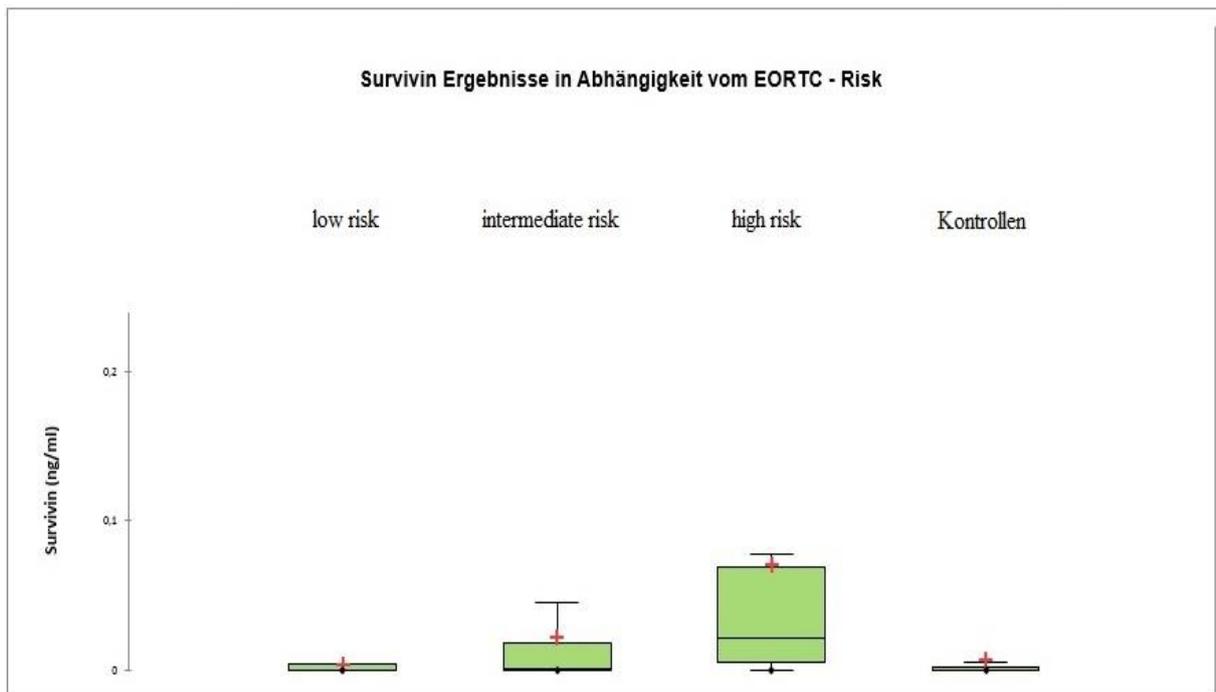


Abbildung 12: Box - Plot – Diagramm Survivin EORTC - Risk

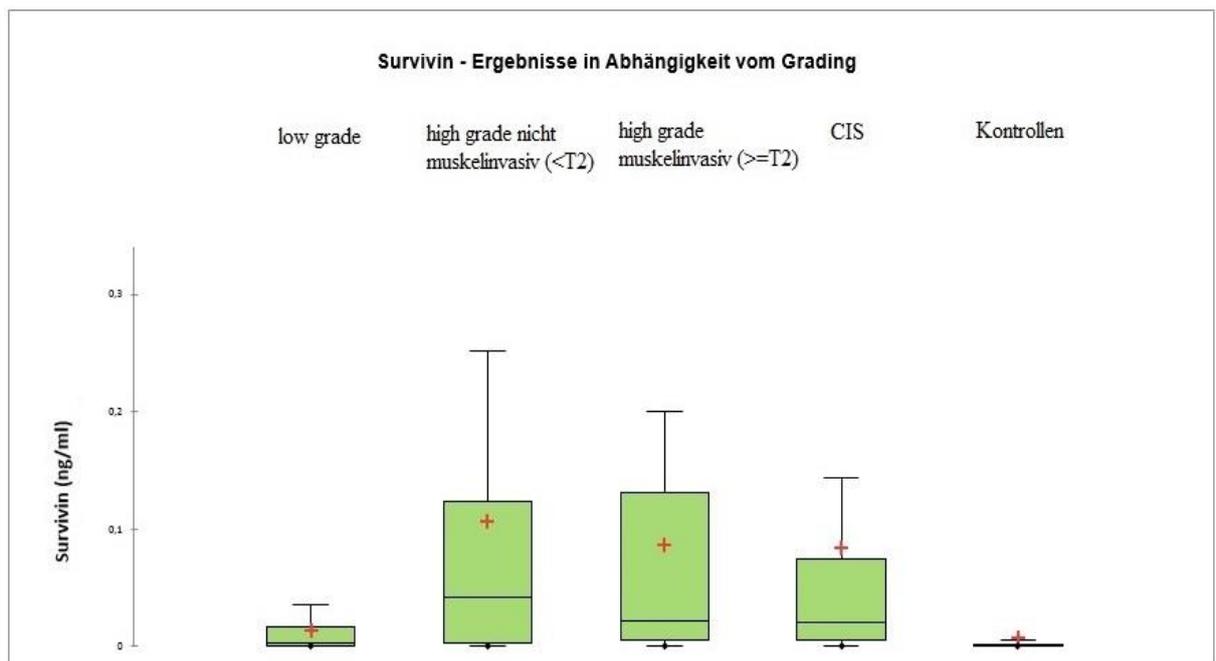


Abbildung 13: Box – Plot – Diagramm Survivin Grading

3.4 Kombination der Tumormarker UBC® Rapid und Survivin

Aufgrund der generell eingeschränkten Leistungsfähigkeit einzelner Biomarker-Assays wurden auch die möglichen Vorteile einer Kombination von Biomarkern untersucht. Nach aktuellem Stand ist dies der erste Ansatz, Survivin und UBC® Rapid als Panel zu untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Marker eine Signifikanz ($p < 0,001$) für die Detektion von Harnblasenkarzinomen im Vergleich der Tumorgruppe zu den Kontrollpatienten aufweisen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Signifikanzen UBC® - Rapid und Survivin

Variable	Total			Tumor			Kontrolle			P-Wert (KWT)
	N	Median	IQR	N	Median	IQR	N	Median	IQR	
Survivin im Pellet [ng/ml] (0.033 LOD, 0.1 LOQ)	244	0	0 - 0.01	111	0.01	0 - 0.06	133	0	0 - 0	<0.001
UBC - Rapid Reader [mg/L]	244	5	5 - 13.55	111	16.3	5 - 80.8	133	5	5 - 6.1	<0.001

Durch die Kombination beider Tumormarker konnte durch die ODER - Verknüpfung die Sensitivität auf 66% angehoben werden bei einer Spezifität von 95%. Die Sensitivität von high – grade Tumoren stieg auf 82% bei gleichbleibender Spezifität.

Durch die UND – Verknüpfung konnte die Spezifität auf 99% angehoben werden bei einer Sensitivität von 25%.

Eine Komplettübersicht über die Sensitivität und Spezifität beider Marker sowie deren Kombination zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Tabellarische Gegenüberstellung Survivin, UBC® Rapid und deren Kombinationen

		YI	Sensitivity	Specificity	True-positive	True-negative	False-positive	False-negative
			(%)	(%)	(N)	(N)	(N)	(N)
Survivin	Tumor vs Kontrollen	0.34	35	98	39	131	2	72
UBC	Tumor vs Kontrollen	0.52	56	96	62	128	5	49
Kombination Tumor vs Kontrollen	“and”	0.24	25	99	28	132	1	83
	“or”	0.61	66	95	73	127	6	38

Tabelle 14: Sensitivität und Spezifität Survivin oder UBC® Rapid in Kombination

<i>Gruppe</i>	<i>Cut Off</i>	<i>–</i>	<i>Sensitivität (in %)</i>	<i>Spezifität (in %)</i>	<i>Richtig pos. (n)</i>	<i>Richtig neg. (n)</i>	<i>Falsch pos. (n)</i>	<i>Falsch neg. (n)</i>
Tumor vs. Kontrollen	Sur. or UCB	or	66	95	73	127	6	38
High - grade vs. Kontrollen	Sur. or UCB	or	82	95	45	127	6	10
Low – grade vs. Kontrollen	Sur. or UCB	or	49	95	27	127	6	28

Das Venn – Diagramm (Abb. 14) zeigt, dass 28 der Tumoren von beiden Markern richtig positiv erkannt wurden. Nur eine Kontrolle wurde als falsch positiv von Survivin und UBC® Rapid detektiert. UBC® Rapid alleine ermittelte zusätzlich 34 Tumorpatienten korrekt (true positiv), Survivin 11, sodass insgesamt 73 von 111 Harnblasenkarzinompatienten (66%) durch beide Urinmarker erfasst wurden. Survivin stuft zusätzlich 1, UBC® Rapid 4 Kontrollpatienten als falsch positiv ein. Insgesamt wurden 38 Tumorpatienten von keinem der beiden Tests als positiv erkannt, 127 Kontrollen wurden als korrekt negativ bestimmt.

Testergebnisse: Fälle vs. Kontrollen (N=244)

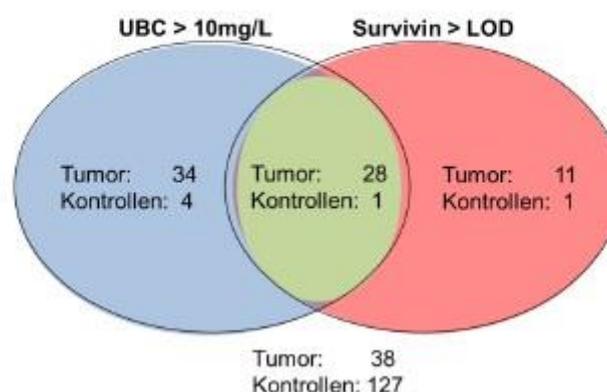


Abbildung 14: Venn – Diagramm: Testergebnisse: Fälle vs. Kontrollen (n=244)

Die ROC – Analyse mit der AUC für jeden Marker einzeln und in Kombination ist in Abb. 15 dargestellt. Sie beträgt für jeden Marker einzeln jeweils 0,77 und kann in Kombination auf 0,84 angehoben werden.

Aus der ROC-Analyse konnte für die Kombination eine AUC von 0,84, eine Sensitivität von 66% und eine Spezifität von 95% abgeleitet werden. Der Unterschied zwischen den einzelnen Markern AUC und AUC der Kombination ist statistisch signifikant (Kombination vs. Survivin: $p = 0,0025$; Kombination vs. UBC® Rapid: $p = 0,0005$). Der Vergleich von hochgradigen Tumoren mit Kontrollen ergab eine AUC von 0,91, eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 95%. Hier war der Unterschied zwischen der Einzelmarker-AUC und der Kombinations-AUC nicht signifikant (Kombination vs. Survivin: $p = 0,1826$; Kombination vs. UBC® Rapid: $p = 0,0685$).

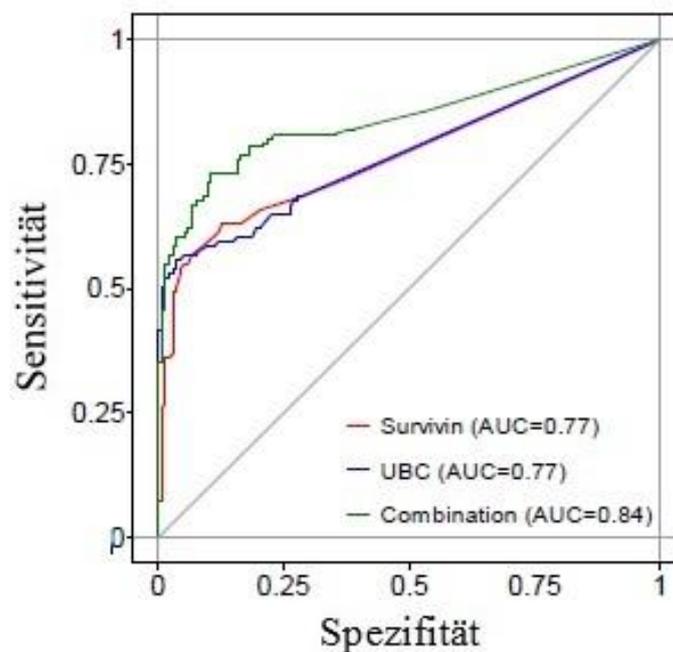


Abbildung 15: ROC – Analyse mit AUC für Survivin, UBC® Rapid und in Kombination

3.5 Möglicher Einfluss durch Hämaturie

Die Hämaturie könnte Einfluss auf die Biomarkerleistung haben. Daher wurde die Auswirkung einer Hämaturie in der Kontrollgruppe überprüft. Von den 133 Kontrollpatienten hatten 28 Erythrozyten in ihrem Urin (zwischen 5 und 250 Zellen (Urinstix)). Die Medianmarkerkonzentrationen der Kontrollen mit und ohne Hämaturie zeigten für beide Marker keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,451$ für Survivin und $p = 0,4121$ für UBC® Rapid).

4 Diskussion

4.1 Patientenkollektiv

Der Altersmedian der Gesamtpopulation dieser Studie lag bei 73 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter für ein Harnblasenkarzinom liegt laut Literatur bei 73 – 77 Jahren [2]. Diese Studie ist somit repräsentativ für die Population von Patienten mit Harnblasenkarzinom in Deutschland, obwohl Patienten sowohl mit Erstdiagnose als auch Patienten mit Rezidiven eingeschlossen wurden. Das Verhältnis Männer zu Frauen liegt beim Harnblasenkarzinom bei 4:1 [1]. Bei dieser Untersuchung lag das Verhältnis Männer zu Frauen in der Tumorgruppe (n = 111) bei ca. 3:1.

Auch die Verteilung des Tumorstadiums und des Gradings entspricht in etwa den bekannten Daten für Patienten mit Harnblasenkarzinom in Deutschland.

4.2 Urinmarker allgemein

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit [75].

Der aktuelle Goldstandard für den Nachweis ist die Zystoskopie und Zytologie. Diese Methoden werden routinemäßig bei Patienten mit Hämaturie oder bei Verdacht auf ein Blasenkarzinom angewandt [2]. Klinische Symptome treten eher in späteren Stadien der Tumorentwicklung auf. Biomarker haben das Potenzial, Krebs in früheren Stadien nachzuweisen, was eine frühere und daher kurative Therapie ermöglicht, die idealerweise zu einer verringerten Mortalität oder einem erniedrigten Rezidivrisiko führt. Dadurch könnte die Anzahl invasiver diagnostischer Verfahren reduziert werden [76].

Der Urin stellt eine ideale Quelle für Biomarker dar, da er nicht invasiv gewonnen werden muss. Die Marker könnten so zum Nachweis oder zur Überwachung (Rezidive) von Urothelkarzinomen dienen [77].

Medizinisch sinnvoll ist das Screening auf Blasenkrebs vor allem für Hochrisikogruppen, z.B. Personen mit einer hohen Rezidivrate oder einer früheren Exposition gegenüber Karzinogenen. Beispiele für urinbasierte Biomarker, die für das Screening vorgeschlagen wurden, sind UroVysion, uCyt + oder NMP22 [40] [78].

Die aktuellen Leitlinien empfehlen Urinmarker nur als zusätzliche Diagnostik zur Zystoskopie, da diese (noch) keine ausreichende Genauigkeit aufweisen [2] [79] [80] [81].

Die in der Literatur beschriebenen neueren Verfahren, wie z.B. FISH oder die Immunzytologie weisen im Vergleich zur Zytologie eine bessere Sensitivität auf [24] [82] [83]. Sie sind jedoch sehr zeit- und kostenaufwendig und benötigen gesonderte Laboreinrichtungen.

POC – Tests wurden entwickelt, um möglichst schnell und effizient ein Ergebnis zu erhalten. Das Hauptproblem dieser Tests ist jedoch, dass diese eine hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen aufweisen. Die Testgenauigkeit wird in der Praxis durch verschiedene Faktoren, wie mechanische Manipulation, andere Tumorerkrankungen, liegender Harnblasenkatheter, etc. negativ beeinflusst. Deshalb war das Vorliegen dieser Faktoren Ausschlusskriterium für die Aufnahme in diese Studie. Dies führte dazu, dass die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen mit $n = 5$ relativ gering war. Allerdings trat eine relativ hohe Rate an falsch negativen Ergebnissen auf ($n = 49$). Der Hauptanteil an falsch – negativen Ergebnissen stammte aus der Gruppe der low – grade Tumorpatienten meist mit kleinerem Tumor.

Dies könnte dadurch bedingt sein, dass bei kleineren oder genetisch stabilen Tumoren gar keine oder keine ausreichende Menge an Cytokeratin 8 + 18 und/oder Survivin für eine Detektion vorhanden ist.

Ein Problem für die Auswertung von Urinmarkern in früheren Studien war, dass nur die Bande optisch abgelesen und mit der Kontrollbande verglichen wurde. Dies ist jedoch beobachterabhängig und führt so zu einer hohen Variabilität der Ergebnisse [84] [85]. Um dieses Problem zu lösen, wurde in dieser Studie der concile omega 100 reader verwendet, der objektiv die Ergebnisse mittels CCD - Sensoren bestimmte und somit ein quantitatives Ergebnis lieferte.

4.3 Diskussion UBC® Rapid Test

Ziel dieser Arbeit war es u.a., die Performance des POC – Tests für Blasen Tumore zu bewerten. Im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen Tests wie UroVysion oder uCyt + ist er finanziell tragbar, einfach zu bedienen und stellt eine objektive Untersuchungsmethode dar.

Die Sensitivität für UBC® Rapid gemessen durch den concile Omega 100 reader betrug 56%, die Spezifität 96%. Die AUC als Parameter für die diagnostische Qualität wurde mit 0,77 bei einem cut – off – Wert von 10 $\mu\text{g/l}$ berechnet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konzentrationen an Zytokeratinen 8/18, die durch den POC – Test bestimmt wurden, signifikant ($p < 0,001$) zwischen Patienten mit Tumor und gesunden Kontrollen korrelierten.

Die Testgenauigkeit der qualitativen (optischen) und quantitativen (Omega reader) Auswertung der Ergebnisse war ähnlich, jedoch nicht exakt gleich. Bei starker bis mittelstarker Ausprägung der Bande bei positivem Ergebnis waren die Ergebnisse ähnlich. Vor allem der Anteil an Testkassetten mit einem „leicht positiven“ Ergebnis, visuell gemessen, verglichen mit der quantitativen Auswertung lieferte teils unterschiedliche Ergebnisse. Während alle „leicht positiven“ Ergebnisse (n=8; range: 6,5 – 15,3 µg/L) visuell als positiv angesehen wurden, ergab die Analyse mittels POC – Test eine Zuteilung von 4 Ergebnissen unterhalb des cut – off – Wertes von 10 µg/L (=negativ) und 4 Ergebnissen oberhalb des cut – off – Wertes (=positiv). Insbesondere für diese Fälle war der Einsatz des concile Omega 100 reader wichtig, um ein objektives Ergebnis zu erhalten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Höhe des quantitativ ermittelten Wertes mit der Wahrscheinlichkeit für die Existenz eines Blasentumors und der Risikogruppierung nach EORTC – Risk - Table korrelierte [86]. Außerdem war das Ergebnis bei den meisten aggressiveren Tumoren (G3, Cis) und Patienten mit einem high risk Tumor deutlich erhöht [87].

Somit können durch die zusätzliche Bestimmung eines quantitativen Testergebnisses, im Vergleich zu der einfachen Kategorisierung in „Tumor ja“ und „Tumor nein“ durch die visuell – qualitative Auswertung, mehr Informationen gewonnen werden.

Folgende Studien dienen dem Vergleich mit dieser Arbeit:

In einer Studie von Stycke J et al. 2017 (schwedische – Multicenter – Studie) [88] wurden die Patienten (n = 270) in vier Gruppen eingeteilt: 1. Erstdiagnose Blasen tumor (n = 94), 2. Nachsorge bei nicht – invasivem Harnblasenkarzinom (n = 75), 3. Gutartige Erkrankungen des Harntrakts (n = 51) und 4. Kontrollkollektiv (n = 50).

Dabei ergaben sich insgesamt eine Sensitivität von 70,8% und eine Spezifität von 61,4%.

Auch hier war der UBC® Rapid – Wert der Hochrisikogruppe (G3, CIS) mit einer Sensitivität von 79,2% und Spezifität von 61,4% gegenüber der Niedrigrisikogruppe (Sensitivität 60,0% und Spezifität 61,4%) signifikant erhöht. Die diagnostische Genauigkeit des UBC® Rapid – Tests war bei der Erstdiagnose des Blasentumors höher verglichen mit den Patienten in der Nachsorge.

Ritter et al. 2014 [86] veröffentlichten eine Studie, in der insgesamt 198 Patienten eingeschlossen wurden, von denen 61 Patienten ein nachgewiesenes Urothelkarzinom der Harnblase aufwiesen. Die visuelle Auswertung des Tests differierte stark mit einer Sensitivität von 38,1 – 71,4% und einer Spezifität von 54,1 – 89,1%. Die Auswertung durch den POC – Test ergab eine Sensitivität von 60,7% und eine Spezifität von 70,1%.

Hakenberg et al. 2004 [89] untersuchten eine Studienpopulation von 182 Patienten, von denen 90 einen Blasentumor aufwiesen. Hier wurden eine Sensitivität von 64,4% und eine Spezifität von 63,6% berechnet.

In einer Studie von Mian et al. 2000 [90] wurden 180 Patienten eingeschlossen, 53 mit einem histologisch nachgewiesenen Urothelkarzinom. Hier lagen eine Sensitivität von 66% und eine Spezifität von 90% vor. 68% des Patientenkollektivs waren jedoch in der Nachsorge nach TUR – B. Dies stellt einen Unterschied zu dieser Arbeit dar.

Schröder et al. 2004 [91] berechneten eine Sensitivität von 35,6% und eine Spezifität von 75%, bei einer Patientenzahl von insgesamt 115 Patienten, von denen 59 an einem Harnblasenkarzinom erkrankt waren.

Ecke et al. 2018 [92] untersuchten in einer Multicenter - Studie weitere Proben mittels UBC® Rapid. Die Daten dieser Arbeit flossen ebenfalls in die Ergebnisse mit ein.

Insgesamt wurden somit 530 Urinproben untersucht, 242 Patienten mit einem histologisch gesicherten Harnblasenkarzinom, von denen 134 ein nicht muskelinvasives low-grade Karzinom (NMI-LG), 48 ein nicht muskelinvasives high-grade Karzinom (NMI-HG) und 60 ein muskelinvasives high-grade Karzinom (MI-HG)) aufwiesen. Bei 62 Patienten konnte kein Tumor festgestellt werden, die Kontrollgruppe (gesunde Patienten, kein Tumor) belief sich auf 226 Proben. Die Urinproben wurden ebenfalls mit dem UBC® Rapid Point of Care (POC) -Assay analysiert und mit dem Concile Omega 100 POC Reader ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigten eine Sensitivität für die gesamte Blasenkrebs-Kohorte von 53,3% (positiver prädiktiver Wert (PPV) 90,2%, negativer prädiktiver Wert (NPV) 65,2%) und betrug 38,8% (PPV 78,8%, NPV 72,1%) für ein nicht-muskelinvasives low-grade Karzinom; 75,0% (PPV 72,0%, NPV 94,7%) für ein nicht muskelinvasives high-grade Blasenkarzinom und 68,3% (PPV 74,6%, NPV 91,8%) für ein muskelinvasives high-grade Karzinom. Die Spezifität gesamt betrug 93,8%.

Auch hier lässt sich schlussfolgern, dass der UBC®-Rapid Test ein klinisch wertvolles Instrument vor allem zum Nachweis hochgradiger Blasentumore sein und Einzug in die Routine von NMI-HG-Tumoren finden könnte.

Obwohl die Daten dieser Arbeit mit verwendet wurden zeigt sich, dass aufgrund der Fallzahlzunahme (n = 530) sich die Sensitivität und Spezifität der Arbeit von Ecke et al. verglichen mit dieser Arbeit kaum änderten (Sensitivität 53,3% vs. 56%; Spezifität 93,8% vs. 96%).

Die Ergebnisse von UBC® Rapid, die in der vorliegenden Multicenter - Studie in beiden Studienzentren erzielt wurden, sind sehr ähnlich und reproduzierbar. Darüber hinaus ist der

UBC®-Rapid Test standardisiert und kalibriert und somit unabhängig von der verwendeten Testcharge sowie dem Untersuchungsort.

Dies spricht für die Validität der hier erhobenen Daten.

Tabelle 15 gibt eine Übersicht über die aufgeführten Studien:

Tabelle 15: Sensitivitäten und Spezifitäten anderer Studien im Vergleich UBC

	Anzahl Patienten	Sensitivität (in %)	Spezifität (in %)
Styrke J et al.	270	70,8	61,4
Ritter et al.	198	60,7	70,1
Hakenberg et al.	181	64,4	63,6
Mian et al.	180	66	90
Schröder et al.	115	35,6	75
Ecke et al.	530	53,3	93,8
Diese Arbeit	244	56	96

Anwendbarkeit:

Der Einsatz für diesen UBC® Rapid Test ist noch nicht vollständig geklärt. Laut unseren Ergebnissen könnte er als erster Hinweis oder zusätzlicher Parameter für die Diagnostik eines Harnblasenkarzinoms genutzt werden. Vor allem für Praxen oder Ambulanzen könnte der Test interessant sein, die keinen Zugang zu zeit- und kostenaufwändigeren Tests wie z.B. FISH oder Immunzytologie haben. Ein positives Testergebnis sollte nicht direkt eine Zystoskopie zur Folge haben. Es muss immer in Zusammenschau mit Anamnese, Vorerkrankungen, Klinik und mit dem Ergebnis der Urinzytologie bewertet werden. Der quantitative Messwert ermöglicht jedoch eine Risikostratifizierung.

Der POC – Test könnte zu einer besseren Erkennung von Harnblasenkarzinomen beitragen, vor allem bei Hochrisikopatienten (G3, CIS) [87]. Dieser Test könnte ebenfalls (in Kombination mit der Urinzytologie) für Patienten genutzt werden, die ein erhöhtes Risiko für ein Harnblasenkarzinom aufweisen und bei denen eine Mikrohämaturie diagnostiziert wird, da die invasive Diagnostik durch eine Zystoskopie in dieser Konstellation kontrovers diskutiert wird [93] [94].

4.3.1 Ein-/Ausschlusskriterien UBC® Rapid Test

Da Diabetes eine Volkskrankheit ist, wurde bei der Diskussion um die Ein-/Ausschlusskriterien bezüglich des Survivin - Tests in Zusammenarbeit mit dem IPA Bochum beschlossen, Diabetes mellitus nicht als Ausschlusskriterium (siehe Material und Methoden) zu werten. Somit wurden diese Patienten ebenfalls dem UBC® Rapid – Test unterzogen. Dabei waren die Ergebnisse der Diabetes – Patienten im Vergleich zu den Nicht – Diabetes – Patienten nicht signifikant für den UBC® Rapid – Test ($p = 0,403$), somit könnte Diabetes als Ausschlusskriterium wegfallen. Ebenfalls für die meist mit dem Harnblasenkarzinom assoziierte Harnwegsinfektion (siehe Einleitung ca. 40%) ergab sich für den UBC® Rapid keine Signifikanz zwischen Patienten mit Harnwegsinfektion verglichen mit den Patienten ohne Harnwegsinfektion ($p = 0,12$). Da die Anzahl an Patienten in dieser Studie mit Diabetes ($n=27$) und Harnwegsinfektionen ($n=17$) vergleichsweise gering waren, sind auch hier weitere Studien nötig, um zu zeigen, ob diese Parameter als Ausschlusskriterium für den UBC® Rapid wegfallen könnten.

Die Auswertung von Urinproben der Patienten mit Diabetes und Harnwegsinfektionen wurden in Vergleichsstudien noch nicht beschrieben, stellen daher einen interessanten Ansatzpunkt für die weitere Forschung dar. In der Studie von Styrke J et al. [88] wurden ebenfalls Patienten mit Diabetes mellitus eingeschlossen, die Daten bezüglich dieser Erkrankung jedoch nicht ausgewertet.

Die Urinmenge spielte für die Auswertung des UBC® Rapid – Tests keine Rolle. Zwischen Tumorpatienten und Kontrollpatienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dies war zu erwarten, da hier nur eine Menge von 0,5 ml benötigt wurde (Gebrauchsanweisung).

Ein erwähnenswerter Nebeneffekt: Bei einem 25 – jährigen Patienten der unfallchirurgischen Station, der am Vorabend mit einer Prellung des Handgelenks unter einem Blutalkoholspiegel von 1,8 ‰ aufgenommen wurde, wurde der UBC® Rapid – Test durchgeführt. Dabei ergab sich ein erhöhter Wert von 72,4 µg/L. Somit müsste möglicherweise Alkoholkonsum in den letzten 48 Stunden den Ausschlusskriterien hinzugefügt werden. Für die Praxis hieße dies, dass man vor der Untersuchung mit dem UBC® Rapid Test die Patienten darauf hinweisen sollte, dass in den letzten 48 - 72 h kein Alkohol konsumiert werden darf.

4.4 Diskussion Survivin

Der Survivin – ELISA befindet sich im Vergleich zum UBC® Rapid Test noch in der Entwicklungsphase. Hier wurde zu Beginn der Untersuchungen vom IPA – Bochum eigens ein ELISA entwickelt, mit dem die Detektion des Proteins Survivin möglich war. Die Neuerung bei diesem Verfahren war, dass im Gegensatz zu den meisten Studien, in denen eine Immunhistochemie von Gewebeproben angefertigt wurde oder mRNA – basierte Ansätze zur Anwendung kamen, eine ELISA - basierte Technik auf Proteinebene entwickelt wurde [69] [70] [95]. Der ELISA ist ein einfach zu verwendendes Assayformat, das häufig in Routineanwendungen zur Proteinquantifizierung verwendet wird, jedoch nur sehr selten in der Urindiagnostik Anwendung findet [71]. Um die Problematik mit der Survivin – mRNA, die in einigen Studien beschrieben wurde [69], zu umgehen, untersuchten wir einen neu entwickelten ELISA zum Nachweis von Survivin auf Proteinebene.

Der ELISA wies eine LoD (0,033 ng / ml) und einen Nachweisbereich vergleichbar mit kommerziell erhältlichen ELISAs auf. Es wurde eine Vier-Parameter-Kurvenanpassung für die Kalibrierungskurve durchgeführt, da diese Prozedur allgemein empfohlen wird und für Werte in der Nähe der LoD zuverlässiger zu sein scheint [96].

Im Vergleich zum UBC® Rapid Test war dies ein viel zeit- und kostenaufwändigeres Verfahren. Von der Probengewinnung, über die Aufbereitung bis hin zur endgültigen Bearbeitung der Proben dauerte es einige Wochen. Somit entfiel hier die Möglichkeit, diesen Test als Schnelltest zu nutzen.

Mithilfe des neu entwickelten ELISAs war es nicht möglich Survivinkonzentrationen im Vollurin oder im Überstand nachzuweisen. Die Untersuchung von konzentriertem Urin war nicht Bestandteil dieser Studie. Die Messungen der Survivinkonzentration basierten auf der Bestimmung der sedimentierten Zellen aus dem Urin (Zellpellets). Damit wurden Matrixeffekte vermieden, die den Test beeinflussen hätten können. Der Urin ist eine heterogene Flüssigkeit mit variierenden Konzentrationen an Bestandteilen, wie z.B. Natriumchlorid, Kreatinin und Protonen (pH), die die Antikörper – Antigen – Interaktion beeinflussen [97] [98] [99] [100]. Die Absonderung von Survivin aus der Tumorzelle über Exosomen wurde kürzlich beschrieben [101]. Die Anreicherung von Exosomen aus dem Urin für die anschließende Bestimmung von Survivin ist ein guter Ansatz, der zukünftig weiterhin untersucht werden sollte. Dies bedarf jedoch eines sensitiveren Tests, dem das IPA Bochum bereits nachgeht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der Survivin – Studie zeigen, dass das Protein für den Nachweis von Harnblasenkarzinomen, insbesondere high grade Tumoren, geeignet ist.

Die Performance ist mit den Ergebnissen (Sensitivität 35%, Spezifität 98%) als alleiniger Marker jedoch nicht ausreichend.

Bereits 2004 konnte Survivin als Marker für das Harnblasenkarzinom herausgestellt werden. In der Studie (n = 209) von Shariat et al. 2004 [67] wurden nur Patienten mit einem nicht – invasiven Blasen tumor untersucht (117 Blasen tumore und 92 Kontrollen). Es wurde eine Sensitivität von 64% bei einer Spezifität von 93% berechnet.

Auch hier wurde bestätigt, dass vermehrt anfallendes Survivin im Urin mit einem erhöhten Risiko für einen Blasen tumor und einem höheren Tumor stadium (T1) einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass Survivin verglichen mit NMP22 und der Urinzytologie die höchste Spezifität und PPV (92%) aufwies.

Srivastava et al. 2013 [102] untersuchten in ihrer Arbeit insgesamt 191 Patienten, 28 gesunde Kontrollen, 46 positive Kontrollen und 117 Fälle mit nachgewiesenem Harnblasenkarzinom. Survivin wurde auch hier vor der transurethralen Intervention aus dem Urin abgenommen, mit einem ELISA nachgewiesen und mit der Zytologie verglichen. Die Sensitivität lag bei 82,9% (Urinzytologie 66, 7%) und die Spezifität bei 81,1% (Urinzytologie 96,0%).

Hier wiesen jedoch mehr Patienten ein high – grade Karzinom (n = 53) oder bereits ein muskelinvasives Stadium (n = 67) auf, was die höhere Sensitivität im Vergleich zu dieser Arbeit erklären könnte. Survivin detektiert, wie auch UBC® Rapid, wie mit dieser Studie ebenfalls belegt, v.a. die höhergradigen Tumoren (G3, CIS, muskelinvasiv).

In einer Studie von Li et al. 2013 [103] wurden insgesamt 204 Urinproben mittels ELISA – Test für Survivin untersucht, 102 Blasenkarzinompatienten und 102 Kontrollen, die ebenfalls aus demselben Krankenhaus stammten. Das Durchschnittsalter (54,3 Jahre) war hier jedoch wesentlich niedriger als in der vorliegenden Arbeit. (73 Jahre). Es ergaben sich eine Sensitivität von 70,6% und eine Spezifität von 89,2%.

Mehrere Studien stellten ähnliche Ergebnisse heraus [67] [104].

Auch mit der Arbeit von Li et al. konnte gezeigt werden, dass ein ELISA Test zur Detektion von Harnblasenkarzinomen geeignet ist. Weiterhin wurde beschrieben, dass es in der Zukunft möglich sein könnte, diesen ELISA als kommerzielles Verfahren für die Erkennung von Blasen tumoren zu nutzen.

Johnen et al. 2012 [69] untersuchten im Jahr 2012 in einer großen prospektiven Studie 5176 Urinproben, von denen 1540 Proben von Chemikanten stammten. Diese waren berufsbedingt aromatischen Aminen ausgesetzt. Der Urin wurde jährlich im Zeitraum von 2003 – 2010 abgenommen und untersucht. Hier wurde im Gegensatz zum ELISA die RNA aus Harnzellen extrahiert und Survivin durch Real – Time PCR bestimmt. In diesem Zeitraum wurden 19 Blasen Tumore nachgewiesen. Dabei ergab sich eine Sensitivität von 21,1% für alle und 36,4% für hochgradige Tumore. Die Spezifität betrug 97,5%, der positive prädiktive Wert 9,5% und der negative prädiktive Wert 99,0%. Damit waren, wie in dieser Arbeit, die Spezifität und der NPV sehr gut, die Sensitivität und der PPV niedrig. Die Gültigkeit der Ergebnisse in der Studie von Johnen et al. [69] war durch die geringe Anzahl der Tumorpationen eingeschränkt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Compliance der Patienten (korrekte Abgabe des Mittelstrahlurins), die Urinqualität, Probleme mit dem Assay und die Stabilität der mRNA das Ergebnis für Survivin beeinflussten. Ein Vorteil von Survivin war auch hier, dass Störfaktoren wie z.B. Zystitis kaum einen Einfluss auf das Ergebnis ausübten. Unter anderem könnte dies ein Grund für die geringe Anzahl an falsch – positiven Ergebnissen gewesen sein. Deshalb kann Survivin trotz niedriger Sensitivität als ein Bestandteil einer Kombination von Markern genutzt werden.

In einer Metaanalyse von Ja Hyeon Ku et al. 2012 [68] wurden Daten für Survivin als Blasen Tumormarker von August 1997 bis März 2011 gesammelt und ausgewertet. Insgesamt wurden 14 Studien mit 2051 Probanden eingeschlossen, darunter 1038 mit nachgewiesenem Harnblasenkarzinom und 1013 Kontrollpatienten. Dabei ergab die gepoolte Sensitivität 77,2% und für die Spezifität wurde ein Wert von 91,8% bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der Urin - Survivintest derzeit noch nicht ausreicht, um die Zystoskopie als Referenzstandard zu ersetzen. Interessant ist auch, dass in einer Studie von Vriesema et al. [105] gezeigt werden konnte, dass 89% der Patienten die invasive, schmerzhaftere Zystoskopie bei einer Sensitivität für einen Harnblasentumormarker von <90% immer bevorzugen würden [105].

Eine Übersicht über die ausgewählten Studien gibt Tabelle 16:

Tabelle 16: Sensitivitäten und Spezifitäten anderer Studien im Vergleich Survivin

	Anzahl Patienten	Sensitivität (in %)	Spezifität (in %)
Shariat et al.	209	64	93
Srivastava et al.	191	82,9	81,1
Li et al.	204	70,6	89,2
Johnen et al.	5716	21,1	97,5
Ja Hyeon Ku et al.	2051	77,2	91,8
Diese Arbeit	244	35	98

Es gibt jedoch gute Gründe, Harnblasenmarker als weitere diagnostische Mittel zusätzlich zu verwenden. Die systematische Überprüfung der Literatur für Urin – Survivin zeigte, dass die Sensitivität im Durchschnitt besser ist, als die der Urinzytologie. Es löst zwar die Zystoskopie nicht ab, aber ist als zusätzlicher Marker zur Urinzytologie zu empfehlen. Es könnte beispielsweise die Zystoskopieintervalle in der Nachsorge verlängern.

Ein Problem der Metaanalyse war, dass die Untersuchungsmethoden hinsichtlich Verarbeitungszeit, Lagerzeit, RNA – Qualität, verwendeten diagnostischen Reagenzien, Instrumenten und Untersuchern differierten. Somit lagen keine Standardbedingungen und Techniken vor. Es konnte v.a. ein Nutzen für die Erstdiagnose eines Blasentumors herausgestellt werden, der Stellenwert für die Vorhersage bei Krebsrezidiven und Progression von Harnblasenkarzinomen blieb jedoch unklar und wies vergleichsweise ähnlich Ergebnisse auf wie die Urinzytologie.

Weitere Unterschiede im Vergleich mit den oben genannten Studien können durch die Zusammensetzung der Studienpopulationen, z.B. Variationen in Grad und Stadium der Tumore und Variationen in der Kontrollgruppe, entstanden sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass wie bei immunhistochemischen und mRNA-basierten Assays, der Survivin-ELISA empfindlicher für hochgradige Tumoren war [69] [70] [95]. Dies ist auch angesichts der mechanistischen Rolle von Survivin, die an der Unterdrückung der Apoptose sowie der Mitose-Regulation beteiligt ist, plausibel [67] [106] [107] [108].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der vom IPA entwickelte ELISA eine sehr gute Spezifität aufwies bei mäßig guter Sensitivität. Vergleiche mit den oben angeführten Studien sind schwierig zu ziehen, da kein Standard – Kit für den ELISA von einem Hersteller benutzt wurde und somit keine Standardbedingungen vorlagen. Einfluss auf einen ELISA hat unter

anderem die präanalytische Verarbeitung der Proben, die Gewinnung des Antikörpers sowie der AK (monoklonal vs. polyklonal) selbst. Ggf. sind mit einer Immuno – PCR bessere Ergebnisse zu erzielen. Dies müsste anhand weiterer Studien mit mehr Teilnehmern überprüft werden.

4.4.1 Ein-/Ausschlusskriterien Survivin

Die Ein-/Ausschlusskriterien lagen im Gegensatz zum POC – Test für UBC® Rapid für den Survivin – ELISA noch nicht vor. Zu Beginn der Studie wurde zusammen mit dem IPA Bochum festgelegt, welche Patienten eingeschlossen werden konnten. Dabei orientierte man sich an den Ausschlusskriterien des UBC® Rapid Test. Da vor Beginn der Untersuchung nicht absehbar war, welche Parameter möglicherweise den Test beeinflussen könnten, wurde in der Kontrollgruppe lediglich das Vorliegen eines Malignoms als Ausschlusskriterium definiert und in der Studiengruppe ein anamnestisch bekanntes Malignom.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass für diese Auswertung des ELISA keine signifikante Abhängigkeit bezüglich, z.B. Diabetes und Harnwegsinfektionen vorlagen. Da die Anzahl an Patienten mit Diabetes (n=27) und Harnwegsinfektionen (n=19) vergleichsweise gering war, lässt sich keine eindeutige Aussage bezüglich der Signifikanz treffen. Es zeigte sich ebenfalls keine Abhängigkeit von der Urinmenge. Es war für die Abgabe des Urins eine Menge von 50 ml angedacht worden. Dies war jedoch in diesem Setting schwer realisierbar, da den Blasentumorpatienten der Urin am OP – Tag (prae – OP) abgenommen wurde. Da die Patienten jedoch nüchtern zur OP erschienen und demzufolge weniger Urin produzierten, war die Urinmenge verglichen mit den Kontrollpatienten geringer, da denen ein größeres Intervall für die Abgabe des Urins zur Verfügung stand. Daraus lässt sich schließen, dass es für den Survivin – ELISA besser gewesen wäre, den Patienten einen Urinbecher mitgegeben zu haben, so dass auch sie die Möglichkeit gehabt hätten, über einen längeren Zeitraum Urin zu sammeln. Für die Menge des Urins sollte nach diesen Erfahrungen eine Mindestmenge von 30 ml definiert werden.

In der Vergleichsstudie von Li et al. 2013 [103] wurde nicht über Probleme bei der Urinmenge berichtet. Es wurde 10 ml Mittelstrahlurin gesammelt, dieser wurde dann bei 3000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erhalten und aliquotiert, danach wurden die Proben bis zum Nachweis bei -20° C eingefroren.

Bei Johnen et al. 2012 [69] wurden ähnlich vorgegangen. Die Urinabgabe war auch in dieser Studie unproblematisch, da die Probanden im Vorhinein wussten, wann der Urin abgegeben

werden musste. In keiner der o.g. Vergleichsstudien wurden klinische Ausschlusskriterien definiert.

4.5 Kombination beider Marker UBC® Rapid und Survivin

Beide Marker UBC® Rapid und Survivin können einen Blasentumor, vor allem im schnell fortschreitenden high – grade Stadium, erkennen. Die Kombination zeigt, wie im Ergebnisteil beschrieben, eine bessere Performance, v.a. die Spezifität in der UND – Verknüpfung. Mit diesem Ergebnis wäre es möglich, wenn beide Marker als POC – Test kombiniert würden, den Test zum Ausschluss eines Harnblasenkarzinoms zu verwenden. Bei einem negativen Ergebnis wäre der Patient zu über 99% tumorfrei. Bei einem positiven Ergebnis ist jedoch abzuwägen, welche Vorerkrankungen oder Störfaktoren (Nieren-/Harnleitersteine, Entzündungen, Manipulationen am Urogenitaltrakt) Einfluss genommen haben könnten.

Durch die Kombination der Tumormarker UBC® Rapid und Survivin (siehe Venn – Diagramm + AUC) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese sich gut ergänzen. Der UBC® Rapid Test deckte 34 Tumorpatienten auf, die durch Survivin nicht erkannt wurden. Umgekehrt detektierte Survivin 11 Tumorpatienten, die UBC® Rapid falsch negativ erkannte. Eine Studie von Eissa et al. 2013 [109], die ebenfalls die Kombination von Survivin mit einem anderen Marker untersuchte, ergab folgendes:

Hier wurden insgesamt 100 Patienten untersucht, 60 mit Harnblasenkarzinom, 20 urologische Patienten ohne Karzinom und 20 gesunde Kontrollen. Hier wurden ebenfalls zwei Marker bestimmt (Survivin und Hyaluronidase – mRNA). Es ergab sich eine Sensitivität für Survivin von 78,3% und eine Spezifität von 82,5%. Für HAase - mRNA lag die Sensitivität bei 86,7% und die Spezifität bei 97,5%. Auch hier konnte, im Vergleich zu dieser Arbeit, gezeigt werden, dass durch die Kombination der Marker die Sensitivität angehoben werden konnte (95%). Hier bestand ebenfalls der Konsens, dass es sinnvoller ist, zur sichereren Detektion von Harnblasenkarzinomen mehrere Urinumormarker zu kombinieren.

Es hat sich herausgestellt, dass sowohl proteinbasierte, wie der Survivin – ELISA als auch zellbasierte Tests, wie der UBC® Rapid, nicht als Screeningtests zu verwenden sind.

Das Screening erfordert selbst in Hochrisikopopulationen eine hohe Spezifität, um unnötige invasive Diagnoseverfahren und psychologische Belastungen für die Patienten zu vermeiden, die eine Folge falsch-positiver Testergebnisse sein können [110] [111]. Wie zuvor berichtet wurde, hat kein einzelner Marker reproduzierbar eine ausreichend hohe Sensitivität in

Verbindung mit der erforderlichen hohen Spezifität zum frühzeitigen Nachweis von Blasenkrebs gezeigt [77] [40]. Dies galt auch für die beiden Biomarker, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden. Sowohl Survivin als auch UBC® Rapid hatten relativ gute Spezifitäten, aber moderate Sensitivitäten bei den gegebenen Cut-Offs. Geringere Sensitivitäten können jedoch durch den Einsatz mehrerer Biomarker in einem Panel kompensiert werden. Tatsächlich erhöhte die Kombination beider Marker die Sensitivität auf 66% bei einer Spezifität von 95%. Für die Gruppe der high - grade Tumoren stieg die Sensitivität sogar auf 82%. Aufgrund der Tatsache, dass high - grade Tumoren eine höhere Progressions- und / oder Rezidivrate aufweisen, ist es hilfreich, sich auf Marker zu konzentrieren, die eine höhere Sensitivität für diese spezielle Gruppe aufweisen.

Somit kann nicht empfohlen werden, die untersuchten Marker als Screeningtests für die Gesamtbevölkerung ohne Risikofaktoren einzusetzen. Die Ergebnisse diesbezüglich scheinen nicht beweiskräftig genug [94].

Weitere Studien müssen zeigen, ob sich durch die Hinzunahme mehrerer Marker und einer größeren Anzahl an Patienten, eine ausreichende Performance ergibt, um einen POC – Test zu entwickeln, der für die sichere Diagnose und Nachkontrolle des Harnblasenkarzinoms genutzt werden kann.

Zusammenfassung Confounder (Störgrößen):

Viele Urinmarker werden durch bestimmte Störgrößen, die mit urologischen Erkrankungen in Verbindung stehen, beeinflusst [88] [108] [112] [113].

Die Mikrohämaturie beeinflusst offenbar den Survivin-ELISA und UBC® Rapid nicht. Ein weiterer möglicher Confounder für Biomarker-Assays kann eine Harnwegsinfektion sein. Ein typisches Beispiel dafür ist der Proteinmarker NMP22 [37] [38]. Da die Survivin – Werte in einigen Studien durch Entzündungen beeinflusst wurden [113] und Zusammenhänge zwischen Entzündungswegen und der Krebsentwicklung bekannt sind [113] [114], könnten Harnwegsinfektionen auch die Survivinkonzentrationen im Urin beeinflussen. Daher kann eine Kombination mit anderen Markern wie z.B. UroVysion, die weniger von Störfaktoren betroffen sind, eine gute Kombination für ein Markerpanel darstellen. Darüber hinaus könnten die zuvor erwähnten Bemühungen des IPA Bochum, den Survivin-Assay zu verbessern, zu einer höheren Sensitivität führen. Ein Vorteil des Survivin-ELISA und von UBC® Rapid ist, dass sie bezahlbar und benutzerfreundlich sind. Dies sind wichtige Faktoren für eine zukünftige Anwendung in Screening- oder Überwachungsprogrammen. Das Fall-Kontroll-

Design und die Auswahl der Kontrollgruppe sind Einschränkungen dieser Studie, die als erste Beurteilung eines neuen Assays dienen sollten. Bevor eine Anwendung im Screening möglich ist, müssen die Marker daher in einer prospektiven Studie mit einer unabhängigen und größeren Studienpopulation validiert werden.

Störgrößen, die während der Arbeit auffielen:

Eine deutlich ausgeprägte Makrohämaturie schien das Ergebnis des UBC – Tests zu beeinflussen, dies ergab häufig falsch positive Ergebnisse. Des Weiteren schienen die Alkoholkonzentration im Blut, eine Leukozytose sowie das längere Einliegen eines transurethralen oder suprapubischen Dauerkatheters das Ergebnis falsch positiv zu verändern. Die Urinmenge hatte keinen Einfluss auf den UBC® Rapid Test, da lediglich wenige Tropfen benötigt wurden. Für den Survivin – Elisa - Test wurde eine größere Menge an Urin benötigt, jeweils 5 ml für die Zentrifugation der zwei Falcon Tubes, des Weiteren wurde zunächst Urin für die Routine (Urinstatus) und Urinkultur benötigt. Dass eine Harnwegsinfektion oder ein Diabetes mellitus das Ergebnis beeinflussen könnten, konnte mit dieser Arbeit, auch aufgrund der geringen Anzahl an Patienten, nicht abschließend geklärt werden. Dazu müssen weitere Studien mit Fokus auf diesen Variablen etabliert werden, um eine valide Aussage treffen zu können.

4.6 Zusammenfassung der Eingangsfragen (1.3)

- Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität der beiden Tests?

Der UBC® Rapid Test zeigte eine Sensitivität von 56% und eine Spezifität von 96%.

Der Survivin-ELISA zeigte eine Sensitivität von 35% mit einer Spezifität von 98%. Die Kombination beider Assays erhöhte die Sensitivität auf 66% mit einer Spezifität von 95%. Bei high - grade Tumoren zeigte die Kombination eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 95%.

- Sind die Tests zur Früherkennung in der Praxis geeignet?

Als Screeningtests für die Gesamtbevölkerung ohne Risikofaktoren können UBC® Rapid und Survivin-ELISA aufgrund ihrer moderaten Sensitivität (noch) nicht empfohlen werden. Innerhalb von (Hoch-)Risikogruppen oder im Follow – Up von Patienten mit stattgehabter Blasenmordiagnose können die Tests für die Risikostratifizierung genutzt werden. Gerade für high-grade und high-risk Tumoren zeigten die Tests und ihre Kombination eine gute Performance.

Bezüglich der Anwendbarkeit ist ein POC – Test für Praxen, die keinen Zugang zu zeit- und kostenaufwändigeren Tests haben, gut geeignet. Die Durchführung ist schnell machbar, wenig fehleranfällig und durch den concile omega 100 reader quantifizierbar. Dabei ist jedoch zu beachten, dass ein positives Testergebnis immer in Zusammenschau aller erhobenen Daten bewertet werden muss.

- Welche Parameter beeinflussten bei der Erhebung der Messwerte das Ergebnis?

Wie im Absatz 4.5 Confounder beschrieben, scheinen eine deutlich ausgeprägte Makrohämaturie, eine Blutalkoholkonzentration, eine ausgeprägte Leukozytose, das längere Einliegen eines transurethralen oder suprapubischen Dauerkatheters sowie die erste Abgabe von Urin nach einer total intravenösen Narkose das Ergebnis falsch positiv zu verändern.

Die Urinmenge hatte keinen Einfluss auf den UBC® Rapid Test, jedoch wurden für den Survivin – Elisa – Test mindestens 10 ml Urin benötigt.

Eine Harnwegsinfektion und der Diabetes mellitus scheinen keinen Einfluss auf das Ergebnis gehabt zu haben.

- Reicht die Performance einer der beiden Marker zur Früherkennung aus?

Bezüglich beider Tests ergab sich jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe. Die Werte der Tumorpatienten waren signifikant erhöht. Die Sensitivität jedes einzelnen Markers reicht jedoch nicht zur Früherkennung aus. Auch als Screeningtest sind beide Marker nicht zu empfehlen. Es konnte jedoch festgestellt werden, wie in der Fragestellung nach der Früherkennung in der Praxis beschrieben, dass vor allem die Kombination beider Marker hinsichtlich der high-grade Tumoren eine gute Performance zur Detektion von Blasentumoren gezeigt hat (Sensitivität 82%; Spezifität 95%). Durch die Hinzunahme weiterer Marker könnte es zukünftig möglich sein ein Multimarkerpanel zu entwickeln, das für die Früherkennung geeignet ist.

- Ist eine quantitative UBC® Rapid Test Auswertung wirklich notwendig, wenn bereits die visuell qualitative Auswertung mittels Testkassette vorliegt?

Die Testgenauigkeit der qualitativen (optischen) und quantitativen (Omega reader) Auswertung der Ergebnisse war ähnlich, jedoch nicht exakt gleich. Bei starker bis mittelstarker Ausprägung der Bande bei positivem Ergebnis waren die Ergebnisse ähnlich. Vor allem der Anteil an Testkassetten mit einem „leicht positiven“ Ergebnis, visuell gemessen, verglichen mit der quantitativen Auswertung lieferte teils unterschiedliche Ergebnisse. Während alle „leicht positiven“ Ergebnisse ($n=8$; range: 6,5 – 15,3 $\mu\text{g/L}$) visuell als positiv angesehen wurden, ergab die Analyse mittels POC – Test eine Zuteilung von 4 Ergebnissen unterhalb des cut – off – Wertes von 10 $\mu\text{g/L}$ (=negativ) und 4 Ergebnissen

oberhalb des cut – off – Wertes (=positiv). Insbesondere für diese Fälle war der Einsatz des concile Omega 100 reader wichtig, um ein objektives Ergebnis zu erhalten.

5 Schlussfolgerung

In dieser Fall – Kontroll – Studie wurde ein neuer ELISA zur Quantifizierung von Survivin in Urinproben entwickelt und neben dem UBC® Rapid Test evaluiert. Beide Assays detektierten Blasenkrebs, vorzugsweise high - grade Tumore. Zum ersten Mal wurden Survivin und UBC® Rapid als Panel getestet, was eine Verbesserung der Sensitivität zeigte. Die Ergebnisse erfordern jedoch weitere Tests der Assays mit anderen Kontrollgruppen, wie z.B. Patienten mit Verdacht auf Blasenkrebs und bedürfen schließlich der Validierung einer prospektiven Studie unter Verwendung einer Hochrisiko-Kohorte.

Die Zystoskopie mit der Probenentnahme und der histologischen Untersuchung ist weiterhin der Goldstandard zur Diagnose und Überwachung von Harnblasenkarzinomen. Sie kann (noch) nicht durch Urinmarker ersetzt werden.

Aus dieser Studie kann geschlossen werden, dass UBC® Rapid und Survivin in der Lage sind, zwischen Blasentumorpatienten und der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Für eine exaktere Aussage sind jedoch weitere Studien mit mehr Patienten erforderlich.

5.1 Ausblick

Aktuell gibt es viele kommerzielle Urinmarker auf dem Markt, die aber bisher keine ausreichende Sensitivität und Spezifität für die Früherkennung und Nachsorge eines Harnblasenkarzinoms bieten. Aktuell gibt es Entwicklungen von Multitests, die mehrere Marker gleichzeitig untersuchen können. Dazu werden weitergehende Studien an gut selektierten, größeren Populationen notwendig sein, um in der Zukunft zu zeigen, welche Kombinationen von Markern am aussagekräftigsten sein werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Dr. Peter Kaatsch, Dr. Claudia Spix, „Robert Koch Institut, u.d.G.d.e.K.i.D.e.V., Krebs in Deutschland . 2012: Berlin“ . .
- [2] M. Retz, P. Maisch, und J. E. Gschwend, „S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom“, *Urol.*, Bd. 55, Nr. 9, S. 1188–1191, Sep. 2016.
- [3] T. Otto, A. Bex, und H. Rübben, „Harnblasenkarzinom“, in *Therapiekonzepte Onkologie*, P. D. med S. Seeber und P. D. D. med J. Schütte, Hrsg. Springer Berlin Heidelberg, 1998, S. 1048–1067.
- [4] P. Kaatsch, C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, und K. Kranzhöfer, „Krebs in Deutschland 2011/2012“, Ausgabe 2015.
- [5] J. Bellmunt, A. Orsola, J. J. Leow, T. Wiegel, M. De Santis, und A. Horwich, „Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up“, *Ann. Oncol.*, Bd. 25, Nr. suppl_3, S. iii40–iii48, Sep. 2014.
- [6] N. Rothman, M. Garcia-Closas, N. Chatterjee, N. Malats, und X. Wu, „A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci“, *Nat. Genet.*, Bd. 42, Nr. 11, S. 978–984, Nov. 2010.
- [7] K. Golka, M. Hermes, S. Selinski, M. Blaszkewicz, H. M. Bolt, G. Roth, H. Dietrich, H.-M. Prager, K. Ickstadt, und J. G. Hengstler, „Susceptibility to urinary bladder cancer: relevance of rs9642880[T], GSTM1 0/0 and occupational exposure“, *Pharmacogenet. Genomics*, Bd. 19, Nr. 11, S. 903, Nov. 2009.
- [8] H. Kappus, „Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe – Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. Ergänzung zur 5. Lieferung 1976/77. Herausgeg. vom Vorsitzenden der Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe D. Henschler. Verlag Chemie GmbH, Weinheim – New York 1978. XXV, 58 S., zahlr. Tab., Loseblattausg., DM 48,-“, *Chem. Ing. Tech.*, Bd. 51, Nr. 10, S. 992–992, Okt. 1979.
- [9] I. W. G. on the E. of C. R. to Humans, *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*. International Agency for Research on Cancer, 2004.
- [10] P. Brennan, O. Bogillot, S. Cordier, E. Greiser, W. Schill, P. Vineis, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, J. Chang-Claude, U. Bolm-Audorff, K.-H. Jöckel, F. Donato, C. Serra, J. Wahrendorf, M. Hours, A. T’Mannetje, M. Kogevinas, und P. Boffetta, „Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies“, *Int. J. Cancer*, Bd. 86, Nr. 2, S. 289–294, Apr. 2000.
- [11] P. Brennan, O. Bogillot, E. Greiser, J. Chang-Claude, J. Wahrendorf, S. Cordier, K.-H. Jöckel, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, P. Vineis, F. Donato, M. Hours, C. Serra, U. Bolm-Audorff, W. Schill, M. Kogevinas, und P. Boffetta, „The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data)“, *Cancer Causes Control*, Bd. 12, Nr. 5, S. 411–417, Juni 2001.
- [12] A. F. Kantor, P. Hartge, R. N. Hoover, A. S. Narayana, J. W. Sullivan, und J. F. Fraumeni, „Urinary tract infection and risk of bladder cancer“, *Am. J. Epidemiol.*, Bd. 119, Nr. 4, S. 510–515, Apr. 1984.
- [13] H. Rübben, *Uroonkologie*, 6. Aufl. Berlin: Springer, 2014.
- [14] M. Bd, N. Ef, G. Ca, und H. Ed, „carcinoma of the bladder: 20-year experience in private practice“, *J. Urol.*, Bd. 93, S. 212–216, Feb. 1965.
- [15] D. Wallace und D. Harris, „Delay in treating bladder tumours“, *The Lancet*, Bd. 286, Nr. 7407, S. 332–334, Aug. 1965.
- [16] C. C. Carson, J. W. Segura, und L. F. Greene, „Clinical Importance of Microhematuria“, *JAMA*, Bd. 241, Nr. 2, S. 149–150, Jan. 1979.

- [17] G. Al und H. Rs, „Asymptomatic microscopic hematuria.“, *J. Urol.*, Bd. 124, Nr. 3, S. 389–391, Sep. 1980.
- [18] A. G. Turner, W. F. Hendry, G. B. Williams, und D. M. Wallace, „A haematuria diagnostic service.“, *Br Med J*, Bd. 2, Nr. 6078, S. 29–31, Juli 1977.
- [19] C. E. Cox, A. S. Cass, und W. H. Boyce, „Bladder cancer: a 26-year review“, *J. Urol.*, Bd. 101, Nr. 4, S. 550–558, Apr. 1969.
- [20] G. M. Farrow, D. C. Utz, C. C. Rife, und L. F. Greene, „Clinical Observations on Sixty-nine Cases of in Situ Carcinoma of the Urinary Bladder“, *Cancer Res.*, Bd. 37, Nr. 8 Part 2, S. 2794–2798, Aug. 1977.
- [21] T. H. Ecke, „Tumormarker beim Blasentumor: Aussichten für den klinischen Alltag / Tumor markers for bladder cancer: outlook for routine use“, *LaboratoriumsMedizin*, Bd. 34, Nr. 2, S. 77–86, 2010.
- [22] A. Rajesh, H. Sokhi, R. Fung, K. A. Mulcahy, und M. J. G. Bankart, „Role of Whole-Body Staging Computed Tomographic Scans for Detecting Distant Metastases in Patients With Bladder Cancer“, *J. Comput. Assist. Tomogr.*, Bd. 35, Nr. 3, S. 402, Juni 2011.
- [23] P. J. Goebell, F. vom Dorp, C. Rödel, D. Frohneberg, J. W. Thüroff, D. Jocham, C. Stief, S. Roth, R. Knüchel, K. W. Schmidt, I. Kausch, D. Zaak, C. Wiesner, K. Miller, R. Sauer, und H. Rübber, „Nichtinvasives und invasives Harnblasenkarzinom“, *Urol.*, Bd. 45, Nr. 7, S. 873–886, Juli 2006.
- [24] B. W. G. van Rhijn, J. W. Catto, P. J. Goebell, R. Knüchel, S. F. Shariat, H. G. van der Poel, M. Sanchez-Carbayo, G. N. Thalmann, B. J. Schmitz-Dräger, und L. A. Kiemeny, „Molecular markers for urothelial bladder cancer prognosis: Toward implementation in clinical practice“, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, Bd. 32, Nr. 7, S. 1078–1087, Okt. 2014.
- [25] P. K. Agarwal, P. C. Black, und A. M. Kamat, „Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer“, *World J. Urol.*, Bd. 26, Nr. 1, S. 39–44, Feb. 2008.
- [26] V. Soukup, M. Babjuk, J. Bellmunt, G. Dalbagni, G. Giannarini, O. W. Hakenberg, H. Herr, E. Lechevallier, und M. J. Ribal, „Follow-up After Surgical Treatment of Bladder Cancer: A Critical Analysis of the Literature“, *Eur. Urol.*, Bd. 62, Nr. 2, S. 290–302, Aug. 2012.
- [27] M. F. Botteman, C. L. Pashos, A. Redaelli, B. Laskin, und R. Hauser, „The health economics of bladder cancer“, *PharmacoEconomics*, Bd. 21, Nr. 18, S. 1315–1330, Dez. 2003.
- [28] N. Mitra und A. Indurkha, „A propensity score approach to estimating the cost–effectiveness of medical therapies from observational data“, *Health Econ.*, Bd. 14, Nr. 8, S. 805–815, Aug. 2005.
- [29] H. Steiner, M. Bergmeister, I. Verdorfer, T. Granig, G. Mikuz, G. Bartsch, B. Stoehr, und A. Brunner, „Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers“, *BJU Int.*, Bd. 102, Nr. 3, S. 291–296, Aug. 2008.
- [30] P. Turco, N. Houssami, P. Bulgaresi, G. M. Troni, L. Galanti, M. P. Cariaggi, P. Cifarelli, E. Crocetti, und S. Ciatto, „Is Conventional Urinary Cytology Still Reliable for Diagnosis of Primary Bladder Carcinoma? Accuracy Based on Data Linkage of a Consecutive Clinical Series and Cancer Registry“, *Acta Cytol.*, Bd. 55, Nr. 2, S. 193–196, 2011.
- [31] R. Srivastava, V. K. Arora, S. Aggarwal, A. Bhatia, N. Singh, und V. Agrawal, „Cytokeratin-20 immunocytochemistry in voided urine cytology and its comparison with nuclear matrix protein-22 and urine cytology in the detection of urothelial carcinoma“, *Diagn. Cytopathol.*, Bd. 40, Nr. 9, S. 755–759, Sep. 2012.
- [32] I. Gkialas, G. Papadopoulos, L. Iordanidou, G. Stathouros, C. Tzavara, A. Gregorakis, und M. Lykourinas, „Evaluation of Urine Tumor-Associated Trypsin Inhibitor, CYFRA

- 21-1, and Urinary Bladder Cancer Antigen for Detection of High-Grade Bladder Carcinoma“, *Urology*, Bd. 72, Nr. 5, S. 1159–1163, Nov. 2008.
- [33] H. B. Grossman, E. Messing, M. Soloway, K. Tomera, G. Katz, Y. Berger, und Y. Shen, „Detection of Bladder Cancer Using a Point-of-Care Proteomic Assay“, *JAMA*, Bd. 293, Nr. 7, S. 810–816, Feb. 2005.
- [34] S. Goodison, C. J. Rosser, und V. Urquidi, „Bladder Cancer Detection and Monitoring: Assessment of Urine- and Blood-Based Marker Tests“, *Mol. Diagn. Ther.*, Bd. 17, Nr. 2, S. 71–84, Apr. 2013.
- [35] N. Bonberg, D. Taeger, K. Gawrych, G. Johnen, S. Banek, C. Schwentner, K.-D. Sievert, H. Wellhäußer, M. Kluckert, G. Leng, M. Nasterlack, A. Stenzl, T. Behrens, T. Brüning, B. Pesch, und The UroScreen Study Group, „Chromosomal instability and bladder cancer: the UroVysion™ test in the UroScreen study“, *BJU Int.*, Bd. 112, Nr. 4, S. E372–E382, Aug. 2013.
- [36] D. Tilki, M. Burger, G. Dalbagni, H. B. Grossman, O. W. Hakenberg, J. Palou, O. Reich, M. Rouprêt, S. F. Shariat, und A. R. Zlotta, „Urine Markers for Detection and Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer“, *Eur. Urol.*, Bd. 60, Nr. 3, S. 484–492, Sep. 2011.
- [37] M. Miyake, S. Goodison, E. G. Giacoia, W. Rizwani, S. Ross, und C. J. Rosser, „Influencing factors on the NMP-22 urine assay: an experimental model“, *BMC Urol.*, Bd. 12, S. 23, Aug. 2012.
- [38] R. Chou, J. L. Gore, D. Buckley, R. Fu, K. Gustafson, J. C. Griffin, S. Grusing, und S. Selph, „Urinary Biomarkers for Diagnosis of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis“, *Ann. Intern. Med.*, Bd. 163, Nr. 12, S. 922, Dez. 2015.
- [39] S. Huber, C. Schwentner, D. Taeger, B. Pesch, M. Nasterlack, G. Leng, T. Mayer, K. Gawrych, N. Bonberg, M. Pelster, G. Johnen, H. Bontrup, H. Wellhäußer, H.-G. Bierfreund, C. Wiens, C. Bayer, F. Eberle, B. Scheuermann, M. Kluckert, G. Feil, T. Brüning, und A. Stenzl, „Nuclear matrix protein-22: a prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer. Results from the UroScreen study“, *BJU Int.*, Bd. 110, Nr. 5, S. 699–708, 2012.
- [40] B. Pesch, D. Taeger, G. Johnen, K. Gawrych, N. Bonberg, C. Schwentner, H. Wellhäußer, M. Kluckert, G. Leng, M. Nasterlack, Y. Lotan, A. Stenzl, T. Brüning, und the U. S. Group, „Screening for bladder cancer with urinary tumor markers in chemical workers with exposure to aromatic amines“, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Bd. 87, Nr. 7, S. 715–724, Okt. 2014.
- [41] N. Wadhwa, S. K. Jatawa, und A. Tiwari, „Non-invasive urine based tests for the detection of bladder cancer“, *J. Clin. Pathol.*, Bd. 65, Nr. 11, S. 970–975, Nov. 2012.
- [42] O. P. J. Vrooman und J. A. Witjes, „Urinary Markers in Bladder Cancer“, *Eur. Urol.*, Bd. 53, Nr. 5, S. 909–916, Mai 2008.
- [43] M. Miyake, S. Goodison, W. Rizwani, S. Ross, H. Bart Grossman, und C. J. Rosser, „Urinary BTA: indicator of bladder cancer or of hematuria“, *World J. Urol.*, Bd. 30, Nr. 6, S. 869–873, Dez. 2012.
- [44] S. F. Shariat, M. J. Marberger, Y. Lotan, M. Sanchez-Carbayo, C. Zippe, G. Lüdecke, H. Boman, I. Sawczuk, M. G. Friedrich, R. Casella, C. Mian, S. Eissa, H. Akaza, V. Serretta, H. Huland, H. Hedelin, R. Raina, N. Miyanaga, A. I. Sagalowsky, C. G. Roehrborn, und P. I. Karakiewicz, „Variability in the Performance of Nuclear Matrix Protein 22 for the Detection of Bladder Cancer“, *J. Urol.*, Bd. 176, Nr. 3, S. 919–926, Sep. 2006.
- [45] J. Southgate, P. Hamden, und L. K. Trejdosiewicz, „Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications“, *Histol. Histopathol.*, Bd. 14, Nr. 2, S. 657–664, 1999.

- [46] V. B. Lokeshwar, T. Habuchi, H. B. Grossman, W. M. Murphy, S. H. Hautmann, G. P. Hemstreet, A. V. Bono, R. H. Getzenberg, P. Goebell, B. J. Schmitz-Dräger, J. A. Schalken, Y. Fradet, M. Marberger, E. Messing, und M. J. Droller, „Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers“, *Urology*, Bd. 66, Nr. 6, S. 35–63, Dez. 2005.
- [47] I. Soyuer, M. Sofikerim, F. Tokat, S. Soyuer, und F. Ozturk, „Which urine marker test provides more diagnostic value in conjunction with standard cytology- ImmunoCyt/uCyt+ or Cytokeratin 20 expression“, *Diagn. Pathol.*, Bd. 4, S. 20, 2009.
- [48] L. Hx, L. M, L. Cl, M. Jh, W. Mr, R. J, und P. Qj, „ImmunoCyt and cytokeratin 20 immunocytochemistry as adjunct markers for urine cytologic detection of bladder cancer: a prospective study.“, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 45–52, Feb. 2010.
- [49] V. B. Lokeshwar, T. Habuchi, H. B. Grossman, W. M. Murphy, S. H. Hautmann, G. P. Hemstreet III, A. V. Bono, R. H. Getzenberg, P. Goebell, B. J. Schmitz-Dräger, J. A. Schalken, Y. Fradet, M. Marberger, E. Messing, und M. J. Droller, „Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers“, *Urology*, Bd. 66, Nr. 6, Supplement 1, S. 35–63, Dez. 2005.
- [50] L. Galarneau, A. Loranger, S. Gilbert, und N. Marceau, „Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition“, *Exp. Cell Res.*, Bd. 313, Nr. 1, S. 179–194, Jan. 2007.
- [51] M. B. Omary, N.-O. Ku, G.-Z. Tao, D. M. Toivola, und J. Liao, „‘Heads and tails’ of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights“, *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 31, Nr. 7, S. 383–394, Juli 2006.
- [52] D. C. Altieri, „Validating survivin as a cancer therapeutic target“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 3, Nr. 1, S. 46–54, Jan. 2003.
- [53] A. D. Schimmer, „Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice“, *Cancer Res.*, Bd. 64, Nr. 20, S. 7183–7190, Okt. 2004.
- [54] M. Kappler, „Molekulare Charakterisierung des IAP Survivin in Weichteilsarkomen: Bedeutung für Prognose und Etablierung neuer Therapiestrategien /“, *ResearchGate*. .
- [55] F. Li und D. C. Altieri, „The Cancer Antiapoptosis Mouse Survivin Gene“, *Cancer Res.*, Bd. 59, Nr. 13, S. 3143–3151, Juli 1999.
- [56] N. E. Crook, R. J. Clem, und L. K. Miller, „An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif.“, *J. Virol.*, Bd. 67, Nr. 4, S. 2168–2174, Jan. 1993.
- [57] L. Chantalat, D. A. Skoufias, J.-P. Kleman, B. Jung, O. Dideberg, und R. L. Margolis, „Crystal Structure of Human Survivin Reveals a Bow Tie–Shaped Dimer with Two Unusual α -Helical Extensions“, *Mol. Cell*, Bd. 6, Nr. 1, S. 183–189, Juli 2000.
- [58] D. Grossman, P. J. Kim, O. P. Blanc-Brude, D. E. Brash, S. Tognin, P. C. Marchisio, und D. C. Altieri, „Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53“, 01-Okt-2001. .
- [59] E. M. Conway, S. Pollefeyt, M. Steiner–Mosonyi, W. Luo, A. Devriese, F. Lupu, F. Bono, N. Leducq, F. Dol, P. Schaeffer, D. Collen, und J. Herbert, „Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways“, *Gastroenterology*, Bd. 123, Nr. 2, S. 619–631, Aug. 2002.
- [60] S. Weikert, „Der Apoptose-Inhibitor Survivin: Ein Tumormarker mit dem Expressionsprofil eines Cancer/Testis-Antigens.“, Freie Universität Berlin, Freie Universität Berlin, Germany, 2007.
- [61] H. Marusawa, S. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm, und J. C. Reed, „HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression“, *EMBO J.*, Bd. 22, Nr. 11, S. 2729–2740, Juni 2003.
- [62] A. B. Als, L. Dyrskjøt, H. von der Maase, K. Koed, F. Mansilla, H. E. Toldbod, J. L. Jensen, B. P. Uhløi, L. Sengeløv, K. M. E. Jensen, und T. F. Ørntoft, „Emmprin and Survivin Predict Response and Survival following Cisplatin-Containing Chemotherapy in

- Patients with Advanced Bladder Cancer“, *Clin. Cancer Res.*, Bd. 13, Nr. 15, S. 4407–4414, Aug. 2007.
- [63] M. Al-Maghrebi, E. O. Kehinde, K. Kapila, und J. T. Anim, „Urinary Survivin mRNA Expression and Urinary Nuclear Matrix Protein 22 BladderChek® and Urine Cytology in the Detection of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder“, *Med. Princ. Pract.*, Bd. 21, Nr. 3, S. 295–297, 2012.
- [64] O. Moussa, H. Abol-Enein, N. K. Bissada, T. Keane, M. A. Ghoneim, und D. K. Watson, „Evaluation of Survivin Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Noninvasive Detection of Bladder Cancer“, *J. Urol.*, Bd. 175, Nr. 6, S. 2312–2316, Juni 2006.
- [65] I. J. Schultz, K. Wester, H. Straatman, L. A. Kiemeny, M. Babjuk, J. Mares, J. L. Willems, D. W. Swinkels, J. A. Witjes, P.-U. Malmström, und J. B. de Kok, „Gene Expression Analysis for the Prediction of Recurrence in Patients with Primary Ta Urothelial Cell Carcinoma“, *Eur. Urol.*, Bd. 51, Nr. 2, S. 416–423, Feb. 2007.
- [66] S. F. Shariat, R. Ashfaq, P. I. Karakiewicz, O. Saeedi, A. I. Sagalowsky, und Y. Lotan, „Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality“, *Cancer*, Bd. 109, Nr. 6, S. 1106–1113, März 2007.
- [67] S. F. F. Shariat, R. Casella, S. M. E. M. Khoddami, G. Hernandez, T. Sulser, T. Gasser, und S. P. Lerner, „Urine Detection of Survivin is a Sensitive Marker for the Noninvasive Diagnosis of Bladder Cancer“, *J. Urol.*, Bd. 171, Nr. 2, Part 1, S. 626–630, Feb. 2004.
- [68] J. H. Ku, G. Godoy, G. E. Amiel, und S. P. Lerner, „Urine survivin as a diagnostic biomarker for bladder cancer: a systematic review“, *BJU Int.*, Bd. 110, Nr. 5, S. 630–636, Sep. 2012.
- [69] G. Johnen, K. Gawrych, H. Bontrup, B. Pesch, D. Taeger, S. Banek, M. Kluckert, H. Wellhäußer, F. Eberle, M. Nasterlack, G. Leng, A. Stenzl, T. Brüning, und UroScreen Study Group, „Performance of survivin mRNA as a biomarker for bladder cancer in the prospective study UroScreen“, *PLoS One*, Bd. 7, Nr. 4, S. e35363, 2012.
- [70] C. Jeon, M. Kim, C. Kwak, H. H. Kim, und J. H. Ku, „Prognostic Role of Survivin in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis“, *PLoS ONE*, Bd. 8, Nr. 10, Okt. 2013.
- [71] D. Chatziharalambous, V. Lygirou, A. Latosinska, K. Stravodimos, A. Vlahou, V. Jankowski, und J. Zoidakis, „Analytical Performance of ELISA Assays in Urine: One More Bottleneck towards Biomarker Validation and Clinical Implementation“, *PLoS ONE*, Bd. 11, Nr. 2, Feb. 2016.
- [72] Y. Lotan und C. G. Roehrborn, „Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses“, *Urology*, Bd. 61, Nr. 1, S. 109–118, Jan. 2003.
- [73] H. Hauner, L. von Ferber, und I. Köster, „Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten: Sekundärdatenanalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund“, *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.*, Bd. 117, Nr. 17, S. 645–650, 1992.
- [74] R. J. Sylvester, A. P. M. van der Meijden, W. Oosterlinck, J. A. Witjes, C. Bouffoux, L. Denis, D. W. W. Newling, und K. Kurth, „Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials“, *Eur. Urol.*, Bd. 49, Nr. 3, S. 466–477, März 2006.
- [75] H.-T. Li, C. E. Duymich, D. J. Weisenberger, und G. Liang, „Genetic and Epigenetic Alterations in Bladder Cancer“, *Int. Neurourol. J.*, Bd. 20, Nr. Suppl 2, S. S84-94, Nov. 2016.

- [76] A. Di Meo, J. Bartlett, Y. Cheng, M. D. Pasic, und G. M. Yousef, „Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies“, *Mol. Cancer*, Bd. 16, Apr. 2017.
- [77] B. J. Schmitz-Dräger, M. Droller, V. B. Lokeshwar, Y. Lotan, M. A. Hudson, B. W. van Rhijn, M. J. Marberger, Y. Fradet, G. P. Hemstreet, P.-U. Malmstrom, O. Ogawa, P. I. Karakiewicz, und S. F. Shariat, „Molecular Markers for Bladder Cancer Screening, Early Diagnosis, and Surveillance: The WHO/ICUD Consensus“, *Urol. Int.*, Bd. 94, Nr. 1, S. 1–24, 2015.
- [78] Z. L. Smith und T. J. Guzzo, „Urinary markers for bladder cancer“, *F1000Prime Rep.*, Bd. 5, Juli 2013.
- [79] M. Babjuk, W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Böhle, und J. Palou-Redorta, „EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder“, *Eur. Urol.*, Bd. 54, Nr. 2, S. 303–314, Aug. 2008.
- [80] C. M. Sturgeon, M. J. Duffy, U.-H. Stenman, H. Lilja, N. Brünner, D. W. Chan, R. Babaian, R. C. Bast, B. Dowell, F. J. Esteva, C. Haglund, N. Harbeck, D. F. Hayes, M. Holten-Andersen, G. G. Klee, R. Lamerz, L. H. Looijenga, R. Molina, H. J. Nielsen, H. Rittenhouse, A. Semjonow, I.-M. Shih, P. Sibley, G. Sölétormos, C. Stephan, L. Sokoll, B. R. Hoffman, und E. P. Diamandis, „National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers“, *Clin. Chem.*, Bd. 54, Nr. 12, S. e11–e79, Dez. 2008.
- [81] M. C. Hall, S. S. Chang, G. Dalbagni, R. S. Pruthi, J. D. Seigne, E. C. Skinner, J. S. Wolf, und P. F. Schellhammer, „Guideline for the Management of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer (Stages Ta, T1, and Tis): 2007 Update“, *J. Urol.*, Bd. 178, Nr. 6, S. 2314–2330, Dez. 2007.
- [82] S. Banek, C. Schwentner, D. Täger, B. Pesch, M. Nasterlack, G. Leng, K. Gawrych, N. Bonberg, G. Johnen, M. Kluckert, G. Gakis, T. Todenhöfer, J. Hennenlotter, T. Brüning, und A. Stenzl, „Prospective evaluation of fluorescence-in situ-hybridization to detect bladder cancer: Results from the UroScreen-Study“, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, Bd. 31, Nr. 8, S. 1656–1662, Nov. 2013.
- [83] M. G. Friedrich, A. Hellstern, S. H. Hautmann, M. Graefen, S. Conrad, E. Huland, und H. Huland, „Clinical use of Urinary Markers For The Detection And Prognosis Of Bladder Carcinoma: A Comparison Of Immunocytology With Monoclonal Antibodies Against Lewis X And 486p3/12 With The BTA STAT And NMP22 Tests“, *J. Urol.*, Bd. 168, Nr. 2, S. 470–474, Aug. 2002.
- [84] T. Smrkolj, M. Mihelič, A. Sedlar, I. Sterle, J. Osredkar, und B. Sedmak, „Performance of nuclear matrix protein 22 urine marker and voided urine cytology in the detection of urinary bladder tumors“, *Clin. Chem. Lab. Med.*, Bd. 49, Nr. 2, S. 311–316, 2010.
- [85] E. Coskuner, I. Cevik, A. Ozkan, O. Dillioglugil, und A. Akdas, „In the cystoscopic follow-up of non-muscle-invasive transitional cell carcinoma, NMP-22 works for high grades, but unreliable in low grades and upper urinary tract tumors“, *Int. Urol. Nephrol.*, Bd. 44, Nr. 3, S. 793–798, Juni 2012.
- [86] R. Ritter, J. Hennenlotter, U. Kühs, U. Hofmann, S. Aufderklamm, P. Blutbacher, A. Deja, A. Hohneder, V. Gerber, G. Gakis, A. Stenzl, C. Schwentner, und T. Todenhöfer, „Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer“, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, Bd. 32, Nr. 3, S. 337–344, Apr. 2014.
- [87] T. H. Ecke, S. Weiß, C. Stephan, S. Hallmann, D. Barski, T. Otto, und H. Gerullis, „UBC(®) Rapid Test for detection of carcinoma in situ for bladder cancer“, *Tumour Biol.*

- J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, Bd. 39, Nr. 5, S. 1010428317701624, Mai 2017.
- [88] J. Styrke, H. Henriksson, B. Ljungberg, M. Hasan, I. Silfverberg, R. Einarsson, P.-U. Malmström, und A. Sherif, „Evaluation of the diagnostic accuracy of UBC(®) Rapid in bladder cancer: a Swedish multicentre study“, *Scand. J. Urol.*, S. 1–8, Apr. 2017.
- [89] O. W. Hakenberg, S. Fuessel, K. Richter, M. Froehner, S. Oehlschlaeger, P. Rathert, A. Meye, und M. P. Wirth, „Qualitative and quantitative assessment of urinary cytokeratin 8 and 18 fragments compared with voided urine cytology in diagnosis of bladder carcinoma“, *Urology*, Bd. 64, Nr. 6, S. 1121–1126, Dez. 2004.
- [90] C. Mian, M. Lodde, A. Haitel, E. Egarter Vigl, M. Marberger, und A. Pycha, „Comparison of two qualitative assays, the UBC rapid test and the BTA stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder“, *Urology*, Bd. 56, Nr. 2, S. 228–231, Aug. 2000.
- [91] G. L. Schroeder, M.-F. Lorenzo-Gomez, S. H. Hautmann, M. G. Friedrich, S. Ekici, H. Huland, und V. Lokeshwar, „A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection“, *J. Urol.*, Bd. 172, Nr. 3, S. 1123–1126, Sep. 2004.
- [92] T. H. Ecke, S. Weiß, C. Stephan, S. Hallmann, C. Arndt, D. Barski, T. Otto, und H. Gerullis, „UBC®Rapid Test-A Urinary Point-of-Care (POC) Assay for Diagnosis of Bladder Cancer with a focus on Non-Muscle Invasive High-Grade Tumors: Results of a Multicenter-Study“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 19, Nr. 12, Dez. 2018.
- [93] Y. Lotan, U. Capitanio, S. F. Shariat, G. C. Hutterer, und P. I. Karakiewicz, „Impact of clinical factors, including a point-of-care nuclear matrix protein-22 assay and cytology, on bladder cancer detection“, *BJU Int.*, Bd. 103, Nr. 10, S. 1368–1374, Mai 2009.
- [94] S. Huber, C. Schwentner, D. Taeger, B. Pesch, M. Nasterlack, G. Leng, T. Mayer, K. Gawrych, N. Bonberg, M. Pelster, G. Johnen, H. Bontrup, H. Wellhäußer, H.-G. Bierfreund, C. Wiens, C. Bayer, F. Eberle, B. Scheuermann, M. Kluckert, G. Feil, T. Brüning, A. Stenzl, und the UroScreen Study Group, „Nuclear matrix protein-22: a prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer. Results from the UroScreen study“, *BJU Int.*, Bd. 110, Nr. 5, S. 699–708, Sep. 2012.
- [95] S. F. Shariat, J. A. Karam, Y. Lotan, und P. I. Karakiewicz, „Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring“, *Rev. Urol.*, Bd. 10, Nr. 2, S. 120–135, 2008.
- [96] J. W. A. Findlay und R. F. Dillard, „Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays“, *AAPS J.*, Bd. 9, Nr. 2, S. E260–E267, Juni 2007.
- [97] R. N. Fichorova, N. Richardson-Harman, M. Alfano, L. Belec, C. Carbonneil, S. Chen, L. Cosentino, K. Curtis, C. S. Dezzutti, B. Donoval, G. F. Doncel, M. Donaghay, J.-C. Grivel, E. Guzman, M. Hayes, B. Herold, S. Hillier, C. Lackman-Smith, A. Landay, L. Margolis, K. H. Mayer, J.-M. Pasicznyk, M. Pallansch-Cokonis, G. Poli, P. Reichelderfer, P. Roberts, I. Rodriguez, H. Saidi, R. R. Sassi, R. Shattock, und J. E. Cummins, Jr., „Biological and Technical Variables Affecting Immunoassay Recovery of Cytokines from Human Serum and Simulated Vaginal Fluid: A Multicenter Study“, *Anal. Chem.*, Bd. 80, Nr. 12, S. 4741–4751, Juni 2008.
- [98] J. Zoidakis, M. Makridakis, P. G. Zerefos, V. Bitsika, S. Esteban, M. Frantzi, K. Stravodimos, N. P. Anagnou, M. G. Roubelakis, M. Sanchez-Carbayo, und A. Vlahou, „Profilin 1 is a Potential Biomarker for Bladder Cancer Aggressiveness“, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, Bd. 11, Nr. 4, Apr. 2012.
- [99] J. Adachi, C. Kumar, Y. Zhang, J. V. Olsen, und M. Mann, „The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins“, *Genome Biol.*, Bd. 7, Nr. 9, S. R80, 2006.
- [100] R. Reverberi und L. Reverberi, „Factors affecting the antigen-antibody reaction“, *Blood Transfus.*, Bd. 5, Nr. 4, S. 227–240, Nov. 2007.

- [101] S. Khan, H. F. Bennit, und N. R. Wall, „The emerging role of exosomes in survivin secretion“, *Histol. Histopathol.*, Bd. 30, Nr. 1, S. 43–50, Jan. 2015.
- [102] A. K. Srivastava, P. K. Singh, K. Srivastava, D. Singh, D. Dalela, S. K. Rath, M. M. Goel, und M. L. Brahma Bhatt, „Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer“, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, Bd. 14, Nr. 1, S. 81–85, 2013.
- [103] X. Li, Y. Wang, J. Xu, und Q. Zhang, „Sandwich ELISA for detecting urinary Survivin in bladder cancer“, *Chin. J. Cancer Res.*, Bd. 25, Nr. 4, S. 375–381, Aug. 2013.
- [104] H. Wang, X. Xi, X. Kong, G. Huang, und G. Ge, „The expression and significance of survivin mRNA in urinary bladder carcinomas“, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Bd. 130, Nr. 8, S. 487–490, Aug. 2004.
- [105] J. L. J. Vriesema, M. H. Poucki, L. A. L. M. Kiemeneij, und J. A. Witjes, „Patient opinion of urinary tests versus flexible urethrocytoscropy in follow-up examination for superficial bladder cancer: a utility analysis“, *Urology*, Bd. 56, Nr. 5, S. 793–797, Nov. 2000.
- [106] D. C. Altieri, „Survivin - the inconvenient iap“, *Semin. Cell Dev. Biol.*, Bd. 39, S. 91–96, März 2015.
- [107] M. Garg, „Epithelial plasticity and cancer stem cells: Major mechanisms of cancer pathogenesis and therapy resistance“, *World J. Stem Cells*, Bd. 9, Nr. 8, S. 118–126, Aug. 2017.
- [108] J. Adamowicz, M. Pokrywczyńska, J. Tworkiewicz, Z. Wolski, und T. Drewa, „The relationship of cancer stem cells in urological cancers“, *Cent. Eur. J. Urol.*, Bd. 66, Nr. 3, S. 273–280, 2013.
- [109] S. Eissa, S. Badr, M. Barakat, A. S. Zaghloul, und M. Mohanad, „The diagnostic efficacy of urinary survivin and hyaluronidase mRNA as urine markers in patients with bladder cancer“, *Clin. Lab.*, Bd. 59, Nr. 7–8, S. 893–900, 2013.
- [110] B. Pesch, T. Brüning, G. Johnen, S. Casjens, N. Bonberg, D. Taeger, A. Müller, D. G. Weber, und T. Behrens, „Biomarker research with prospective study designs for the early detection of cancer“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, Bd. 1844, Nr. 5, S. 874–883, Mai 2014.
- [111] S. Larré, J. W. F. Catto, M. S. Cookson, E. M. Messing, S. F. Shariat, M. S. Soloway, R. S. Svatek, Y. Lotan, A. R. Zlotta, und H. B. Grossman, „Screening for Bladder Cancer: Rationale, Limitations, Whom to Target, and Perspectives“, *Eur. Urol.*, Bd. 63, Nr. 6, S. 1049–1058, Juni 2013.
- [112] F. Alznauer, S. Martinelli, S. Yousefi, C. Thürig, I. Schmid, E. M. Conway, M. H. Schöni, P. Vogt, C. Mueller, M. F. Fey, U. Zangemeister-Wittke, und H.-U. Simon, „Inflammation-associated Cell Cycle-independent Block of Apoptosis by Survivin in Terminally Differentiated Neutrophils“, *J. Exp. Med.*, Bd. 199, Nr. 10, S. 1343–1354, Mai 2004.
- [113] T. Atsumi, R. Singh, L. Sabharwal, H. Bando, J. Meng, Y. Arima, M. Yamada, M. Harada, J.-J. Jiang, D. Kamimura, H. Ogura, T. Hirano, und M. Murakami, „Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology“, *Cancer Res.*, Bd. 74, Nr. 1, S. 8–14, Jan. 2014.
- [114] E. Guven Maiorov, O. Keskin, A. Gursoy, und R. Nussinov, „The structural network of inflammation and cancer: Merits and challenges“, *Semin. Cancer Biol.*, Bd. 23, Nr. 4, S. 243–251, Aug. 2013.
- (a) Quelle: Durchführung UBC® Rapid Test und optische Auswertung: UBC® Rapid REF 10-038 Gebrauchsanweisung

Aktuelle Therapie

- Transurethrale Resektion der Blase (TURB); Datum ____ | ____ | ____
- Adjuvante Therapie in der Zeit von _____ bis _____
- BCG _____

Andere Erkrankungen:

- Sonstige Krebserkrankungen nein ja, welche? _____ ICD-10 C [] [] []
- Diabetes mellitus nein ja, Erstdiagnose _____ Tabletten Insulin
- Aktuelle Medikation falls ja, welche Bluthochdruck Blutverdünnung Antiphlogistika
(BCG/Tice, Thiopeta, Digoxin, Acetaminophen, Vitamin C, Na-Salicylat, Na-Acetylsalicylat, Ampicillin, Tetracyclin)
- Bekanntes Hamsteinleiden nein ja, zuletzt am _____ nicht bekannt
- Sonstige, nicht maligne Erkrankungen _____

II) Laborlaufzettel

Labor-Laufzettel

MolMed-ID

XXXX
 Nummer
 (Etikett)

Datum der Probennahme

||_|_|_|_|_|_|_|_|

Menge Urin |_|_|_| mL Abnahmezeitpunkt [hh:mm] |_|_|:|_|_|

Beschaffenheit: klar trüb blutig oder _____

Uhrzeit Zentrifugation (1500 x g) [hh:mm] |_|_|:|_|_|

Lagerung Vollurinprobe bei -20 °C

Uhrzeit [hh:mm] |_|_|:|_|_|

Lagerung Überstandproben bei -20 °C

Uhrzeit [hh:mm] |_|_|:|_|_|

Pellet mit RNAlater/PBS vermischt und Lagerung bei -20 °C

Uhrzeit [hh:mm] |_|_|:|_|_|

Durchgeführt von: _____

(Unterschrift)

Urinstatus

1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 g/L

Urindichte: _____

5 6 7 8 9

pH-Wert: _____

<30 50 70 90 110 150 180 200 250 >250 mg/dL

Kreatinin: _____

3,2 3,5 3,8 4,0 4,3 4,5 4,8 5,0 5,2 5,5 g/dL

Albumin: _____

neg. 30 100 500 mg/dL

Protein: _____

Leukozyten:	neg.	10-25	75	500 /µl		_____
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Erythrozyten:	neg.	10-25	75	500 /µl		_____
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Glucose:	neg.	50	100	300	500 mg/dL	_____
	<input type="checkbox"/>					
Keton:	neg.	1+	2+	3+		_____
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Nitrit:	neg.	pos.				_____
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Bilirubin:	neg.	1+	2+	3+		_____
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Urobilinogen:	neg.	1+	2+	3+	4+ mg/dl	_____
	<input type="checkbox"/>					

Blut-Werte:

CRP:	<1,0	1,0	2,5	5,0	10	20	30	40	100	>100 mg/dL	_____
	<input type="checkbox"/>										
Harnstoff:	<10	10	15	20	30	40	50	60	>60 mg/dl		_____
	<input type="checkbox"/>										
Kreatinin:	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,5 mg/dL	_____
	<input type="checkbox"/>										
Hb:	<10	10	12	15	18	20	>20 g/dL				_____
	<input type="checkbox"/>										
Leukos:	<4,3	5	6	7	8	9	>10,8 g/dL				_____
	<input type="checkbox"/>										

Mikrobiologie

- E. coli* sonstige:
- Enterokokken
- Streptokokken
- Proteus
- Pseudomonas
- Staphylokokken
- Klebsiellen

UBC rapid

- positiv negativ nicht auswertbar

Quantitativer Wert: _____

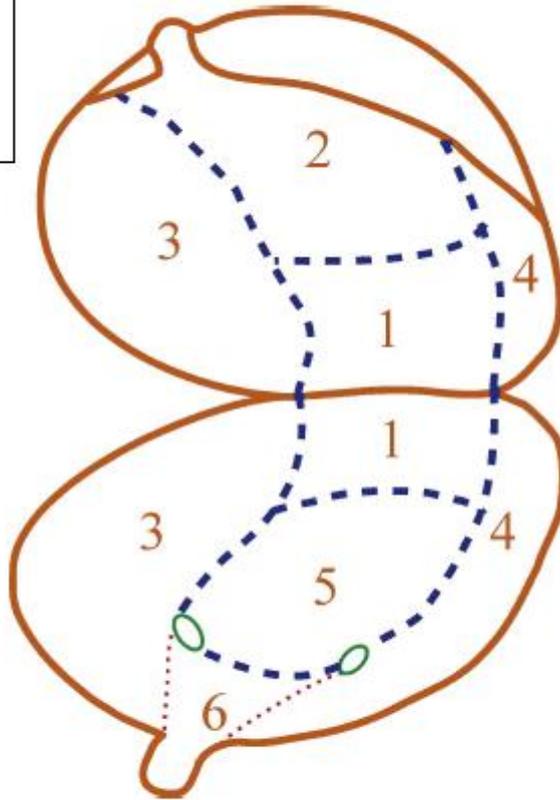
Uricult

- steril

Keimzahl 1 Tsd 10 Tsd 100 Tsd >100 Tsd

Urologisch-Endoskopische Befundskizze

Patientenetikett



Legende:	
Papillärer Tumor	→ unrandetes, gestricheltes Areal 
Solider Tumor	→ unrandet, gekreuzt - gestrichelt 
Rötung	→ gestrichelt, NICHT unrandet 
Zangen - PE	→ x 
Heiße - PE	→ umkreistes x 
Narbe	→ Buchstabe N
Fluoreszenz	→ Buchstabe F

Bitte markieren:

Anzahl der Tumore: 1 / 2-7 / > 8

Größe: < 3 cm / > 3 cm

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Norman Arndt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analytische und klinische Validierung zweier Harnblasentumormarker: UBC® Rapid (Zytokeratin 8 + 18) und Survivin“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

04.03.2019

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Christian Arndt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a multicentre-study for Urinary Bladder Cancer Antigen (UBC) rapid as Tumour Marker for Urinary Bladder Cancer
Anticancer Res 2014; 34: 11-12

Beitrag:

Rekrutierung der Patienten (Lukaskrankenhaus Neuss); Organisation, Koordination und Durchführung der Experimente, Datenerhebung; Ergebnisteil bezogen auf den Teil des Lukaskrankenhauses Neuss; Anteile Diskussion, Material und Methoden Tabelle 1 (Study centre II)

Ecke TH, Arndt C, Stephan C, Hallmann S, Lux O, Otto T, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a Multicentre Study of the UBC Rapid Test for Detection of Urinary Bladder Cancer
Anticancer Res 2015; 35(5): 2651-5

Beitrag:

Rekrutierung der Patienten (Lukaskrankenhaus Neuss); Organisation, Koordination und Durchführung der Experimente, Datenerhebung; Ergebnisteil bezogen auf den Teil des Lukaskrankenhauses Neuss; Anteile Diskussion, Material und Methoden Tabelle 1 (Study centre II)

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
New Results of a Multicentre-study for UBC rapid as Marker for Urinary Bladder Cancer
Tumor Biol 2015; 36 (Suppl 1): S56

Beitrag:

Aufbereitung der Ergebnisse, Durchführung der Experimente, Datenerhebung; Ergebnisteil bezogen auf den Teil des Lukaskrankenhauses Neuss

Ecke TH, Arndt C, Gützlaff S, Lux O, Stephan C, Otto T, Hallmann S, Gerullis H
Results of a multicenter-study for UBC® *Rapid* as marker for urinary bladder cancer with focus on high risk tumours
Urologia Fennica 2016; 1: 38

Beitrag:

Aufbereitung der Ergebnisse, Durchführung der Experimente, Datenerhebung; Ergebnisteil bezogen auf den Teil des Lukaskrankenhauses Neuss; Überarbeitung des Manuskripts

Gleichenhagen J, Arndt C, Casjens S, Meinig C, Gerullis H, Raiko I, Brüning T, Ecke T, Johnen G
Evaluation of a New Survivin ELISA and UBC® Rapid for the Detection of Bladder Cancer in Urine.
Int J Mol Sci. 2018 Jan 11;19(1)

Beitrag:

Aufbereitung der Ergebnisse, Durchführung der Experimente, Datenerhebung; Ergebnisteil bezogen auf das Department of Urology, Lukaskrankenhaus Neuss, 41464 Neuss, Germany (Results: Table 1, 2, 3; Figure 3, 4); Anteile Diskussion, Überarbeitung des Manuskripts

Ecke TH, Weiß S, Stephan C, Hallmann S, Arndt C, Barski D, Otto T, Gerullis H.
UBC® Rapid Test—A Urinary Point-of-Care (POC) Assay for Diagnosis of Bladder Cancer with a focus on Non-Muscle Invasive High-Grade Tumors: Results of a Multicenter-Study
Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(12), 3841.

Beitrag:

Aufbereitung der Ergebnisse, Durchführung der Experimente, Datenerhebung; Ergebnisteil bezogen auf das Department of Urology, Lukaskrankenhaus Neuss, 41464 Neuss, Germany (Results: Table 1, 2; Figure 1, 2, 3); Anteile Diskussion, Überarbeitung des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Curriculum Vitae Christian Arndt

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a multicentre-study for Urinary Bladder Cancer Antigen (UBC) rapid as Tumour Marker for Urinary Bladder Cancer
Anticancer Res 2014; 34: 11-12

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a multicentre-study for Urinary Bladder Cancer Antigen (UBC) rapid as Tumour Marker for Urinary Bladder Cancer
Vortrag, 16. Int. Hamburger Symposium für Tumormarker 2014, Hamburg, 19.10.2014

Ecke TH, Arndt C, Stephan C, Hallmann S, Lux O, Otto T, Ruttloff J, Gerullis H
Preliminary Results of a Multicentre Study of the UBC Rapid Test for Detection of Urinary Bladder Cancer
Anticancer Res 2015; 35(5): 2651-5

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
New results of a multicenter-study for urinary bladder cancer antigen (UBC) rapid as marker for urinary bladder cancer
Poster, ESUR-SBUR15, 11th World Congress Meeting on Urological Research, Nijmegen, Niederlande, 11.09.2015

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
New Results of a Multicentre-Study for UBC rapid as Marker for Urinary Bladder Cancer
Poster, 42. Congress of the ISOBM, Zakopane, Poland, 04.10.2015

Ecke TH, Arndt C, Lux O, Otto T, Hallmann S, Ruttloff J, Gerullis H
New Results of a Multicentre-study for UBC rapid as Marker for Urinary Bladder Cancer
Tumor Biol 2015; 36 (Suppl 1): S56

Ecke TH, Arndt C, Gützlaff S, Lux O, Stephan C, Otto T, Hallmann S, Gerullis H
Results of a multicenter-study for UBC® *Rapid* as marker for urinary bladder cancer with focus on high risk tumours
Urologia Fennica 2016; 1: 38

Ecke TH, Arndt C, Gützlaff S, Lux O, Stephan C, Otto T, Hallmann S, Gerullis H
Results of a multicenter-study for UBC® *Rapid* as marker for urinary bladder cancer with focus on high risk tumours
Vortrag, Suomen Urologiyhdistyksen Talvipäivät 2016, Turku, Finnland, 12.02.2016

Gleichenhagen J, Arndt C, Casjens S, Pesch B, Gerullis H, Ecke T, Brüning T, Johnen G
Two are better than one: Complementary effects of survivin and UBC® *Rapid* for detection of bladder cancer
Vortrag, 14. Meeting of the IBCN, Bochum, 29.10.2016

Gleichenhagen J, Arndt C, Casjens S, Meinig C, Gerullis H, Raiko I, Brüning T, Ecke T, Johnen G
Evaluation of a New Survivin ELISA and UBC® Rapid for the Detection of Bladder Cancer in Urine.
Int J Mol Sci. 2018 Jan 11;19(1)

Ecke TH, Weiß S, Stephan C, Hallmann S, Arndt C, Barski D, Otto T, Gerullis H.
UBC® Rapid Test—A Urinary Point-of-Care (POC) Assay for Diagnosis of Bladder Cancer with a focus on Non-Muscle Invasive High-Grade Tumors: Results of a Multicenter-Study
Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(12), 3841.

Barski D, Arndt C, Gerullis H, Yang J, Boros M, Otto T, Kolberg HC.
Transvaginal PVDF-mesh for cystocele repair: A cohort study.
Int J Surg. 2017 Mar;39:249-254. doi: 10.1016/j.ijso.2017.02.006. Epub 2017 Feb 10.

Gerullis H, Georgas E, Borós M, Klosterhalfen B, Eimer C, Arndt C, Otto S, Barski D, Ysebaert D, Ramon A, Otto T.
Inflammatory reaction as determinant of foreign body reaction is an early and susceptible event after mesh implantation.
Biomed Res Int. 2014;2014:510807. doi: 10.1155/2014/510807. Epub 2014 Mar 26.

Gerullis H, Georgas E, Eimer C, Arndt C, Barski D, Lammers B, Klosterhalfen B, Borós M, Otto T.
Coating with autologous plasma improves biocompatibility of mesh grafts in vitro: development stage of a surgical innovation.
Biomed Res Int. 2013;2013:536814. doi: 10.1155/2013/536814. Epub 2013 Sep 17.

Gerullis H, Eimer C, Ecke TH, Georgas E, Arndt C, Otto T.
Combined treatment with pazopanib and vinflunine in patients with advanced urothelial carcinoma refractory after first-line therapy.
Anticancer Drugs. 2013 Apr;24(4):422-5. doi: 10.1097/CAD.0b013e32835efe78.

Gerullis H, Eimer C, Ecke TH, Georgas E, Freitas C, Kastenholz S, Arndt C, Heusch C, Otto T.
A phase II trial of temsirolimus in second-line metastatic urothelial cancer.
Med Oncol. 2012 Dec;29(4):2870-6. doi: 10.1007/s12032-012-0216-x. Epub 2012 Mar 25.

Gerullis H, Ecke TH, Janusch B, Arndt C, Heidari M, Oniani J, Otto T.
Long-term response in advanced bladder cancer involving the use of temsirolimus and vinflunine after platin resistance.
Anticancer Drugs. 2011 Oct;22(9):940-3. doi: 10.1097/CAD.0b013e328347a86a.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich es nicht verpassen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. habil. Thorsten Ecke für die wissenschaftliche und methodische Unterstützung, aber auch für seine Motivation und Geduld während der gesamten Ausarbeitung meiner Dissertation.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Dr. med. Holger Gerullis und Herrn Prof. Dr. med. Thomas Otto, die diese Arbeit erst möglich gemacht und mich stets durch zielführende Diskussionen und anhaltende Hilfestellungen unterstützt haben.

Frau Wiggen – Kremer und Herrn Dr. rer. nat. Jan Gleichenhagen möchte ich danken für die äußerst hilfreiche Begleitung meines praktischen Methodenteils der Arbeit, ebenso für die Hilfestellungen und Denkanstöße.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Lukaskrankenhauses bedanken, die mich Tag und Nacht zahlreich und konstruktiv unterstützt haben. Das betrifft insbesondere die Schwestern und Pfleger der Stationen U1 und C3.

Hier möchte ich die Stationsleitungen der U1 Claudia Reckmann und Klementina Krieger erwähnen. Auch die vielen nicht – wissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben mir sehr geholfen.

Mein besonderer Dank gilt noch den Herren Drs. med. Evangelos Georgas und Dimitri Barksis, Herrn Dr. jur. Christian Groß - Bölting sowie den Drs. rer. nat. Gisela Steffen und Kristina Tröster, die mich jederzeit fachlich, aber auch moralisch sehr unterstützt haben.

Danke auch an meine Kommilitonin und mittlerweile sehr gute Freundin Eileen Reppert, die zeitgleich mit mir ihre Dissertation verfasst hat und mir ebenfalls eine große Stütze war.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen Patienten, die freiwillig an dieser Studie teilgenommen und somit diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Nicht zuletzt widme ich diese Arbeit meiner Frau Sina, meinen Eltern, meiner Oma, meinem Bruder und meinen Freunden. Danke für eure unermüdliche Stärkung, Motivation und das immer offene Ohr für meine Gedanken.