

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

Evaluation des immunzytologischen uCyt+ -Tests in der  
urinbasierten Diagnostik des Harnblasenkarzinoms unter  
kritischem Einbezug der Rohdatenergebnisse vor dem Hin-  
tergrund einer potentiellen Interobserver-Variabilität

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Schwarz, Jennifer Alisha

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwentner

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Ulmer

Tag der Disputation: 24.10.2017

**In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Harnblasenkarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Pathogenese .....	2
1.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren .....	3
1.1.4	Klassifikation .....	4
1.1.5	Symptomatik .....	7
1.1.6	Diagnostik .....	8
1.1.7	Therapie.....	14
1.1.8	Klinisches Verhalten und Prognose.....	18
1.2	Fragestellung .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2.1	Ethische Belange.....	21
2.2	Datenschutz.....	21
2.3	Studienkollektiv.....	22
2.3.1	Einschlusskriterien .....	22
2.3.2	Ausschlusskriterien .....	22
2.4	Retrospektive Erfassung der Patientendaten .....	23
2.4.1	Erstellung der Datenbank .....	23
2.5	Uringewinnung.....	24
2.5.1	Uringewinnung aus dem unteren Harntrakt .....	24
2.5.2	Definition der mechanischen Manipulation .....	25
2.6	Urinstatus .....	25
2.6.1	Definition von Harnwegsinfekten und Hämaturie .....	26

<b>2.7 Durchführung des uCyt+-Tests.....</b>	<b>26</b>
2.7.1 Beschreibung der Testbestandteile .....	27
2.7.2 Herstellung der Sedimentpräparate .....	29
2.7.3 Auswertung der Sedimentpräparate .....	31
<b>2.8 Erfassung der Rohdaten des uCyt+-Tests .....</b>	<b>32</b>
2.8.1 Einteilung in verschiedene Gruppen fluoreszierender Zellen nach ihrem Granulations- und Fluoreszenzgrad .....	33
<b>2.9 Statistische Analysen .....</b>	<b>36</b>
2.9.1 Verteilungsanalysen .....	36
2.9.2 Kontingenzanalysen .....	36
2.9.3 Receiver Operating Characteristic-Kurven.....	39
2.9.4 Untersuchung potentieller Einflussparameter auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen.....	39
2.9.5 Ermittlung der richtig-positiven uCyt+-Ergebnisse unter den falsch-negativen Zytologie-Ergebnissen .....	41
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs .....</b>	<b>42</b>
3.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung .....	42
3.1.2 Vergleich des uCyt+-Testergebnisses mit dem Resultat der zystoskopischen und histologischen Untersuchung .....	42
3.1.3 Verteilung der Tumorstadien unter Patienten mit Blasentumor .....	44
3.1.4 Verteilung des Tumorgrades unter den Patienten mit Blasentumor .....	44
<b>3.2 Diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen bei variierenden ,cut off'-Werten.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Vergleich der uCyt+-Testergebnisse bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen bei variierenden ,cut off'-Werten .....	45
3.2.2 Vergleich der Sensitivität und der Spezifität für die einzelnen Zellgruppen bei ihrem jeweiligen ,best cut off'-Wert.....	50
3.2.3 Vergleich der diagnostischen Testwertigkeit bei gemeinsamer Betrachtung der roten und grünen Zellen bei variierenden ,cut off'-Werten .....	52

<b>3.3 Einfluss der Tumor-Histopathologie auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen .....</b>	<b>55</b>
3.3.1 Vergleich der Zellanzahl in Anhängigkeit des jeweils vorhandenen Tumorstadiums .....	55
3.3.2 Einfluss der Tumor-Invasivität auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen ..	57
3.3.3 Korrelation des Tumorgades mit der Anzahl der fluoreszierenden Zellen ...	58
<b>3.4 Wirkung potenzieller Einflussparameter auf das Testergebnis .....</b>	<b>59</b>
3.4.1 Einfluss der Rauchgewohnheit auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis.....	59
3.4.2 Einfluss einer vorliegenden Makro- oder Mikrohämaturie auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis.....	60
3.4.3 Einfluss mechanischer Manipulation bei der Uringewinnung auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis.....	61
3.4.4 Einfluss von Harnwegsinfekten auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis.....	62
3.4.5 Einfluss einer vorhandenen benignen Prostatahyperplasie oder eines Prostatakarzinoms auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis .....	62
3.4.6 Einfluss des Geschlechts auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis.....	64
3.4.7 Einfluss des Alters auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis..	65
<b>3.5 Betrachtung der positiven uCyt+-Ergebnisse unter den Patienten mit falsch-negativem Zytologie-Ergebnis .....</b>	<b>65</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Stellenwert des uCyt+-Tests in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms ..</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Klinische Aussage des uCyt+-Tests bei Wertung verschiedener Zellgruppen bei variierenden ‚cut off‘-Werten .....</b>	<b>68</b>
4.2.1 Einfluss der Erhöhung der ‚cut off‘-Werte .....	68
4.2.2 Einfluss der betrachteten Zellgruppen .....	70
4.2.3 Vergleich der diagnostischen Wertigkeit der grünen und roten Zellen .....	71
<b>4.3 Einfluss der Histopathologie auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen ....</b>	<b>73</b>
4.3.1 Einfluss des Tumorstadiums und der Tumorinvasivität .....	73

4.3.2	Einfluss des Tumorgrades .....	75
<b>4.4</b>	<b>Wirkung potentieller Einflussparameter auf das Testergebnis .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	Einfluss der Rauchgewohnheit .....	76
4.4.2	Einfluss einer Mikro-/ Makrohämaturie .....	77
4.4.3	Einfluss der mechanischen Manipulation bei Uringewinnung.....	78
4.4.4	Einfluss eines Harnwegsinfektes .....	79
4.4.5	Einfluss einer benignen Prostatahyperplasie oder eines Prostatakarzinoms	79
4.4.6	Einfluss des Geschlechts .....	80
4.4.7	Einfluss des Alters.....	82
<b>4.5</b>	<b>Diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests als Ergänzung zur Zytologie .....</b>	<b>83</b>
<b>4.6</b>	<b>Limitationen und Aspekte der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>84</b>
4.6.1	Technische Limitationen des uCyt+-Tests .....	84
4.6.2	Untersucherabhängigkeit der Testergebnisse.....	85
4.6.3	Falsch-positiv fluoreszierende Zellen.....	86
<b>4.7</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist ein maligner, epithelialer Tumor der Harnblasenwand. Er stellt 2% aller malignen Tumore dar und ist damit der fünfthäufigste Tumor insgesamt (Hautmann, 2010). Nach dem Prostatakarzinom ist er der zweithäufigste Tumor im Urogenitaltrakt (Bohle et al., 1996). Beim Mann tritt er nach Ergebnissen des Robert-Koch-Instituts (2012) nach Prostata, Lunge und Kolon am vierthäufigsten auf, bei der Frau steht er auf Platz 14 aller malignen Tumore. Männer sind dabei mit 4,5% mehr als doppelt so häufig betroffen als Frauen (1,8%) (Abbildung 1) (Robert-Koch-Institut, 2017b).

Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes erkrankten im Jahr 2010 allein in Deutschland etwa 28.000 Menschen an einem invasiven oder nicht-invasiven Harnblasenkarzinom (Kaatsch et al., 2013). Die aktuellsten Werte für die Inzidenz errechnete das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) für das Jahr 2013. Für die Männer zeigt die Datenabfrage eine altersstandardisierte Rate von 12,0 und für Frauen 3,2 pro 100.000 Einwohner in Deutschland (Welt-Standard) (Robert-Koch-Institut, 2017a). Dabei ist in Europa die höchste Inzidenz in den westlichen Industrienationen zu beobachten, während in den östlichen Regionen deutlich weniger Menschen erkranken (Babjuk et al., 2011).

In dem Band "Cancer Incidence in Five Continents Vol. X, IARC" wurden die Statistiken der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) für die einzelnen Weltnationen zusammengetragen. Diese Werte sind dank der einheitlich festgelegten Altersstandardisierung gut miteinander vergleichbar. Beispielsweise in der Gegenüberstellung der Inzidenzraten für den Zeitraum von 2003 bis 2007 für Algerien (Männer 8,6 pro 100.000, Frauen 2,5 pro 100.000) und für den Süden Deutschlands (Männer 21 pro 100.000, Frauen 5,5 pro 100.000) wird deutlich der



Unterschied der Inzidenz in mehr und weniger industrialisierten Nationen erkennbar (Section of Cancer Information, 2014). Das mittlere Alter der Erkrankten zum Zeitpunkt der Diagnose liegt zwischen 65 und 70 Jahr (Murta-Nascimento et al., 2007, Hautmann, 2010). Aufgrund des steigenden Altersquotienten (Verhältnis der Personen ab 65 Jahren zu 100 Personen im erwerbsfähigen Alter) kann damit gerechnet werden, dass die Zahl der altersbedingten Neuerkrankungen in den folgenden Jahren weiter zunehmen wird (Ploeg et al., 2009).

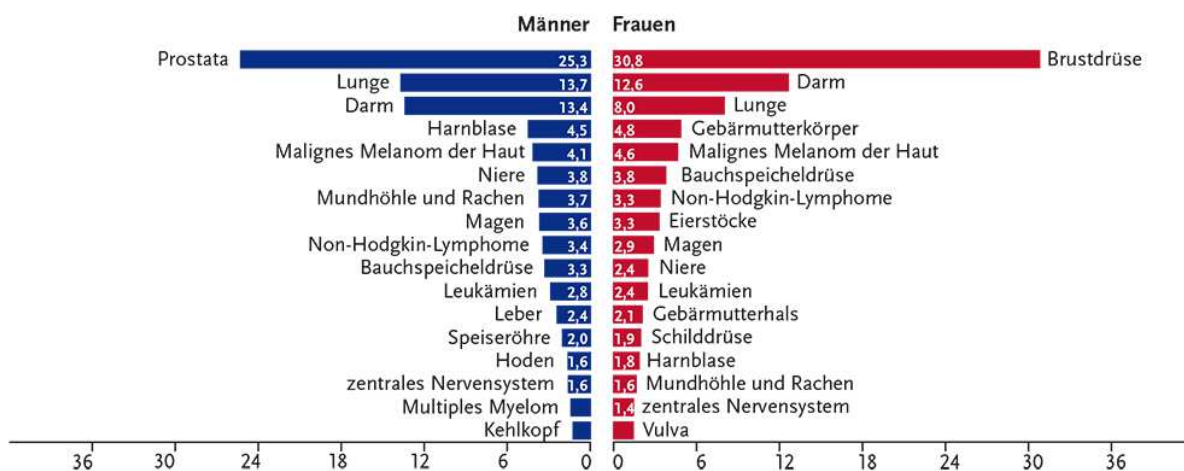


Abbildung 1; Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) - Angaben in Prozent (Robert-Koch-Institut, 2017b)

### 1.1.2 Pathogenese

Rund 90% der Harnblasenkarzinome erweisen sich histologisch als Übergangsepithelkarzinome mit Ursprung im Urothel (Hautmann, 2010). Bei etwa 5% der Tumore handelt es sich um Plattenepithelkarzinome, welche vor allem bei Patienten mit chronischen Harnblasenirritationen (zum Beispiel bei Katheterträgern oder bei Patienten mit Harnblasenstein) gehäuft auftreten. Nur etwa 0,5-2% sind auf Adenokarzinome zurückzuführen. In selteneren Fällen finden sich auch kleinzellige Karzinome, Sarkome, Paragangliome, Melanome oder Lymphome (Schmelz, 2010).

### 1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Als größter Risikofaktor für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms wird in den westlichen Industrienationen der Nikotinabusus angesehen (Haag et al., 2009). Er ist für etwa die Hälfte der Harnblasentumore der Männer, sowie für etwa ein Drittel der Blasenkarzinome der Frauen verantwortlich (Zeegers et al., 2000). Studien beweisen, dass das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken bei Menschen, die regelmäßig Nikotin konsumieren im Vergleich zu lebenslangen Nichtrauchern um das Vier- bis Sechsfache höher ist. Dabei haben Faktoren wie Menge und Dauer, sowie das Alter bei Beginn des Nikotinkonsums einen direkten Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Castelao et al., 2001, Bjerregaard et al., 2006).

Die beruflich bedingte Exposition gegenüber aromatischen Aminen ist ein bekannter und nach dem Nikotinkonsum der zweitwichtigste Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom (Kakehi et al., 2010, Chu et al., 2013). Aromatische Amine sind die am meisten mit dem Tumor gekoppelten berufsbegleitenden Chemikalien (Ploeg et al., 2009). Mit ihnen kommen vor allem Arbeiter der Färbemittel-, Leder-, Maler-, Gummi- und Kohleindustrie in direkten Kontakt (Sökeland et al., 2008). In diesen Fällen können Harnblasenkarzinome als Berufskrankheit anerkannt werden. Es ist allerdings zu beachten, dass bis zum Auftreten eines Karzinoms die Latenzzeit bis zu 20 Jahre betragen kann (Haag et al., 2009).

Zu einer weiteren Risikogruppe gehören Menschen, die aufgrund von Dauerkathetern oder rezidivierenden Infekten persistierende Schleimhautirritationen aufweisen. Besonders in den Ursprungsländern (z.B. den Tropen und im Nahen und Fernen Osten) tritt das Harnblasenkarzinom häufig als Spätfolge einer Bilharziose auf. Diese parasitäre Infektionskrankheit stellt dort die häufigste Ursache des Harnblasenkarzinoms dar, welches sich in diesen Fällen meist als Plattenepithelkarzinom manifestiert (Sökeland et al., 2008). Diese Tumorart metastasiert zudem rapide über die Blut- und Lymphwege, weswegen die Lebenserwartung bei dieser Form der Erkrankung in der Regel geringer ist als bei den herkömmlichen Urothelkarzinomen (Makar, 1957).

Auch bei Patienten mit vorausgehender medizinischer Bestrahlung des kleinen Beckens ist das Risiko deutlich erhöht (Dempke, 2006).

Neben exogenen Faktoren scheinen auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen (Chu et al., 2013). 2007 fanden Murta-Nascimento et al. in ihrer Studie Werte, die für einen Einfluss von in der Familiengeschichte vorkommenden Harnblasenkarzinomen auf das Erkrankungsrisiko sprachen (Murta-Nascimento et al., 2007).

#### **1.1.4 Klassifikation**

Eine standardisierte Einteilung ist notwendig, um wissenschaftliche Studien, internationale Kommunikation und den Austausch zwischen den Kliniken und damit die Evaluation von Behandlungsmaßnahmen zu ermöglichen. Mittels der TNM-Klassifikation eines Patienten können Rückschlüsse auf dessen Prognose und die beste individuelle Therapie gezogen werden (UiCC, 2015).

##### **1.1.4.1 TNM – Klassifikation**

Die TNM-Klassifikation der UiCC (Union Internationale Contre le Cancer) stellt die heute international akzeptierte Standardeinteilung der Tumore dar (Cheng et al., 2009). Hierbei werden die Harnblasentumore wie auch die anderen malignen Tumore nach dem TNM-System (Tumor-Node-Metastasis) nach ihren Tumoreigenschaften (Größe und Infiltrationsverhalten) (T) und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) eingeteilt (UiCC, 2015) (siehe Abbildung 2).

Da Harnblasenkarzinome uni-, aber auch multilokal auftreten können, wird bei der Einteilung nach dem TNM-System der am weitesten fortgeschrittene Tumor als maßgebend gewählt (Dempke, 2006). Die Mehrheit der Blasenkarzinome sind oberflächliche Tumore, die auf die Mukosa (Tis, Ta) oder die Lamina propria (T1) beschränkt sind (Sullivan et al., 2009). Sobald ein Tumor jedoch in die Muskelschicht eingedrungen ist, zählt er zu den invasiven Tumoren (ab T2) (Pashos et al., 2002). Bei diesen wird, je nach Tiefe der Muskelinvasion, erneut zwischen oberflächlichen muskelfiltrierenden Tumoren (T2a) und tiefen invasiven Tumoren (T2b) unterschieden (Amin et al., 2013) (siehe Abbildung 3).

<b>T-Klassifikation</b>	
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	Nicht invasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert die Muskulatur a: Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte) b: Tumor infiltriert äußere Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe a: Mikroskopisch b: Makroskopisch
T4	Tumor infiltriert die Prostata, Uterus, Vagina oder Becken-/ Bauchwand a: Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina b: Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
<b>N-Klassifikation</b>	<b>Ausmaß der Lymphknoten-metastasierung</b>
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknoten
N1	Metastase in solitärem Lymphknoten $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitärem Lymphknoten $> 2$ cm in größter Ausdehnung oder multiple Lymphknoten $< 5$ cm
N3	Metastasen in Lymphknoten $> 5$ cm in größter Ausdehnung
<b>M-Klassifikation</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Abbildung 2; TNM-Klassifikation für Harnblasenkarzinome (Schmelz, 2010)

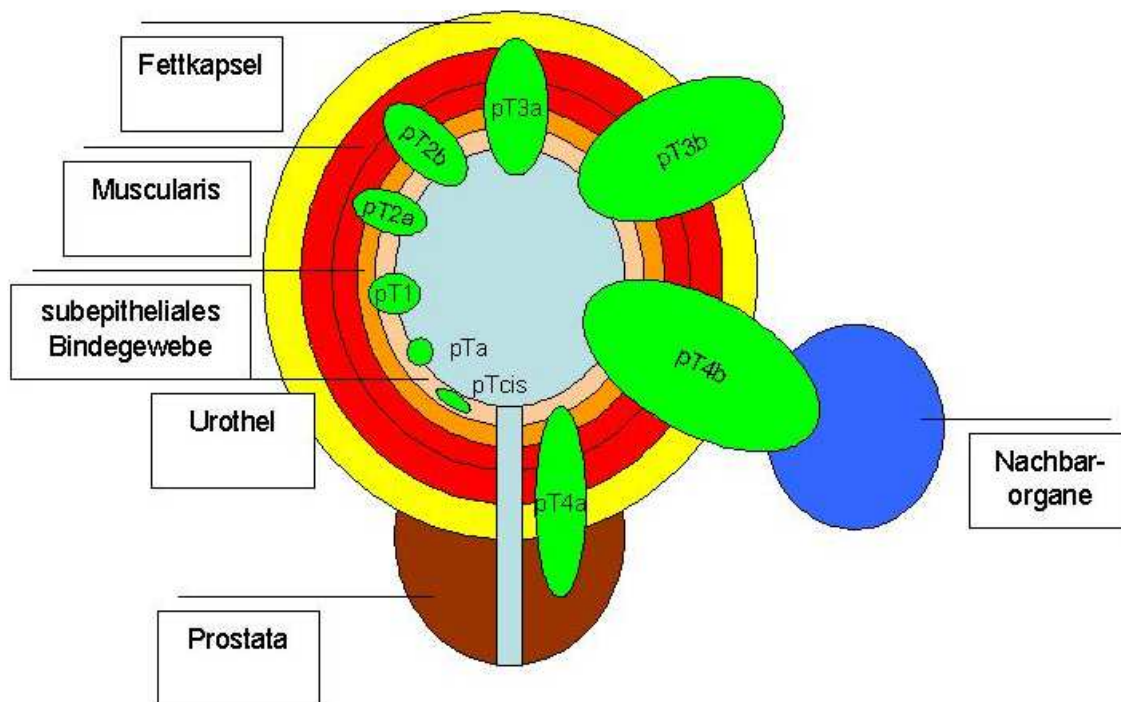


Abbildung 3; Invasionstiefen des Harnblasenkarzinoms (Stadien Ta-T3b) in Bezug auf die Harnblasenwand (Reisende, 2005)

Des Weiteren wird mittels des TNM-Systems festgehalten, ob der Patient bereits regionale (N) oder Fernmetastasen (M) aufweist. Harnblasenkarzinome können lymphogen über die regionären Nodi lymphatici iliaci communes, externi und interni, sowie die Nodi lymphatici paravesicales metastasieren (Merkle and Diederichs, 1997). Hat der Tumor bereits weiter in die paraaortale, parakavale oder mediastinale Lymphknoten gestreut, zählt dies bereits zu den Fernmetastasen. Durch hämatogenes Metastasieren können Tochtergeschwülste in Lunge, Leber und Knochen entstehen. Der Tumor kann sich außerdem per continuitatem in die Prostata, den Uterus, die Vagina und das Peritoneum ausbreiten (Haag et al., 2009).

#### 1.1.4.2 WHO - Klassifikation

Eine weitere Einteilung der Tumore liegt der morphologischen Histologie der Tumorzellen zugrunde. Nach der WHO-Klassifikation (World Health Organisation) aus dem Jahre 2004 werden die Harnblasenkarzinome in drei Kategorien unterteilt: In die gut differenzierten Low Grade Tumore mit wenig zytologischer Atypie,

die High-Grade-Tumore, die durch hohe zytologische Atypie charakterisiert sind und in die nicht-malignen PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential). Die Low-Grade-Tumoren sind genetisch stabil, die High-Grade-Tumoren jedoch genetisch instabil und werden daher schneller invasiv (Schmelz, 2010, Amin et al., 2013). Mittels dieser Einteilung lässt sich die Aggressivität eines malignen Tumors beschreiben (Schwenzer and Ehrenfeld, 2010).

Viele Pathologen nutzen dennoch die lange Zeit verwendete Einteilung in die Differenzierungsgrade G1, G2 und G3 nach der WHO-Klassifikation von 1973 (Burger et al., 2008).

PUNLMP	Papilläre urotheliale Neoplasie von niedrig-malignem Potential
Low-Grade-Tumor	Gut differenzierte urotheliales Papillom, genetisch stabil
High-Grade-Tumor	Schlecht differenziertes urotheliales Papillom, genetisch instabil

Abbildung 4; Einteilung der Harnblasentumore nach der WHO-Klassifikation von 2004

### 1.1.5 Symptomatik

Das erste Frühsymptom eines Harnblasenkarzinoms stellt oft die schmerzlose Hämaturie ohne Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes dar (Gasser, 2011, Kaufman et al., 2009, Lokeshwar et al., 2005). Ob es sich um einen Tumor des Harntraktes handelt oder ob eine Entzündung oder dergleichen der Grund für die Hämaturie ist, wird dann mittels der verschiedenen diagnostischen Verfahren geprüft. Erst spät zeichnet sich der Tumor durch Harnabflussstörungen zugrundeliegenden Flankenschmerzen aus. Gewichtsreduktion und Anämien sind weitere Spätsymptome (Sökeland et al., 2008).

### 1.1.6 Diagnostik

Zur Diagnostik von Harnblasenkarzinomen können verschiedene Methoden angewendet werden. Das Abtasten von Bauch, Becken, Nieren und des inneren Genitalbereichs, sowie ein Urinstatus zum Nachweis einer Hämaturie sind dabei obligatorisch (DKG, 2013). Weitere Möglichkeiten bestehen in der Identifizierung von malignen Zellen mittels Urinzytologie oder anderen Urintests oder der Visualisierung des Tumors durch Zystoskopie und Gewebeentnahme (Scimedx, 2007).

#### 1.1.6.1 Bildgebende Verfahren

Bei allen Patienten mit Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom sollte eine Sonographie der gesamten Harnwege erfolgen (DKG, 2013, Lawrentschuk et al., 2013). Dieses Verfahren erlaubt die Visualisierung von möglichen intraluminalen Raumforderungen der Blase und den Ausschluss einer Hydronephrose (Babjuk et al., 2011, Scholz et al., 2010). Mittels intravenöser und retrograder Pyelographie lassen sich vor allem die ableitenden Harnwege gut darstellen. So kann das Vorhandensein von Füllungsdefekten im Sinne von Urothelkarzinomen im oberen Harntrakt oder der Blase gut beurteilt werden (Lodde et al., 2001, Babjuk et al., 2011). Mehr Informationen als die intravenöse Pyelographie gibt bei muskelinvasiven Tumoren die Computertomographie (CT) (Babjuk et al., 2011). Für die meisten Fragestellungen gilt sie im gesamten medizinischen Bereich als radiologisches Standardverfahren. Vorteile sind die hohe Bildqualität, sowie die dreidimensionale Darstellung. Dieses Verfahren geht allerdings auch mit einer relativ hohen Strahlenbelastung für den Patienten einher (Fuhrmann, 2013). Mit der Hilfe der Computertomographie lassen sich die exakte Ausdehnung, eine mögliche Organüberschreitung und die genaue Position eines Tumors bestimmen. Daher gilt es in der Krebsmedizin als eine der wichtigsten Untersuchungsmethoden (DKG, 2014). Im Vergleich zur Magnetresonanztomographie (MRT) weist die Computertomographie eine bessere räumliche Darstellung auf, das MRT zeigt jedoch höhere Weichteilkontraste. Ziel dieser beiden bildgebenden Verfahren ist

es, Tumore der Stadien  $\geq$  T3b zu identifizieren. Die Darstellung von mikroskopischen Invasionen wie bei Karzinomen des Stadiums T3a sind leider nicht möglich (Stenzl et al., 2009). Im Rahmen der Staging-Untersuchung der Patienten mit diagnostizierten muskelinvasiven Tumoren werden die Lunge, die Leber, sowie das Skelett zusätzlich mittels CT, MRT oder Skelettszintigraphie auf etwaige Fernmetastasen untersucht (DKG, 2013, Stenzl et al., 2009). Zur Diagnostik von Carcinoma in situ (Cis) eignen sich die bildgebenden Verfahren nicht (Babjuk et al., 2011).

#### 1.1.6.2 Nicht invasive Maßnahmen

Die hohe Rate an oberflächlichen Tumoren macht die Suche nach einem sensitiven Test zur Detektion derer so dringlich (Scimedx, 2007). Vor allem zum Auffinden der bei der Zystoskopie nur schlecht oder gar nicht sichtbaren Carcinoma in situ sind Zytologie und Harnmarkertests besonders vonnöten (Babjuk et al., 2011). Die Tests sollten Rezidive erkennen, bevor diese groß und zahlreich werden. Weiterhin sollten sie auch die Patienten identifizieren, die trotz unnormal erscheinenden Urotheliums keinen Blasentumor aufweisen. Ziel wäre es, die Anzahl der durchzuführenden Zystoskopien im Rahmen der Tumornachsorge zu reduzieren (Babjuk et al., 2011, Lokeshwar et al., 2005). So könnten ebenfalls die bei der Zystoskopie anfallenden hohen Kosten gesenkt werden (Goebell et al., 2008). Der ideale nicht-invasive Test müsste demnach sensitiv, spezifisch, schnell und technisch einfach sein (Lokeshwar and Soloway, 2001).

##### 1.1.6.2.1 Zytologie

Nach dem Beispiel der in Abstrichen der Gebärmutter Schleimhaut erkennbaren Uteruskarzinomzellen, entwickelten 1945 Papanicolaou et al. ein ähnliches Verfahren zur Darstellung von malignen urothelialen Zellen in Urinproben. Die Malignität dieser Zellen wurden von folgenden Kriterien bestimmt: Modifikationen und Abnormitäten des Nukleus wie Vergrößerung, Fragmentierung, Hyperchromatose oder granulär arrangiertes Chromatin, sowie Zytoplasmaveränderungen



wie Vakuolationen oder Leukozyteninfiltrationen, aber auch deutliche Abweichungen von der normalen Zellgröße und -form (Papanicolaou and Marshall, 1945).

Heute ist die Zytologie ein wichtiger, hoch spezifischer und nicht-invasiver Zusatz in der Diagnostik und Nachsorge von Patienten mit Urothelkarzinomen (Hall et al., 2007, Lokeshwar et al., 2005). In der Literatur erreichte dieser Urintest Werte von 81-97% für die Spezifität, aber nur Werte von 21-70,6% für die Sensitivität (Feil et al., 2003, Schroeder et al., 2004, Sullivan et al., 2009, Boman et al., 2002). Für High-Grad-Tumore zeigte er eine höhere Sensitivität als für Low-Grade-Tumore (Lokeshwar et al., 2005). Durch die zytologisch ähnliche Architektur zu gesunden Urothelzellen weist der Zytologie-Test erhebliche Schwächen in der Diagnostik der Low-Grade-Tumore auf (Fradet and Lockhard, 1997). Somit ist die Zytologie zwar hilfreich für das Auffinden von High-Grade-Tumoren und Carcinoma in situ, bei einem negativen Zytologie-Ergebnis kann das Vorhandensein eines Low-Grade-Tumors jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Babjuk et al., 2011, Gamarra and Zein, 1984). Eine zusätzliche Limitation des Tests stellt dessen subjektive Natur dar, denn der Test ist stark von dem Erfahrungswert und der Fähigkeit des ausführenden Zytopathologen abhängig (Soyuer et al., 2009, Hautmann et al., 2004). Dennoch ist die Zytologie die am weitesten verbreitete nicht-invasive Diagnostikmethode und wird üblicherweise bei Patienten mit Hämaturie durchgeführt (Scimedx, 2007, Lokeshwar and Soloway, 2001).

#### 1.1.6.2.2 Harnmarkertests

##### uCyt+-Test

Der uCyt+-Test des Herstellers SCIMEDX Corporation (Denville, USA) ist ein uringebundener nicht-invasiver und hoch sensitiver Harnmarkertest für die Diagnostik von Urothelkarzinomen aller Tumorstadien und -grade (Mian et al., 1999). Die neoplastische Transformation des Urothels, die bei Blasenkarzinomen auftritt, ist verbunden mit der Expression von tumorassozierten Antigenen (Sagerman et al., 1993). Der uCyt+-Test basiert auf einer Kombination aus drei monoklonalen Antikörpern 19A211, M344 und LDQ10, welche mit fluoreszierenden Markern versehen sind und an zwei dieser tumorassozierten Antigene auf

der Urothelzellmembran binden. Diese Marker machen die Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (van Rhijn et al., 2005).

Vor allem in Kombination mit der konventionellen Urinzytologie wurden in verschiedenen Studien verbesserte Ergebnisse für die Früherkennung von Rezidiven gefunden (Scimedx, 2007, Lokeshwar and Soloway, 2001, Toma et al., 2004). Im Vergleich zur alleinigen Anwendung der Zytologie erreicht man bei Kombination der beiden Tests eine gesteigerte Sensitivität von 83,3-89,1% (Tetu et al., 2005, Hautmann et al., 2004, Soyuer et al., 2009, Toma et al., 2004). Aber vor allem für das Auffinden der Low-Grade-Tumoren ist die gesteigerte Sensitivität im Vergleich zur alleinigen Anwendung der Zytologie von Bedeutung (79%-86,6%) (Tetu et al., 2005, Lodde et al., 2003, Mian et al., 2005, Lodde et al., 2006). Auch in Kombination mit der Zystoskopie kann der uCyt+-Test laut einer Studie von Schmitz-Dräger et al. eine wichtige Rolle spielen. So können Harnblasentumore bei Patienten mit negativem uCyt+-Test und gleichzeitig negativer Zystoskopie mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (NPV = 100%) (Schmitz-Dräger et al., 2008).

Im Rahmen dieser Studie wurden die Untersuchungen der Urinproben mittels des uCyt+-Tests des Herstellers SCIMEDX Corporation (Denville, USA) durchgeführt.

Die genaue Durchführung des uCyt+-Tests wird unter 2.7 weiter erläutert.

### NMP22(BC)-Test

Auf dem Markt gibt es noch zahlreiche Urinmarkertests. Einer davon ist der NMP22-Test, der in zwei Versionen verfügbar ist. Der NMP22-Test der Firma Matritech (Maritech GmbH Freiburg) wendet das ELISA-System an. Dieses wird in Laboratorien durchgeführt und nimmt relativ viel Zeit in Anspruch. Die Kurzversion, der NMP22-BladderCheck-Test hingegen kann direkt nach der Uringewinnung durchgeführt werden (Choi et al., 2010). Dabei handelt es sich um eine immunologische Untersuchung, um das Vorhandensein des Nukleären Matrix-Proteins 22 (NMP22) im Harn zu überprüfen. Diese Proteine spielen eine Rolle bei der Mitose von Zellen. Da ein Tumor eine höhere Teilungsrate aufweist als normales Urothel sind sie bei Patienten mit Harnblasenkarzinom im Vergleich zu

gesunden Patienten vermehrt im Urin zu finden (Önal et al., 2015, DelNero et al., 1999).

### UroVysion-Test

Ein anderer Urinmarkertest ist der UroVysion® Test (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A.). Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist er in der Lage, die bei Harnblasenkarzinomen am häufigsten auftretenden Chromosomenaberrationen wie Aneuploidien der Chromosomen 3, 7, und 17 oder den Verlust des 9p21 Locus im Urin zu identifizieren. Er wird nur in Kombination mit anderen diagnostischen Standardmitteln bei Patienten mit Hämaturie und zur Nachsorge verwendet (Mbeutcha et al., 2016, Mitra et al., 2012).

#### 1.1.6.3 Invasive Maßnahmen

Eine Zystoskopie und ein histologisches Gutachten der entnommenen Biopsie gelten als Standardmethode für die Diagnostik von Harnblasenkarzinomen (Lokeshwar et al., 2005, Lodde et al., 2003). Zwar sind nicht-invasive Tests Gegenstand zahlreicher Forschung und Studien, dennoch wurde bis heute trotz Verbesserungen der Sensitivität noch keine der Verfahren als Standard-Diagnostikmethode akzeptiert (Babjuk et al., 2011).

Die Zystoskopie stellt die effizienteste, aber auch teure Methode dar, um primäre Urothelkarzinome oder Tumorrezidive der Harnblase zu diagnostizieren (Kamat et al., 2013, Goebell et al., 2008). Allerdings ist sie invasiv und für den Patienten unkomfortabel (Mian et al., 1999). Dennoch wird bei allen Patienten mit Mikrohä-maturie, die älter als 40 Jahre sind, aber auch bei den Jüngeren mit erhöhtem Blasentumorrisiko, diese Untersuchung empfohlen (Grossfeld et al., 2001).

Man unterscheidet die flexible von der starren Zystoskopie. Durch das Objektiv mit Okular und Lichtquelle vorne am Zystoskop ist es dem Urologen möglich, die innere Blasenwand genau zu beurteilen und sie auf Schleimhautveränderungen, Blutungsquellen oder papilläre Raumforderungen zu untersuchen (DKG, 2013). Die Ergebnisse wie die Größe, die Lage, die Anzahl und das Erscheinungsbild, sowie eine Beschreibung vorhandener Schleimhautanomalitäten müssen sorgfältig dokumentiert werden (Babjuk et al., 2011). Gleichzeitig werden von den

verdächtigen Schleimhautstellen durch transurethrale Resektion (TUR-B) Gewebeprobe gewonnen. Bei kleinen Tumoren ist es möglich, dass die veränderte Schleimhautstelle gleich in diesem Schritt vollständig entfernt wird. Daher gilt die TUR-B als Goldstandard bei der initialen Behandlung von Blasentumoren (Hamasaki et al., 2010). Während kleinere Tumore bis zu einer Größe von <1 cm ‚en bloc‘ entnommen werden können, ist es bei größeren Tumoren üblich, erst den exophytischen Teil, dann die unterliegende Blasenwand und die Ränder der Resektionsfläche in Fraktionen zu präparieren (Babjuk et al., 2011). Für die endgültige Diagnosestellung ist jedoch eine histopathologische Untersuchung der im Rahmen der Zystoskopie transurethral resezierten Gewebeproben obligatorisch (Lokeshwar et al., 2005). Besonders die Ränder der Proben, die die chirurgische Begrenzung der Harnblase markieren, sind wichtig (Lopez-Beltran et al., 2004). Denn der Pathologe muss während seinen Untersuchungen genau das Vorhandensein der „muscularis propria“ überprüfen und dem Urologen ein Feedback über den Erfolg der Resektion geben (Jimenez et al., 2000). Findet er einen Verdacht darauf, dass der Tumor möglicherweise nicht vollständig entfernt wurde, sollte etwa 2-6 Wochen nach der ersten transurethralen Resektion (TUR-B) eine zweite Resektion erfolgen, um einen bestehenden Residualtumor und ein folgendes Tumorrezidiv zu vermeiden (Babjuk et al., 2011).

Es besteht zudem die Möglichkeit, durch intravesikale Instillation von Aminolävulinäure (5-ALA) oder Hexaminolävulinat (HAL) und anschließender Fluoreszenzzystoskopie mit violettem Licht die Tumorregionen besser sichtbar zu machen (Babjuk et al., 2008). Denzinger et al. fanden 2007 nach TUR-B mit normalem weißem Licht in 25,2% der Patientenfälle einen Resttumor. Wurde die TUR-B mittels Fluoreszenzzystoskopie durchgeführt, lagen nur in 4,5% der Fälle Resttumore vor (Denzinger et al., 2007). Vor allem für die bei normaler Zystoskopie kaum sichtbaren Carcinoma in situ oder kleinen papillären Low-Grade-Tumoren ist diese Methode sinnvoll (Stenzl and Kruck, 2009, Kamat et al., 2013). Zudem konnten geringere Rezidivraten beobachtet werden. Dieses Prinzip der photodynamischen Diagnostik (PDD) ist zwar mit initial erhöhten Kosten verbunden, längerfristig lassen sich mit dieser Methode jedoch Kosten sparen (Stenzl and

Kruck, 2009). Durch verschiedene Einflussparameter, wie durch eine erst kürzlich durchgeführte TUR-B oder durch eine BCG-Instillation in den vorausgegangenen 3 Monaten, kann es zu falsch-positiv leuchtenden Stellen kommen. Daher ist diese Methode vorerst auf Patienten mit Verdacht auf ein Cis beschränkt (Babjuk et al., 2011).

### **1.1.7 Therapie**

Neben den mittels der TNM- und der WHO-Klassifikation festgehaltenen Tumorcharakteristika (Invasionstiefe, Differenzierungsgrad und das Vorhandensein von Metastasen) sind weitere Eigenschaften wie das Alter der Patienten, deren Allgemeinzustand und die familiäre Situation bei der Entscheidung für eine Therapieform zu berücksichtigen (Gasser, 2011, Savic et al., 2009).

#### **1.1.7.1 Nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome**

Bei etwa 75% der Erstdiagnosen handelt es sich um oberflächliche Harnblasenkarzinome, bei denen eine kurative Therapie das Ziel ist. Diese können, wie bereits unter 1.1.6.3 erläutert, im Rahmen der TUR-B bereits vollständig entfernt werden. Ist dies nicht der Fall und es wurden von Pathologen nicht überall im Gesunden liegende Resektionsgrenzen oder keine Muskulatur im Präparat erkannt, sollte nach 2-6 Wochen eine Nachresektion stattfinden (Babjuk et al., 2011). Da jedoch die hohe Rezidivrate bei oberflächlichen Tumoren bekannt ist (Ta-Tumore zeigen zu etwa 70% Rezidive auf (Zellweger et al., 2006)), können zusätzliche Behandlungsmethoden wie die intravesikale Chemotherapie oder die Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie angewendet werden. Diese verringern nachweislich die Rezidivrate (Kiemeneij et al., 1993).

Welche Therapie empfohlen wird, hängt entscheidend von dem Risiko des jeweiligen Patienten ab, an einem Rezidiv oder einer Progression zu erkranken. Dieses Risiko kann mithilfe der EORTC-Risikotafel (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) mittels eines Punkte-Scores unter Berücksichtigung der Einflussparameter „Tumoranzahl“, „Tumorgröße“, „frühere Rezidivrate“, „Tumorgrad“, „Tumorstadium“ und „Vorliegen eines Carcinoma in situ (Cis)“

errechnet werden (Sylvester et al., 2006). Danach werden die Patienten in unterschiedliche Risikogruppen (geringes/mittleres/hohes Risiko) eingeteilt.

### Intravesikale Chemotherapie

Die intravesikale Chemotherapie wird bei nicht muskelinvasiven Blasenkarzinomen der Tumorstadien Ta und T1 zusätzlich zur TUR-B angewendet, da diese häufig Rezidive und in einigen Fällen auch Progressionen aufweisen (Pashos et al., 2002). Mit ihr ist es möglich diese Krankheit mit relativ nicht-invasiven Methoden zu kontrollieren (Sagerman et al., 1993). Die Blase wird hierbei über einen Katheter mit Medikamenten gespült. Hierzu eignen sich Zytostatika wie Mitomycin, Epirubicin und Doxorubicin.

Bei Patienten mit niedrigem Risiko für Tumorrezidive und Tumorprogression wird eine einmalige Zytostatika-Instillation direkt nach der TUR-B (innerhalb von 24 Stunden) empfohlen (Babjuk et al., 2011). Laut einer Studie von El-Ghobashy et al. verringerte die Frühinstillation von Mitomycin C das Auftreten von Frührezidiven (innerhalb der ersten beiden Jahren nach TUR-B) signifikant (von 34.3% auf 16.1%). Es wird vermutet, dass durch die Medikamente die noch in der Blase zirkulierenden Tumorzellen ebenso wie die Zellen möglicher Residualtumore zerstört werden und somit die Implantation der kranken Zellen in die Resektionsgrenzen verhindert wird (El-Ghobashy et al., 2007, Sylvester and Oosterlinck, 2009). Ein weiterer Vorteil der Frühinstillation ist in den geringen Kosten und den schwachen lokalen und systemischen Nebenwirkungen zu sehen. Voraussetzung für die Instillationsbehandlung ist jedoch ein unverletztes Peritoneum. Liegt ein Verdacht auf eine intra- oder extraperitoneale Perforation vor, muss die Instillation unterlassen bleiben (Babjuk et al., 2011).

Eine adjuvante Instillationstherapie bei Patienten mit mittlerem oder hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko wird als sinnvoll erachtet, die Dauer und Frequenz dieser Behandlung sind derzeit jedoch noch umstritten (Babjuk et al., 2011).

### Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie

Bei der Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie (BCG) werden Bacillus Calmette-Guérin in die Blase instilliert, wodurch das Rezidiv- und das Progressionsrisiko gesenkt werden sollen. BCG induziert die Infiltration von Immun- und Entzündungszellen in die Lamina propria und löst dort eine Immunreaktion durch Aktivierung verschiedener Immunzellen aus (Lamm and Torti, 1996). Aufgrund der Gefahr der Toxizität und den damit verbundenen Nebenwirkungen soll sie nicht bei allen Patienten mit nicht-invasiven Tumoren angewendet werden (Babjuk et al., 2008). Bei Patienten mit geringem Progressions- und Rezidivrisiko ist diese Behandlung beispielsweise nicht indiziert, da der Behandlungsvorteil die potentielle Gefahr der BCG-Therapie nicht überwiegt (Oosterlinck et al., 2002). Bei Patienten mit mittlerem Progressions- und Rezidivrisiko sind eine intravesikale Chemotherapie oder eine BCG-Therapie möglich. Patienten mit hohem Progressions- und Rezidivrisiko profitieren von der BCG-Immuntherapie, weshalb sie in diesen Fällen bevorzugt wird (Böhle and Bock, 2004, Brausi et al., 2011). Auch bei Patienten mit Carcinoma in situ ist die BCG-Immuntherapie als Mittel der Wahl anerkannt (Lamm and Torti, 1996, Sylvester, 2006). Was das beste Anwendungsregime für die BCG-Behandlung darstellt ist noch nicht ganz geklärt. Üblicherweise wird jedoch mit einer Induktionstherapie mit 6-wöchigem Abstand der Instillationen begonnen, auf welche eine Erhaltungstherapie folgt. Diese sollte, um einen Erfolg zu erzielen, über mindestens ein Jahr fortgeführt werden (Scholz et al., 2010).

#### 1.1.7.2 Muskelinvasive Harnblasenkarzinome

##### Radikale Zystektomie

Sobald ein Tumor in die Muskelschicht eingedrungen ist, zählt er zu den invasiven Tumoren ( $\geq T2$ ). Die am häufigsten angewandte Therapie zur Behandlung invasiver Tumore ist die radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie (Pashos et al., 2002). Dabei werden die Blase, die Lymphknoten der Fossa obturatoria und ein Teil des umliegenden Gewebes entfernt. Bei Männern umfasst dies die Prostata und die Samenblase, während bei Frauen der Uterus und die Adnexe mitentfernt werden (Stenzl et al., 2005). Die radikale Zystektomie

wird nicht nur bei invasiven Tumoren, sondern auch bei Patienten mit oberflächlichen High-Grade-Tumoren durchgeführt, wenn diese für eine intravesikale Therapie unempfindlich sind. Ziel ist es, Metastasen, die letztendlich zum Tod führen könnten, zu verhindern (Pashos et al., 2002). Nach der Zystektomie bestehen verschiedene Möglichkeiten, um den Harn abzuleiten: beispielsweise ein inkontinentes Ileum-Conduit, bei dem äußerlich ein Harn-Auffangbeutel angeklebt wird oder verschiedene Formen kontinenter Harnableitungen wie z.B. eine kontinente Neoblase aus Dünndarm (Oosterlinck et al., 2002).

### Blasenerhaltenden Maßnahmen

Um die Lebensqualität durch Ableitung der Harnwege weniger einzuschränken, ist das Interesse an blasenschonenden Behandlungen vor allem bei jüngeren Patienten gestiegen (Oosterlinck et al., 2002). Da jedoch die verbleibende Blase ein erhöhtes Rezidivrisiko birgt, sollte die Methode der vollständige transurethrale Resektion mit anschließender Radio-/Chemotherapie nur bei gut informierten Patienten mit einer guten Compliance angewendet werden (Stenzl et al., 2009). Auch bei Patienten, bei denen aus allgemeinen gesundheitlichen Gründen die Zystektomie ausgeschlossen ist, kann in Einzelfällen eine blasenschonende Behandlung erfolgen (Witjes et al., 2014).

### Behandlung von metastasierenden Tumoren:

Im Falle eines metastasierenden Harnblasenkarzinoms handelt es sich meist um einen chemosensitiven Tumor. Das effektivste Zytostatikum zur chemotherapeutischen Behandlung dieser Tumoren stellt Cisplatin dar (Stenzl et al., 2011). Das früher verbreitete M-VAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) wurde nun durch die weniger toxische Gemcitabin-Cisplatin-Kombination abgelöst (Gasser, 2015).



### 1.1.7.3 Follow-up

Die hohe Rezidivrate der Harnblasenkarzinome macht eine lebenslange Nachsorge notwendig (Kamat et al., 2013). Eine regelmäßige Zystoskopie ermöglicht das Auffinden von Rezidivtumoren in einem frühen Stadium, womit die Rezidivrate gesenkt und eine mögliche muskuläre Invasion reduziert werden kann (Lokeshwar et al., 2005). Außerdem ist ein frühes Auffinden der High-Grade- und invasiven Tumorrezidiven wichtig, da eine zu späte Therapie lebensbedrohlich sein kann (Babjuk et al., 2011). Klassischerweise erfolgt nach initialer TUR-B folgendes Follow-up-Programm: Zystoskopie und Zytologie alle 3 Monate für 18-24 Monate nach Tumorsektion, dann alle 6 Monate für die darauffolgenden 2-3 Jahren, danach jährlich. (Comploj et al., 2013, Zellweger et al., 2006).

### **1.1.8 Klinisches Verhalten und Prognose**

Das Harnblasenkarzinom ist von der Diagnose bis zum Tod der kostenintensivste maligne Tumor, da er, bedingt durch seine hohe Rezidivrate, ein teilweise lebenslang notwendiges Nachsorgeverfahren erfordert (Botteman et al., 2003, Kamat et al., 2013).

Bei etwa 75% der Patienten findet man bei der Erstdiagnose oberflächliche Tumore der Stadien Ta oder T1, die exophytisch, papillomatös und oft multizentrisch wachsen (Hautmann, 2010, Gasser, 2011). Diese metastasieren oder infiltrieren zwar selten und haben generell eine gute Prognose. Sie weisen jedoch aufgrund der häufig multifokalen Natur trotz initial erfolgreicher Therapie eine sehr hohe Rezidivrate auf (Fradet et al., 1987, Cordon-Cardo et al., 1992). In einer Studie von Kiemeney et al. wiesen innerhalb der ersten 5 Jahre etwa 60% mindestens ein Rezidiv auf. Die 5-Jahres Überlebensrate lag bei 75% (Kiemeney et al., 1993). Etwa 10-20% der Rezidive schritten jedoch zu einer aggressiveren und muskelfiltrierenden Form fort (Bergeron et al., 1996b). Lee und Droller fanden im Jahre 2000 bei 15% der oberflächlichen Tumore eine Neigung zum invasiven Fortschreiten (Lee and Droller, 2000).

Die Prognose der Patienten mit nicht-invasiven Harnblasenkarzinom ist von mehreren Faktoren wie dem histologischen Tumorgrad, dem Tumorstadium und seiner Ausdehnung abhängig (Kiemeneij et al., 1993). Zudem soll das Vorhandensein von multiplen Tumoren zu einer schlechteren Prognose führen (Millan-Rodriguez et al., 2000). 2006 entwickelten Sylvester et al. wie bereits unter 1.1.7.1 erwähnt die sogenannten EORTC-Risikotafeln (European Organisation for Research and Treatment of Cancer). Sie sollen es Urologen erlauben, mittels bestimmter im klinischen Alltag nach TUR-B routinemäßig erfasster Daten, Rückschlüsse auf das individuelle Risiko von Rezidiven oder Tumorprogression der Patienten zu schließen. Unter Berücksichtigung der sechs Einflussparameter „Tumoranzahl“, „Tumorgröße“, „frühere Rezidivrate“, „Tumorgrad“, „Tumorstadium“ und „Vorliegen eines Carcinoma in situ (Cis)“ wird mittels eines Punktescores das Rezidiv- und Progressionsrisiko errechnet (Sylvester et al., 2006). Dabei stellen die drei erstgenannten die wichtigsten prognostischen Faktoren für das Rezidivrisiko und die zuletzt genannten die wichtigsten Faktoren für das Progressionsrisiko dar (Sylvester, 2006).

Bei den muskelinvasiven Tumoren sind die im TNM-System festgehaltenen Tumoreigenschaften (Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus und Metastasen) die bedeutendsten prognostischen Faktoren (Thieblemont et al., 1996). Sie weisen eine deutlich schlechtere Prognose und eine höhere Mortalitätsrate auf, als oberflächliche Tumoren. In einer Studie von Jeong et al. lagen die 1-, 2- und 5-Jahres-Überlebensraten in einem Patientenkollektiv mit durchgeführter radikaler Zystektomie und beidseitiger Lymphadenektomie, sowie histologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen bei lediglich 79,0%, 57,3% und 38,5% (Jeong et al., 2011). In einer Studie von Lee und Droller entwickelten von den Patienten mit als invasiv diagnostizierten Tumoren mehr als die Hälfte Metastasen und führten somit mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Tod (Lee and Droller, 2000). Tumoren des Stadiums T2b weisen deutlich häufiger okkulte Lymphknoten- oder Fernmetastasen auf, als pT2a Tumore, die nur die oberflächliche Muskelschicht infiltrierten und zeigen daher einen schwereren Krankheitsverlauf (Herr, 2010).

Die meisten Todesfälle durch Harnblasenkarzinome sind den High-Grade-Tumoren und den Tumoren mit fortgeschrittenem Tumorstadium zuzuschreiben. Dies liegt unter anderem daran, dass Low-Grade-Tumore selten in muskelinfiltrierende Tumore fortschreiten, sondern meist auf die Mukosa beschränkt bleiben, während den High-Grade-Tumoren ein hohes Rezidiv- und Progressionsrisiko von > 50% und 15-40% nachgewiesen (Amin et al., 2013, Lodde et al., 2003).

## 1.2 Fragestellung

Bisher gelten die Zystoskopie zusammen mit einer histologischen Untersuchung des entnommenen Präparates der verdächtigen Schleimhautstellen immer noch als Goldstandard zur Diagnose von Urothelzellkarzinomen der Harnblase (Lokeshwar et al., 2005). Da diese Methode invasiv, unkomfortabel und teuer ist und zudem mehrfach im Jahr durchgeführt werden muss, beeinflusst das Follow-up die Lebensqualität der Patienten entscheidend (Hautmann et al., 2004).

Aus diesem Grund werden in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms zunehmend molekulare Untersuchungen des Urins herangezogen. Einer der verwendeten Testsysteme ist der uCyt+-Test, der als immunzytologischer Test die Oberflächeneigenschaften von Tumorzellen auf einem Sedimentpräparat des Urins mikroskopisch detektiert.

Dieser Test und seine diagnostische Wertigkeit, genauso wie Einflussfaktoren auf das Testergebnis sind bisher wenig untersucht.

Insbesondere die Interpretation des Testergebnisses im Sinne von positiven Zellen wird bisher lediglich als „alles-oder-nichts“ Ereignis gewertet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die mikroskopischen Resultate des angewandten Tests mittels unterschiedlicher Auswertestrategien zu evaluieren und die klinische Aussagekraft der verschiedenen Algorithmen zu vergleichen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethische Belange**

Vor Beginn der Studie wurde der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Tübingen eine Anfrage mit der Bitte um Erlaubnis zur Durchführung dieser wissenschaftlichen Evolution vorgelegt. Nach einer Beratung und Überprüfung erfolgte die Genehmigung, um mit den bereits vorhandenen und routinemäßig in den Patientenakten erfassten Daten diese retrospektive Studie durchzuführen. Somit lag das Ethikvotum mit der Projektnummer 504/2014R vor. Eine informierte Einverständniserklärung der im relevanten Zeitraum untersuchten Patienten war nicht erforderlich, da es sich um eine rein retrospektive Untersuchung ausschließlich routinemäßig erhobener Parameter handelte.

### **2.2 Datenschutz**

Die routinemäßig erfassten Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden vertraulich behandelt. Es wurde ausschließlich an Computern gearbeitet, die sich in den Laborräumen der Klinik für Urologie in Tübingen befanden. Diese waren jederzeit vom klinischen internen Netz abgekoppelt. Nur autorisierte Mitarbeiter, die Befugnis hatten und direkt an der Datenzusammenstellung beteiligt waren, hatten Zugriff auf diese Rechner und zu der verwendeten Aktensammlung. Die Verpflichtung zur ärztlichen Amtsverschwiegenheit und zur Wahrung des Datengeheimnisses nach § 6 des Landesdatenschutzgesetzes (LD SG) wurde stets eingehalten. Die verwendeten Daten wurden nicht an Dritte weitergegeben und nur zu dem angegebenen Zweck verwendet. Nach Abschluss der Datenerhebung wurden alle Daten terminal anonymisiert, sodass eine Rückführung der Studienergebnisse auf individuelle Patienten ausgeschlossen ist.

## **2.3 Studienkollektiv**

Das primäre Kollektiv wurde als konsekutives Kollektiv aus Patienten zusammengestellt, die während des Zeitraums vom 02.11.2006 bis zum 27.11.2009 in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen mit dem Vorliegen einer Hämaturie einer Harnblasenkarzinom-Diagnostik zugeführt wurden.

### **2.3.1 Einschlusskriterien**

Einschlusskriterien waren eine Urinuntersuchung mittels des uCyt+-Tests mit anschließend erfolgter Zystoskopie mit eindeutigen Ergebnis und das Vorhandensein eines präzisen histologischen Gutachtens im Falle einer Gewebsentnahme. Darüber hinaus wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die vor dem angegebenen Zeitraum noch nie an einem Blasentumor erkrankt waren. Nach diesen Einschränkungen konnte zunächst ein vorläufiges Patientenkollektiv von 460 Patienten gewonnen werden, das durch folgende Ausschlusskriterien zusätzlich definiert wurde.

### **2.3.2 Ausschlusskriterien**

Von dem oben erwähnten Untersuchungskollektiv von 460 Patienten mussten 10 Patienten von den Auswertungen ausgeschlossen werden, da in diesen Fällen keine ausreichende Zellanzahl auf den zu untersuchenden Sedimentpräparaten gegeben war. Diese Ergebnisse wurden als nicht auswertbar dokumentiert.

Da in der vorliegenden Studie das Hauptaugenmerk auf der Evaluation von Urin aus der Harnblase lag, konnten weitere 6 Patienten nicht in das Kollektiv aufgenommen werden, bei denen der untersuchte Urin aus den Nierenbecken entnommen wurde. Zusätzlich wurde mittels der Bildgebung des oberen Harntraktes (OHT) das Vorhandensein eines Tumors im OHT ausgeschlossen.

Letztlich verbliebenen als definitives Studienkollektiv für den oben genannten 3-Jahres-Zeitraum 444 Patienten.

## 2.4 Retrospektive Erfassung der Patientendaten

Für die wissenschaftliche Erstellung dieser Datensammlung wurden die im Zentralregister vorliegenden Untersuchungsakten der in das Kollektiv aufgenommenen Patienten eingesehen. Die klinischen Daten wurden aus den elektronisch verfügbaren Arztbriefen und Operationsberichten, den Laborbefunden sowie aus den konventionell vorliegenden Testergebnissen des uCyt+-Harnmarkertests gesammelt und in der Datenbank zusammengetragen.

### 2.4.1 Erstellung der Datenbank

Die vorliegenden Parameter der in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden auf Vollständigkeit geprüft. Für jeden in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden folgende Parameter in der Datenbank erfasst: Vor- und Zuname, Geschlecht, Geburtsdatum, das Datum und die Art der Urinentnahme sowie das daraus errechnete Alter zum Zeitpunkt der Urinentnahme. Ebenso waren die Ergebnisse der histologischen Untersuchung, des Urinstatus und des uCyt+-Tests, genauso wie die der Zystoskopie festgehalten. Die untersuchten Parameter wurden auf Vollständigkeit überprüft.

Zur Vervollständigung der Datenbank wurden für jeden Patienten die im Zentralregister dokumentierten Ergebnisse der Bildgebungsverfahren des oberen Harntraktes mit zugehörigem Datum eingetragen. Hierbei wurden nur Untersuchungen berücksichtigt, die unmittelbar mit der aktuellen medizinischen Fragestellung in Zusammenhang standen.

Des Weiteren wurde die genaue Numerik des uCyt+-Ergebnisses in sechs Spalten festgehalten. Zwei Spalten enthielten die numerische Anzahl der im Epifluoreszenz- und Lichtmikroskop als definitiv rot- oder grün-positiv erkennbaren Zellen. Das Vorhandensein jeder dieser Zellen führte zu einem positiven Testergebnis.

In zwei weiteren Spalten wurden die als rote und grüne Borderline-Zellen definierten Zellen ebenfalls numerisch erfasst (siehe 2.8). Waren solche Zellen in einem Präparat sichtbar, wurde das Testergebnis als verdächtig dokumentiert.

Für die Auswertungen innerhalb dieser Studie wurden die verdächtigen Ergebnisse ebenfalls als positiv gewertet.

Weitere zwei Spalten wurden aus der Anzahl an Zellen gebildet, die als unterschwellig definiert wurden (siehe 2.8) und zu einem unauffälligen, negativen Befund führten.

Zur Überprüfung des möglichen Einflusses einer benignen Prostatahyperplasie oder eines Prostatakarzinoms, eines Harnwegsinfektes (HWI) oder der mechanischen Manipulation bei der Uringewinnung wurden diese Parameter ebenfalls in einer Spalte notiert und kodiert. Ebenso wurden die Rauchgewohnheiten dokumentiert.

## **2.5 Uringewinnung**

### **2.5.1 Uringewinnung aus dem unteren Harntrakt**

Zur Uringewinnung aus dem unteren Harntrakt wurden unterschiedliche Techniken angewandt.

Zum einen wurde Spontanurin durch das Auffangen der Miktion gewonnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht zwischen Erst- und Mittelstrahlurin unterschieden. Bei der Gewinnung von Mittelstrahlurin wurde der erste Strahl nicht benutzt, da dieser zur Spülung der Harnröhre diente. Der mittlere Strahl wurde dann in einem sterilen Gefäß aufgefangen, während der letzte ebenfalls verworfen wurde. Da die Urinentnahmen im Rahmen von Ambulanzbesuchen durchgeführt wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um den ersten Morgenurin handelte.

Zum anderen bestand die Möglichkeit, den direkt aus der Harnblase stammenden Urin aus einem über die Urethra gelegten Katheter zu verwenden. Hierbei wurde nicht zwischen mittels Dauer- oder Einmalkatheter gewonnenem Katheterurin differenziert.

Zur Gewinnung von Spülurin wurde über einen Katheter isotone Kochsalzlösung in die Harnblase eingeführt. Die dadurch entstandene Flüssigkeit, auch Spülurin bezeichnet, wurde für die Harnuntersuchungen verwendet.

Unter Exprimaturin versteht man den nach einer massierenden Prostatapunktion per Miktion gewonnenen Urin. Hierdurch wird das Prostatasekret mit der Miktion ausgewaschen und ist in einer gewissen Konzentration im Urin enthalten.

### **2.5.2 Definition der mechanischen Manipulation**

Wie in anderen an derselben Klinik durchgeführten Studien wurde nur der spontan durch Miktion erlangte Urin (Spontanurin und Mittelstrahlurin) als nicht-invasiv gewonnen und somit als „ohne mechanische Manipulation gewonnen“ definiert. Als invasive und manipulierende Methoden wurden der Katheterurin, der Exprimaturin sowie der Spülurin der Blase gewertet (Todenhofer et al., 2012).

## **2.6 Urinstatus**

Der Urinstatus ist eine routinemäßig durchgeführte Untersuchung des Harns bei Patienten mit Nieren- oder Harnwegserkrankungen. Hierbei können mittels biochemischer Urinuntersuchung verschiedene Parameter wie der pH-Wert, die spezifische Dichte, Proteine, Glucose, Keton, Urobilinogen, Leukozyten, Bilirubin, Nitrit und Blut im Urin bestimmt werden. Durchgeführt wird die Urinuntersuchung mit dem Miditron M Urinanalysegeräte des Herstellers Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dafür werden spezielle Combur<sup>10</sup> Test<sup>®</sup> M Teststreifen verwendet, die kurz in den Urin getaucht werden. Der überschüssige Urin wird durch ein Abstreifen am Gefäßrand entfernt. Anschließend werden die Teststreifen in das oben genannte Analysegerät eingelegt und reflexionsphotometrisch gemessen. Zusätzlich können die Streifen nach etwa 60 Sekunden visuell ausgewertet werden, indem die Farben der Teststreifen mit den auf der Teststreifenröhre abgebildeten Farben verglichen werden. Die ermittelten Werte entsprechen dabei jeweils bestimmten Konzentrationsbereichen, die dokumentiert wurden.



Weiterhin können die durch Zentrifugation erhaltene Harnsedimente durch Urinmikroskopie dargestellt werden und somit die Anzahl an Erythrozyten und Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  bestimmt werden. Auf diese Weise können bestehende Harnwegsinfekte detektiert, sowie das Vorliegen einer Hämaturie dargestellt werden.

### **2.6.1 Definition von Harnwegsinfekten und Hämaturie**

Das Vorhandensein eines Harnwegsinfekts wurde wie in früheren an derselben Institution durchgeführten Studien definiert: Es mussten mindestens 100 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  bei gleichzeitiger Präsenz von mindestens einem Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  (Todenhofer et al., 2012) vorliegen oder mindestens 100 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  und gleichzeitig ein positiver Nitritnachweis belegt sein (Todenhöfer et al., 2013a, Todenhöfer et al., 2012).

Zum Nachweis einer Hämaturie wurden ebenfalls der Urinstatus und die mikroskopische Analyse in Betracht gezogen. Konnte kein Hinweis auf Erythrozyten im Harn festgestellt werden war das Ergebnis negativ. Jeglicher Nachweis von Erythrozyten in einer Urinprobe führte dagegen zu einer positiven Interpretation. Wies der Urin durch das sich darin befindende Blut eine mit bloßem Auge sichtbare Rotfärbung auf, wurde eine Makrohämaturie dokumentiert. Andernfalls wurde eine Mikrohämaturie vermerkt.

## **2.7 Durchführung des uCyt+-Tests**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Urinproben-Untersuchungen mittels des uCyt+-Tests des Herstellers SCIMEDX Corporation (Denville, USA) durchgeführt.

Bei dem Testsystem handelt es sich um eine nicht-invasive Methode mit dem Ziel abgeschilferte Tumorzellen auf einem Sedimentpräparat des Urins anhand ihrer Oberflächeneigenschaften mithilfe der Immunzytologie festzustellen.

### 2.7.1 Beschreibung der Testbestandteile

Das vom Hersteller gelieferte Testkit enthält folgende Bestandteile:

1. Blockierungslösung
2. Antikörper-Cocktail
3. Positive und negative Kontrollen
4. Fixierungslösung
5. Genaue Gebrauchsanweisung mit Sicherheitsvorschrift

#### 1. Blockierungslösung:

Die gebrauchsfertige Blockierungslösung soll unspezifische Bindungsstellen sättigen, bevor die färbende Lösung zugegeben wird. Sie enthält gepuffertes und verdünntes 5%iges Ziegenserum mit 0,1% Proclin<sup>®</sup>300 und reicht laut Hersteller für etwa 50 Immunreaktionen (10 ml pro Tropfflasche und etwa 45µL pro Tropfen) (SCIMEDX, 2015).

#### 2. Antikörper-Cocktail:

Auch diese Mixtur ist schon verwendungsbereit in den Testkits enthalten und setzt sich aus den folgenden Antikörpern zusammen:

- Die Antikörper M344 und LDQ10 sind gegen Mucin-Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht (300kDa) gerichtet. Diese werden, wie in verschiedenen Studien bewiesen wurde, von den meisten Urothelkarzinomzellen exprimiert, äußern sich aber nicht auf normalen Übergangsepithelzellen (Fradet et al., 1987, Bergeron et al., 1996a). Das liegt daran, dass diese Schleimstoffe in den Tumorzellen weniger stark glykosyliert sind, als es in den normalen Urothelzellen der Fall ist. Dadurch sind Teile des Proteinrückgrates dem Immunsystem ausgesetzt. Die mit Fluoreszein markierten Antikörper M344 und LDQ10 erkennen Epitope in genau diesen Bereichen, sodass die Zellen, die positiv für die oben genannten Tumor-Mucine sind, eine grüne Fluoreszenz zeigen (Bergeron et al., 1996a). Werden also schwach glykosylierte Schleimstoffe von einer Zelle exprimiert, erscheint diese im Epifluoreszenzmikroskop grün-leuchtend (Mian et al., 1999,

Lodde et al., 2003, Mian et al., 2005, Vriesema et al., 2001, Bergeron et al., 1996a).

- Der Antikörper 19A211 bindet mit seiner Texas Red Markierung an eine glykosylierte Form des karzinoembryonalen Antigens (CEA) (Schmitz-Drager et al., 2010). Diese CEA-Komponente wird wie die M344- und LDQ10-Antigene hauptsächlich von Harnblasentumorzellen, aber nicht von normalen Urothelzellen exprimiert (Vriesema et al., 2001, SCIMEDX, 2015). Eine Ausnahme bilden die gelegentlich mitgefärbten urothelialen Schirmzellen (Bergeron et al., 1996b). Eine rote Fluoreszenz auf den Sedimentpräparaten ist demnach ein Zeichen für Zellen mit CEA-Komponenten (Mian et al., 1999, Lodde et al., 2003, Mian et al., 2005).

### 3. Positive und negative Kontrollen

In jedem Testkit sind außerdem eine positive und eine negative Probe enthalten. Diese sind besonders wichtig um die korrekt durchgeführte Färbeprozedur zu überprüfen und zu garantieren (Mian et al., 1999, Lodde et al., 2001). In der positiven Kontrolle sind Zellen enthalten, die alle drei Epitope exprimieren, welche durch die M344-, LDQ10- und 19A211-Antikörper erkannt werden. Laut Gebrauchsanweisung sollen unter optimalen Bedingungen im Durchschnitt 27% der Zellen eine rote Färbung und 37% eine grüne Färbung aufweisen. In der negativen Kontrolle sollen, bis auf die gelegentlich schwach leuchtenden Schirmzellen, keine fluoreszierenden Zellen gefunden werden (SCIMEDX, 2015).

### 4. Fixierungslösung:

Zur Fixierung des Urins ist in jedem Testkit ein Pulvergemisch aus Puffer und Polyethylenglykol enthalten, welches mit entionisiertem Wasser bis zur vollständigen Auflösung vermischt wird und ein Volumen von 50 ml ergibt. Pro Urinprobe wird davon 1 ml benötigt (SCIMEDX, 2015).

## 2.7.2 Herstellung der Sedimentpräparate

### 2.7.2.1 Fixierung des Urins

Pro Patient wurden für den uCyt+-Test 20-40 ml Urin benötigt. Dieser wurde gleich nach der Probengewinnung mit dem gleichen Volumen von 50%igem Ethanol oder 50%igem Isopropanol vermischt. Anschließend wurden die Urinproben bei 2°C bis 8°C kühl aufbewahrt. Der Test wurde wie vorgeschrieben innerhalb der folgenden sieben Tage in Labor durchgeführt.

Zu Beginn wurde 1 ml der Fixierungslösung gründlich mit dem Urin-Alkohol-Gemisch vermengt. Die fixierte Probe wurde anschließend einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unterzogen.

### 2.7.2.2 Herstellung der Kontrollpräparate

Mit jedem Färbeprozess wurden eine positive und eine negative Kontrolle angefertigt. Dazu wurden als erstes 20 µl der entsprechenden Kontrolllösungen auf die jeweils passend beschrifteten und mit Siliciumwasserstoff vorbehandelten Objektträger (SuperFrost/Plus, Langenbrinck, Tieningen) mit einer Mikropipette aufgetragen. Gleich darauf wurde das Fixationsspray Merckofix der Firma Merck KGaA (Darmstadt) aus 15-Zentimeter Abstand appliziert, woraufhin die beiden Kontrollproben 10-15 Minuten trockneten.

### 2.7.2.3 Zellübertragung auf Objektträger

Zur Übertragung der abgeschilferten Zellen aus den Patientenuurinproben auf einen ebenfalls mit Siliciumwasserstoff vorbehandelten Objektträger wurde der Urin durch eine Filterspitze aufgezogen und solange gepresst, bis sich genug Zellen auf der eingelegten Filtermembran (Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman, Maidstone, UK) angesammelt hatten. Die verwendeten Membranen wiesen eine Porengröße von 8 µm und einem Durchmesser von 25 mm auf. Durch Druckapplikation auf den Filter wurden die auf der Membran angehäuften Zellen anschließend auf die beschrifteten Objektträger übertragen und ebenfalls unverzüglich mit dem Merckofix-Fixationsspray gesichert.

#### 2.7.2.4 Vorbereitung auf die Färbeprozedur mittels absteigenden Alkoholreihen

Nun wurden die vollständig getrockneten Patienten- und Kontrollproben mittels 8 Bädern auf die Färbeprozedur vorbereitet. Zuerst wurden die Präparate nacheinander 10 Mal erst in 80%iges Ethanol, dann ebenso oft in 70- und 50%iges Ethanol getaucht.

#### 2.7.2.5 Morphologische Gegenfärbung

Danach folgten ein dreimaliges Eintunken der Präparate in entmineralisiertes Wasser und ein 90-sekündiges Verbleiben in einer Mischung aus Hämatoxylin und 4%iger Essigsäure. Zum Schluss wurden die Objektträger jeweils 10 Mal in 3 verschiedene Bäder mit entmineralisiertem Wasser getaucht.

#### 2.7.2.6 Blockierung

Hiernach wurden die Präparate in eine feuchte Kammer gelegt und mit jeweils 4 Tropfen der mitgelieferten Blockierungslösung versehen, um die unspezifischen Bindungsstellen zu sättigen. Die Überschüsse dieser Lösung wurden sorgfältig entfernt. Hierdurch wurde ein zu starkes Absinken des Fluoreszenz-Signals durch den Blockierungsvorgang vermieden.

#### 2.7.2.7 Immunreaktion

Nach 15 Minuten Inkubationszeit konnte mit der Färbeprozedur begonnen werden. Dazu wurden 4 Tropfen des Antikörper-Cocktails auf jedes Präparat gegeben. Anschließend wurden diese für etwa eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert (Zusammensetzung des Antikörpercocktails siehe 1.1.6.2.2). Ab diesem Herstellungszeitpunkt musste darauf geachtet werden, dass die Objekte vor Licht geschützt waren.

Die Präparate wurden nun mit nach Herstellerangaben angefertigter PBS (phosphate-buffered saline solution), welches 0,05% Tween®20 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat) enthielt, gespült und danach in eine Lösung der gleichen Zusammensetzung erst 10 Mal versenkt, 3 Minuten darin belassen und nochmals

10 Mal in die Lösung getaucht. Mit einer frischen PBS/Tween®20 Lösung wurde ein zweites Mal genauso verfahren.

#### 2.7.2.8 Eindeckeln

Zur Fertigstellung der Präparate wurde jeweils ein Tropfen Eindeckel-Medium auf jedes Deckglas gegeben, womit die Zellzone bedeckt wurde. Die Präparate waren somit für die Beurteilung bereit, welche - wegen des Nachlassens der Fluoreszenz-Intensität - innerhalb der folgenden 7 Tage erfolgen musste. Während dieser Zeit wurden sie bei zwischen 2°C und 8°C gelagert.

#### **2.7.3 Auswertung der Sedimentpräparate**

Vor der Betrachtung wurden die Patienten- und Kontrollpräparate etwa 15 Minuten auf Raumtemperatur gebracht. Zur Untersuchung wurde ein Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen) verwendet. In der 20er- und 40er-Vergrößerung wurden die Zellen mithilfe des eingesetzten rot-/grün-Doppel-filters (Omega XF 53 Filter) betrachtet. Konnte eine fluoreszierende Zelle gefunden werden, wurde ihre Zellmorphologie im Lichtmikroskop untersucht. Erst so konnte mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Urothelzelle, und nicht beispielsweise um eine artifiziell leuchtende, nicht-karzinomatöse Schirmzelle, handelte. Mit der positiven und der negativen Kontrolle konnte außerdem die korrekte Färbeprozedur überprüft werden.

Während der Auswertung musste darauf geachtet werden, dass die Präparate möglichst kurz dem Licht ausgesetzt waren, da die Fluoreszenzkraft durch die Beleuchtung schnell abgeschwächt wird (Vriesema et al., 2001).

Im Rahmen der Präparatauswertungen, die zwischen November 2006 und November 2009 stattfanden, wurde ein uCyt+-Test als positiv eingestuft, wenn mindestens eine rote oder grüne fluoreszierende Zelle in einem Präparat gefunden wurde (Mian et al., 1999, Lodde et al., 2003, Mian et al., 2005). Als negativ wurde der Test gewertet, wenn das Präparat keine fluoreszierende Zelle mit Ausnahme eventuell artifiziell fluoreszierender nicht-urothelialer Zellen aufwies. In einigen

Testbefunden wurde zusätzlich das Vorhandensein von ‚Borderline-Zellen‘ notiert, welche je nach Ausprägung der fluoreszierenden Granulation zu einem positiven oder zu einem negativen Testergebnis führten (siehe 2.8.1). Nach Empfehlung des Herstellers (SCIMEDX Corporation, Denville, USA) wurde eine Probe als nicht auswertbar klassifiziert, wenn nicht mindestens 500 Zellen auf dem Objektträger zu sehen waren. Um die Anzahl der Zellen abschätzen zu können, wurde der Objektträger bei 200-facher Vergrößerung betrachtet und als nicht auswertbar eingestuft, wenn nicht mindestens eine Zelle pro Gesichtsfeld vorhanden war. In diesen Fällen musste der Test mit ausreichender Zellmenge wiederholt werden.

## **2.8 Erfassung der Rohdaten des uCyt+-Tests**

Im Rahmen der klinischen Routine wurde der uCyt+-Test nach den vorgegebenen Kriterien mikroskopisch befundet. Um jedes Testergebnis eindeutig einer Gruppe zuordnen zu können, erfolgte die Interpretation des Ergebnisses nach folgenden Kriterien:

Als wichtigstes Kriterium muss hierbei die bei abgeblätterten Tumorzellen (Transitionalzellen) fluoreszenzmikroskopisch sichtbare granulierende Fluoreszenz genannt werden. Je nachdem welches Antigen die betrachtete Karzinomzelle trug, erschien diese rot- oder grün-leuchtend (Mian et al., 2005, Mian et al., 1999). Hier musste allerdings von den teilweise ebenfalls fluoreszierenden Plattenepithelzellen, Eosinophilen (Leukozyten) und Schirmzellen unterschieden werden (Cordon-Cardo et al., 1992). Bei ihnen fiel die Fluoreszenz und vor allem die Granulation geringer und homogener aus und erschien teilweise schwach orange-leuchtend. Weiterhin war es wichtig die Zellmorphologie im Lichtmikroskop genau zu betrachten. Während Übergangsepithelzellen einen Nukleus und die für sie typische rundliche oder ovale morphologischen Erscheinung zeigen, weisen Schirmzellen beispielsweise eine mehrkantige, schwach gerundete Form mit mehr als einem Kern auf. Eosinophile konnten durch ihren multilobulären Kern und ihre leuchtend orangene oder grüne Fluoreszenz identifiziert werden.

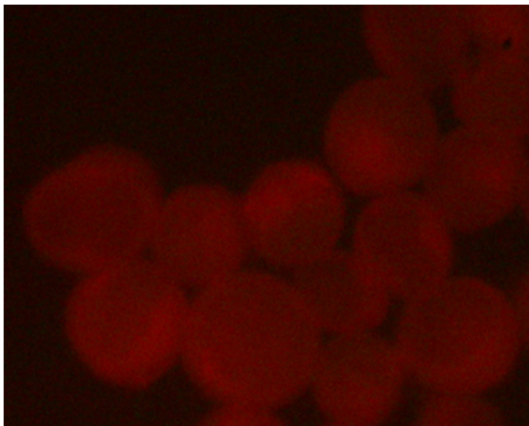
Plattenepithelzellen zeichnen sich durch ihre vieleckige Form aus (DiagnoCure™, 2000).

### 2.8.1 Einteilung in verschiedene Gruppen fluoreszierender Zellen nach ihrem Granulations- und Fluoreszenzgrad

Jede in den Akten dokumentierte Zelle wurde in eine der folgenden vier Gruppen eingeteilt. Entscheidend waren dabei die Stärke der Fluoreszenz, deren Art - ob granulierend oder homogen - sowie der Anteil der Zytoplasmafläche, die diese Fluoreszenz einnahm.

#### 2.8.1.1 Eindeutig negative Zellen

Als eindeutig negativ wurden die Transitionalzellen beurteilt, bei denen keine spezifische Fluoreszenz, sondern eine einheitliche, homogene Farbe zu erkennen war. Ebenfalls als charakteristisch für eindeutig nicht positive Übergangsepithelzellen wurde das Ausbleiben von Granulationen eingestuft (siehe



*Abbildung 5; Beispiel von roten, eindeutig negativen Zellen ohne granulierende Fluoreszenz aus einem Studienpräparat (21.08.2014)*

Abbildung 5). Außerdem wurden Zellen mit artifizieller Fluoreszenz aufgrund der Zusammenschau ihrer Morphologie und ihres Fluoreszenzergebnisses als nicht positive Zellen gewertet. Dies schließt folgende nicht-kanzerogene Zellen ein: Eosinophile, Erythrozyten und Entzündungszellen sowie Schirm- und Plattenepithelzelle (SCIMEDX, 2015).

#### 2.8.1.2 Eindeutig positive Zellen

Jede Zelle, die eindeutig und über mehr als die Hälfte (>50%) der gezeigten Zytoplasmafläche eine Granulierung von grüner oder roter Fluoreszenz zeigte, wurde als positive Zelle gewertet (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7)



(SCIMEDX, 2015). Die Positivität der roten oder grünen Zellen musste im Lichtmikroskop durch das Vorhandensein eines Nukleus und der für Übergangsepithelzellen typischen rundlichen oder ovalen morphologischen Erscheinung bestätigt werden (Vriesema et al., 2001).

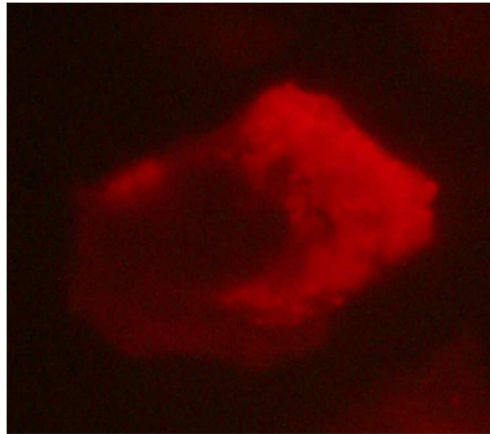


Abbildung 6; Beispiel einer roten definitiv positiven Zelle mit granulierender Fluoreszenz in > 50% der Zytoplasmfläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014)

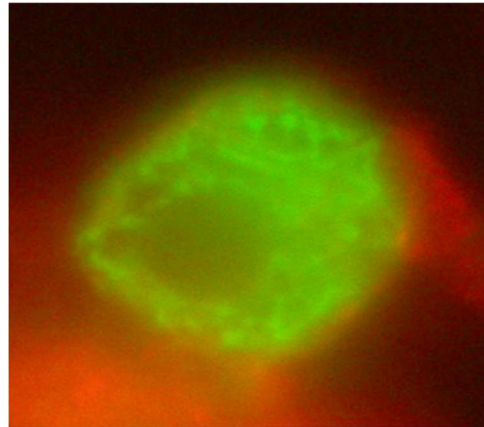


Abbildung 7; Beispiel einer grünen definitiv positiven Zelle mit granulierender Fluoreszenz in > 50% der Zytoplasmfläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014)

### 2.8.1.3 Borderline-Zellen nach Herstellerangaben

Laut Angaben des Herstellers werden Zellen, deren Fluoreszenz stärker ausfällt als bei negativen Zellen, deren Granulation aber weniger als die Hälfte der Zelle bedeckt (< 50%), als ‚Borderline-Zellen‘ bezeichnet. Diese sollten nach Herstellerempfehlung zu einem negativen Testergebnis führen (siehe Abbildung 8). In der Literatur wurden bisher nur uneindeutige und uneinheitliche Definitionen für diese Zellen genannt. In den im Rahmen dieser Studie gesichteten Testbefunde wurden ‚Borderline-Zellen‘ notiert, die teilweise zu einem verdächtigen und teilweise zu einem negativen Testergebnis führten. Für die Auswertbarkeit und Zuordenbarkeit der Ergebnisse zu einer Gruppe wurden eindeutige Definitionen für diese beiden Ausprägungsarten vorgenommen.

### 2.8.1.3.1 Borderline-Zellen nach Definition

Als Borderline-Zellen im engeren Sinne wurden die Zellen definiert, die aufgrund ihrer Fluoreszenz-Intensität und der Fläche der Granulation, trotz bekannter obenstehender Kriterien, nicht eindeutig als positive, aber auch nicht als negative Zellen gewertet werden konnten (z.B. eindeutig granulierte Fluoreszenz aber nicht eindeutig über 50% der Zytoplasmafläche).

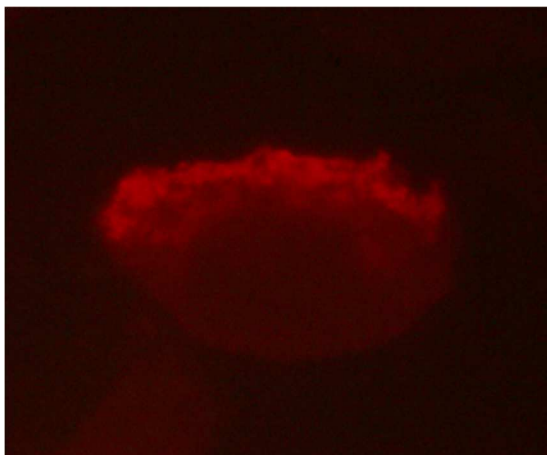


Abbildung 8; Beispiel einer roten Borderline-Zelle mit granulierender Fluoreszenz in < 50% der Zytoplasmafläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014)

mehrere solcher Zellen enthielten, ohne dass eindeutig positive Zellen sichtbar waren, wurden für die klinische Routine als ‚verdächtig‘ oder ‚auffällig‘ bezeichnet. Für die Analyse der Daten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle diese in den Patientenakten als ‚verdächtig‘ bezeichneten Testergebnisse zu den positiven Testergebnissen gezählt.

### 2.8.1.3.2 Unterschwellige Zellen nach Definition

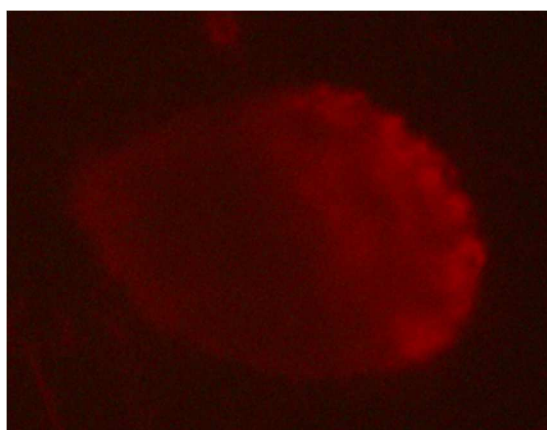


Abbildung 9; Beispiel einer roten unterschwelligen Zelle mit granulierender Fluoreszenz in < 50% der Zytoplasmafläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014)

Als unterschwellige Zellen wurden die Zellen definiert, die zwar eine eindeutige granulierende Fluoreszenz aufwiesen, diese jedoch deutlich unter 50% der Zytoplasmafläche ausfüllte (siehe Abbildung 9). Diese wurden in den Testergebnissen zwar als ‚Borderline-Zellen‘ bezeichnet, führte aber zu einem negativen Testergebnis.

## **2.9 Statistische Analysen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die statistischen Analysen mit dem Statistikprogramm JMP® in der Version 10.0.0 (SAS Institute Inc, Cary NC, U.S.A.) gearbeitet. Zuerst wurden die Parameter in einer Excel-Tabelle erhoben und gespeichert. Um die Datenübertragung von Excel in JMP und die statistischen Auswertungen zu ermöglichen, mussten die einzelnen Spalten gemäß den Vorgaben des Institutes für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen vorerst aufgearbeitet werden. Die erfolgte Kodierung der Datentabelle wurde in einer separaten Excel-Tabelle im Sinne eines Kodierplans gespeichert. Hier wurden der Wertebereich, die vorgenommenen Abkürzungen und Kodierungen und die Einheiten vermerkt. Genauso wurde der Skalentyp, welcher Merkmale mit stetiger, ordinaler und nominaler Ausprägung enthielt, dokumentiert. Somit konnten die benutzten Abkürzungen und Kodierungen jederzeit erneut nachvollzogen werden.

Als Referenz-Standard für das Vorhandensein oder das Nichtvorhandensein eines Harnblasenkarzinoms wurde das Ergebnis der Zystoskopie zusammen mit der histologischen Auswertung im Falle einer Gewebsentnahme gewählt.

### **2.9.1 Verteilungsanalysen**

Mithilfe von Verteilungsanalysen konnten Charakteristika des Patientenkollektivs wie etwa die Geschlechts- oder Altersverteilung dargestellt werden. So konnten außerdem die Häufigkeit der einzelnen Bildgebungsverfahren, der positiven und der negativen uCyt+-Testergebnisse und der einzelnen Tumorgrade und –stadien, sowie die Mittelwerte und Quantile der verschiedenen Zellarten errechnet werden.

### **2.9.2 Kontingenzanalysen**

Zur Studie der Numerik der mehr oder weniger fluoreszierenden Zellen wurden die verschiedenen Erscheinungsarten jeweils getrennt voneinander betrachtet. Zur Vereinfachung wurden die jeweils betrachteten Zellen in sechs Zellgruppen eingeteilt:

Zellgruppe G1: nur die definitiv positiven grünen Zellen

Zellgruppe R1: nur die definitiv positiven roten Zellen

Zellgruppe G2: die definitiv positiven grünen Zellen und die grünen Borderline-Zellen

Zellgruppe R2: die definitiv positiven roten Zellen und die roten Borderline-Zellen

Zellgruppe G3: die definitiv positiven grünen Zellen, die grünen Borderline-Zellen und die unterschwelligen grünen Zellen.

Zellgruppe R3: die definitiv positiven roten Zellen, die roten Borderline-Zellen und die unterschwelligen roten Zellen

In jeder der sechs Zellgruppen wurde der ‚cut off‘ von  $> 0$  Zellen auf  $\geq 3$  und schließlich auf  $\geq 5$  Zellen gelegt (siehe Abbildung 10).

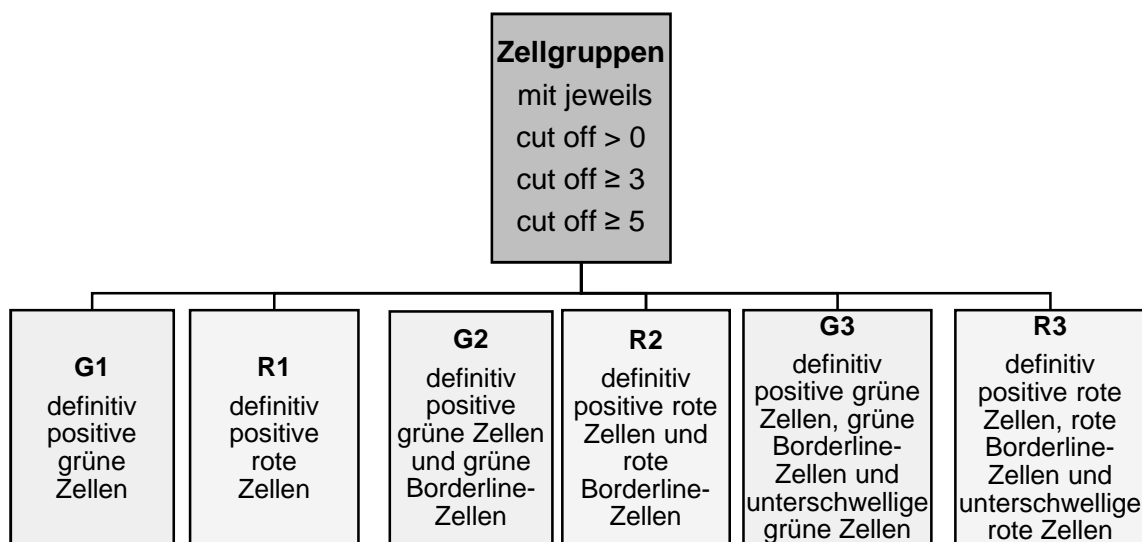


Abbildung 10; Einteilung der unterschiedlichen Fluoreszenzausprägungen in die Zellgruppen G1-3 und R1-3

Mittels Kontingenzanalysen und den daraus resultierenden Viel-Felder-Tafeln wurden für jede der sechs Zellgruppen mit jedem der drei unterschiedlichen ‚cut off‘-Werte die Sensitivität und die Spezifität, die positiven und negativen Vorhersagewerte (PPV und NPV) sowie die Akkuratess errechnet. In den Tabellen waren jeweils die Werte für die falsch-positiven Ergebnisse (kein Tumor, aber positiver Test), die richtig-positiven Ergebnisse (Tumor und positiver Test), die falsch-

negativen Ergebnisse (Tumor und negativer Test) und die richtig-negativen Ergebnisse (kein Tumor und negativer Test) dargestellt (siehe Abbildung 11).

Bei Analyse der Zellgruppe G1 und R1 wurden nur die definitiv positiven grünen und roten Zellen als ausschlaggebend für ein positives Ergebnis gewertet. Bei dem ‚cut off‘ von 0 reichte hier eine einzige definitiv positiv fluoreszierende Zelle für ein positives Ergebnis aus. Bei dem ‚cut off‘ von  $\geq 3$  und  $\geq 5$  waren die Tests nur positiv, wenn mindestens 3 beziehungsweise 5 definitiv positive Zellen in einem Urinpräparat gefunden wurden.

Bei der Analyse der uCyt+-Ergebnisse der Zellgruppen G2 und R2 wurden dieselben Untersuchungen wie bereits für die Zellgruppen G1 und R1 durchgeführt, wobei das Vorhandensein von Borderline-Zellen für das Testergebnis als gleichwertig mit dem von definitiven positiven Zellen angesehen wurde. Bei den Zellgruppen G3 und R3 galt dasselbe für die unerschwelligen Zellen.

Für diese Analysen diente die jeweils betrachtete Zellgruppe mit den unterschiedlichen ‚cut off‘-Werten als Einflussvariable und das Zystoskopie-Ergebnis als ordinale Zielvariablen. So konnte die diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests bei Betrachtung der unterschiedlichen Zellgruppen verglichen werden.

	<b>Wahrheit: Keinen Tumor</b>	<b>Wahrheit: Tumor</b>	
<b>Diagnose: kein Tumor</b> Zellen der Zellgruppe < als gesetzter cut off	<b>D</b> richtig-negatives Testergebnis	<b>C</b> falsch-negatives Testergebnis	<b>NPV: <math>D/(D+C)</math></b>
<b>Diagnose: Tumor</b> Zellen der Zellgruppe > als gesetzter cut off	<b>B</b> falsch-positives Testergebnis	<b>A</b> richtig-positives Testergebnis	<b>PPV: <math>A/(A+B)</math></b>
	<b>Spezifität: <math>D/(D+B)</math></b>	<b>Sensitivität: <math>A/(A+C)</math></b>	

Abbildung 11; Vier-Felder-Tafel (Kontingenztafel) mit Formeln zur Berechnung von Spezifität, Sensitivität, PPV (positiver prädiktiver Wert) und NPV (negativer prädiktiver Wert); Akkuratessse:  $(A+D)/(A+B+C+D)$

### 2.9.3 Receiver Operating Characteristic-Kurven

Zusätzlich wurde für jede der sechs Zellgruppen eine ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic-Kurve) sowie eine ROC-Tabelle erstellt (Beispiel siehe Abbildung 12). Hier konnten die Werte für die Sensitivität und die Spezifität bei unterschiedlichen ‚cut off‘-Werten ermittelt werden. Als ‚best cut off‘-Wert wurde die Zellanzahl bezeichnet, bei der die Rechnung (Spezifität  $\times$  (1 – Sensitivität)) den höchsten Wert annahm und somit das günstigste Verhältnis von Sensitivität und

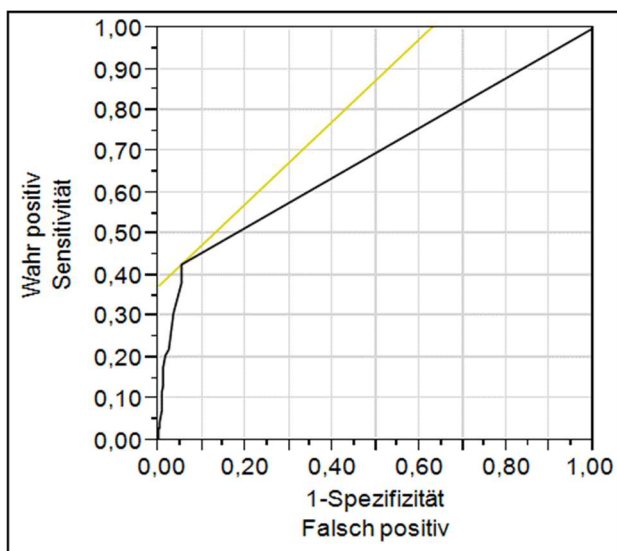


Abbildung 12; Beispiel einer ROC-Kurve mit ‚best cut off‘ bei einer Sensitivität von 42,65% und einer Spezifität von 94,7%, AUC = 0,68799

Spezifität vorlag. Durch die Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve (AUC = „area under curve“), war es möglich, eine Aussage über die Qualität des Tests bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen zu treffen (Vriesema et al., 2001). Je näher der Flächenwert dem Maximalwert 1 war, desto besser war die diagnostische Aussagekraft des Tests bei Wertung der betrachteten Zellgruppe.

### 2.9.4 Untersuchung potentieller Einflussparameter auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen

Die Abhängigkeit der Zellanzahl von den untersuchten Parametern wurde mittels der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Dabei diente die Zellanzahl als abhängige, metrische Zielvariable und der jeweilige potenzielle Einflussparameter als Einflussvariable. Zur Häufigkeitsauszählung wurden der Medianwert mit den Interquartilsabständen und der Mittelwert errechnet.

Um den Einfluss des Alters auf die Zellanzahl zu bestimmen, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei diente das Alter als unabhängige und

die jeweils untersuchte Zellgruppe als abhängige Variable. Es wurde der Determinationskoeffizient  $R^2$  errechnet, welcher Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Ein  $R^2$ -Wert nahe 1, zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen den zwei untersuchten Variablen an.

Mittels des nicht parametrischen Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Tests und der Varianzanalyse wurden die p-Werte ermittelt, mit welchen eine Aussage über die statistische Signifikanz des jeweiligen Vergleichs getroffen werden konnte. War die Wahrscheinlichkeit  $< 5\%$  (p-Wert  $< 0,05$ ), so wurde der Einfluss des Parameters als statistisch signifikant angesehen.

### Einfluss histopathologischer Parameter

Es wurde der Einfluss des Tumorgrades, des Tumorstadiums und der Invasivität der Tumore auf die Anzahl der definitiv positiven Zellen, der Borderline-Zellen und der unterschwelligeren Zellen der Patienten mit histologisch und zystoskopisch nachgewiesenem Tumor betrachtet.

Für die Darstellung des Einflusses der Invasivität wurde das Patientenkollektiv mit Harnblasentumor gemäß deren TNM-Klassifikation in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 setzte sich aus allen Patienten zusammen, bei denen ein Harnblasenkarzinom in den oberflächlichen Stadien Ta oder T1 nachgewiesen werden konnte. Gruppe 2 wurde aus den Patienten gebildet, deren histologische Untersuchung ein muskelinfiltrierendes Tumorstadium von T2 oder höher bestätigt hatte.

Die PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential) wurden, wie es auch die WHO-Klassifikation von 2004 vorschlägt, zu den TaG1-Tumoren gezählt und gehörten damit der Invasivitäts-Gruppe 1 an (Schmelz, 2010).

Für jede der entstandenen Patientengruppen innerhalb der drei Einflussparameter und des tumorfreien Kollektivs wurden die Medianwerte und die Interquartilsabstände, sowie die Mittelwerte und p-Werte für jede der betrachteten Zellgruppen errechnet und konnten so miteinander verglichen werden.

### Potenzielle Einflussparameter

Weiterhin wurde der potenzielle Einfluss der möglichen Störfaktoren ‚Alter‘, ‚Geschlecht‘, ‚Rauchgewohnheiten‘, ‚Harnwegsinfekt ja/nein‘, ‚mechanische Manipulation bei Urinentnahme ja/nein‘, ‚benigner Prostatahyperplasien oder Prostatakarzinomen‘ und ‚Hämaturie-Typ‘ auf die fluoreszierende Zellanzahl bei tumorfreien Patienten bewertet. Dazu wurden nur die Patienten einbezogen, deren zystoskopische Untersuchung und histologisches Gutachten im Falle einer Gewebsentnahme keinen Hinweis auf einen Tumor ergeben hatten. Dabei wurden die Zellgruppen G2 und R2, sowie die Zellgruppen G3 und R3 getrennt voneinander betrachtet.

So wurden innerhalb der Gruppe ohne zystoskopischen Tumorphinweis die Zellanzahlen der Patienten mit dem Vorliegen eines potentiellen Einflussparameters mit der Zellanzahl derjenige ohne dieser Eigenschaft verglichen.

### **2.9.5 Ermittlung der richtig-positiven uCyt+-Ergebnisse unter den falsch-negativen Zytologie-Ergebnissen**

Für diese Untersuchung wurde das gesamte Kollektiv in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 bestand aus allen Patienten, bei denen kein Blasentumor festgestellt werden konnte oder ein positives Zytologie-Ergebnis vorlag. Zur zweiten Gruppe gehörten die Patienten, denen im histologischen Gutachten und der Zystoskopie ein Harnblasenkarzinom nachgewiesen wurde und bei denen gleichzeitig das Zytologie-Ergebnis falsch-negativ, ausgefallen war.

Nun wurde mittels Kontingenzanalysen die Anzahl der Patienten verglichen, die ein falsch-negatives Zytologie-Ergebnis aufwiesen, aber durch ein richtig-positives uCyt+-Testergebnis bei Wertung der Zellgruppen G2 + R2 und der Zellgruppen G3 + R3 identifiziert wurden. Ziel dieser Analyse war es, zu sehen, wie viele Tumoren, die durch die Zytologie nicht auffindig gemacht wurden, bei der Durchführung des uCyt+-Tests aufgespürt werden konnten.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Von den Patienten, die sich zwischen dem 02. November 2006 und dem 27. November 2009 in der Urologischen Klinik Tübingen vorstellten, gelangten 444 nach den unter 2.3 beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien in das untersuchte Kollektiv.

#### 3.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

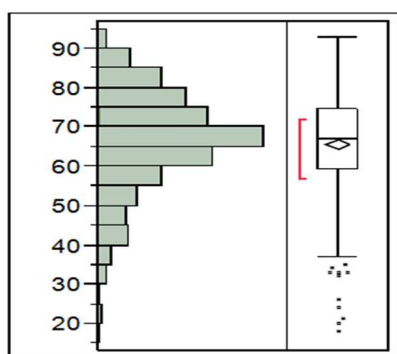


Abbildung 13; Altersverteilung des endgültigen Patientenkollektivs in Jahren

Unter den 444 eingeschlossenen Patienten befanden sich 376 Männer (85%) und 68 Frauen (15%). Dies entspricht in etwa einem Geschlechterverhältnis von 5,7 Männern zu einer Frau.

Im Durchschnitt lag das Alter der Untersuchten bei 66 Jahren ( $\pm 13,1$ ). Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Urinabnahme 18 Jahre alt, der Älteste hatte ein Alter von 93 Jahren. Der Median lag bei 67 (IQR 59,25-74,75) Jahren (Abbildung 13).

#### 3.1.2 Vergleich des uCyt+-Testergebnisses mit dem Resultat der zystoskopischen und histologischen Untersuchung

Im Patientenkollektiv wurde bei 68 Patienten (15,3%) ein Harnblasentumor zystoskopisch und histologisch gesichert. 376 Patienten (84,7%) zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Anzeichen für ein Blasenkarzinom (Abbildung 14). Der uCyt+-Test wurde bei allen 444 Patienten durchgeführt. In 139 (31,3%) Fällen zeigte er den Verdacht auf das Vorhandensein eines Tumors an. Durch den Abgleich mit den histologischen und zystoskopischen Auswertungen konnte das

positive uCyt+-Testergebnis in 59 Fällen (13,3%) bestätigt werden, bei 80 Patienten (18%) ergab der uCyt+-Test somit ein falsch-positives Ergebnis. Bei den übrigen 305 Patienten (68,7%) zeigte der uCyt+-Test ein negatives Ergebnis. In 66,7% der Fälle (n=296) war der Test demnach richtig-negativ, in 2% (n=9) falsch-negativ. Die Sensitivität des uCyt+-Tests lag bei 86,8%, die Spezifität bei 78,7%, der PPV bei 42,4% und der NPV bei 97,1% (siehe Tabelle 1).

<b>Häufigkeiten</b>			
Gesamt %	<b>Kein Tumor</b>	<b>Tumor</b>	<b>Ge- samt</b>
Spalte %			
Zeile %			
<b>uCyt+ negativ</b> (Zellgruppe G2 und R2 = 0)	296 66,67 78,72 97,05	9 2,03 13,24 2,95	305 68,69
<b>uCyt+ positiv</b> (Zellgruppe G2 oder R2 > 0)	80 18,02 21,28 57,55	59 13,29 86,76 42,45	139 31,31
	376 84,68	68 15,32	444

Tabelle 1; Kontingenztabelle der Zellgruppe G2 + R2 (definitiv positive grüne und rote Zellen und grüne und rote Borderline-Zellen) und der Patienten mit oder ohne Tumor bei dem ,cut off'-Wert von 0

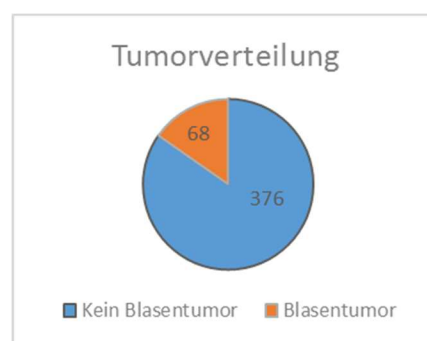


Abbildung 14; Tumorverteilung im Patientenkollektiv nach zystoskopischen und histologischen Ergebnissen (in%)

### 3.1.3 Verteilung der Tumorstadien unter Patienten mit Blasentumor

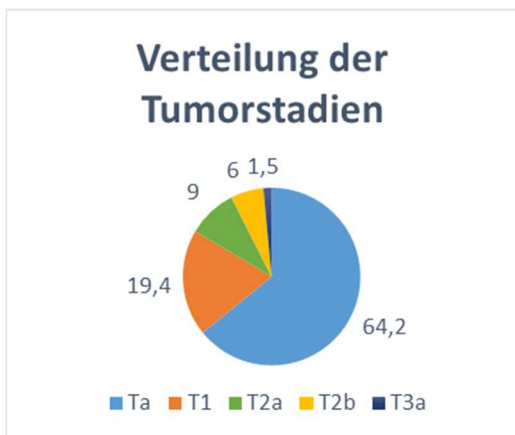


Abbildung 15; Verteilung der Tumorstadien innerhalb des Kollektivs mit Tumor (in %)

Bei 67 der 68 Patienten mit Harnblasentumor wurde in der Patientenakte ein Tumorstadium dokumentiert. In einem Fall lagen keine Angaben vor. 84% (n=56) dieser Tumore wiesen ein oberflächliches Stadium auf. Darunter befanden sich 64,2% (n=43) im Ta-Stadium und 19,4% (n=13) im T1-Stadium. 16% (n=11) der Tumore im Patientenkollektiv zeigten ein muskelfiltrierendes Wachstum. 9% (n=6)

davon waren im T2a-Stadium, 6% (n=4) im T2b-Stadium und nur ein Tumor im T3a-Stadium (Abbildung 15). Invasivere Tumoren konnten in unserem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.4 Verteilung des Tumorgrades unter den Patienten mit Blasentumor

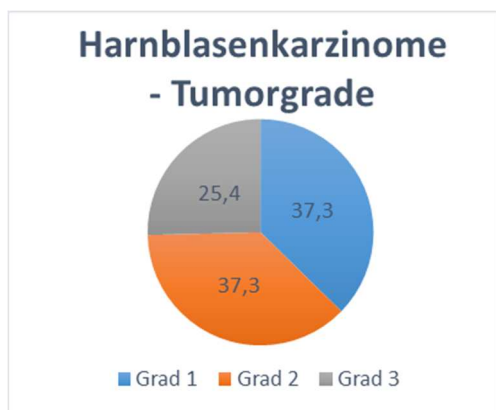


Abbildung 16; Verteilung des Tumorgrades bei Patienten mit Harnblasentumor (in %)

Bei einem Patienten der 68 Tumorpatienten wurde kein Differenzierungsgrad dokumentiert. Unter den restlichen 67 Tumorpatienten befanden 37,3% (n=25) mit dem Tumorgrad 1, ebenso viele mit einem Tumorgrad 2 und 25,7% (n=17) mit Tumorgrad 3 (Abbildung 16).

### **3.2 Diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen bei variierenden ‚cut off‘-Werten**

Nach der Herstellerdefinition fällt der uCyt+-Test positiv aus, wenn mindestens eine rote oder grüne definitiv positive Zelle oder eine rote oder grüne Borderline-Zelle im Urinpräparat gefunden wird (Zellgruppen G2 und R2; siehe 2.7.3). Um die diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen zu beurteilen, wurden die Anzahl der richtig- und falsch-positiven und negativen Ergebnisse, sowie die Spezifität und die Sensitivität des Tests bei verschiedenen ‚cut off‘-Werten für positive Zellen von 0,  $\geq 3$  und  $\geq 5$  verglichen.

#### **3.2.1 Vergleich der uCyt+-Testergebnisse bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen bei variierenden ‚cut off‘-Werten**

In dem untersuchten Kollektiv von 444 Patienten wiesen 84,7% der Untersuchten keinen Tumor auf, während bei 15,3% zystoskopisch und histologisch ein Tumor nachgewiesen wurde. Bei keiner der in dieser Arbeit untersuchten Interpretationsalgorithmen wurden alle 68 Tumore durch ein richtig-positives uCyt+-Ergebnis erkannt. Die Sensitivität des Tests lag somit niemals bei 100%. Die höchste Sensitivität wurde für die Zellgruppen G3 und R3 bei dem ‚cut off‘-Wert  $> 0$  mit jeweils 64,7% errechnet. Die hohe Sensitivität ging jedoch mit einer geringen Spezifität einher (51,1% bzw. 76,9% bei den Zellgruppen G3 und R3) (siehe Tabelle 3).

#### Einfluss der Fluoreszenzausprägung

Bei Mitbewertung der Borderline-Zellen waren deutlich mehr uCyt+-Testergebnisse richtig-positiv als bei alleiniger Wertung der definitiv positiven Zellen (Tabelle 2). Dies spiegelt sich in dem deutlichen Sprung der Sensitivität bei Hinzunahme der Borderline-Zellen wider (47,1% (G1) auf 61,8% (G2) und 42,7% (R1) auf 63,2% (R2) bei ‚cut off‘  $> 0$ ) (Tabelle 3). Wurden zudem die unterschwelligen Zellen betrachtet, erhöhte sich die Anzahl der falsch-positiven Testresultate. Bei dem ‚cut off‘-Wert  $> 0$  stieg die falsch-positive Rate beispielsweise auf mehr als

das Doppelte an (17,1% (G2) auf 41,4% (G3) und 7,9% (R2) auf 19,6% (R3) bei ,cut off' $>0$ ). Gleichzeitig zeigten weniger Tests ein richtig-negatives Ergebnis, während sich die Anzahl der richtig-positiven Ergebnisse nur geringfügig änderte (Tabelle 2). Demnach sanken bei Hinzunahme der unterschwelligen Zellen die Spezifität und der PPV deutlich ab (79,8% bzw. 35,6% (G2) auf 51,1% bzw. 19,3% (G3) und 90,7% bzw. 55,1% (R2) und 76,9% bzw. 33,6% (R3) bei ,cut off' $>0$ ) (Tabelle 3).

Zusammengefasst lässt sich erkennen, dass bei Mitbewertung der Borderline-Zellen und der unterschwelligen Zellen die Sensitivität des uCyt+-Tests steigt und die Spezifität sinkt.

#### Einfluss der Erhöhung des ,cut off'-Levels

Die Steigerung des ,cut off'-Wertes führte wie in Tabelle 2 erkennbar zu mehr negativen und weniger positiven uCyt+-Testergebnissen. Es reduzierten sich sowohl die falsch-positiven, als auch die richtig-positiven Ergebnisse (Tabelle 2). Eine Erhöhung des ,cut off'-Wertes führte somit zu einer Steigerung der Spezifität und einer Reduktion der Sensitivität und des NPV (Tabelle 3).

Besonders auffällig ist der starke Abfall der Sensitivität jeweils bei Erhöhung des ,cut off'-Levels von  $\geq 3$  auf  $\geq 5$  Zellen auf teilweise unter die Hälfte des Wertes (Bsp.: Zellgruppe G2: Sensitivitätsabfall von 50,0% (,cut off'  $\geq 3$ ) auf 22,6% (,cut off'  $\geq 5$ )). Dies geht mit einer sehr hohen Spezifität bei dem ,cut off'-Level  $\geq 5$  einher (G1: 95,0% und R1: 97,3%), womit sich die hohen Werte für die Akkuratessse erklären lassen (G1: 83,6% und R1: 86,0%) (Tabelle 3).

#### Einfluss der Fluoreszenzfarbe

Bei allen roten Zellgruppen (R1-R3) lagen ähnlich viele richtig-positive Testergebnisse vor wie bei Wertung der korrespondierenden grünen Zellgruppen (G1-G3) (G2 7,7% zu R2 7,9% bei ,cut off'  $\geq 3$ ). Der prozentuale Anteil an richtig-negativen Testergebnissen lag bei den roten Zellen höher als bei den grünen Zellen (78,8% (R2) zu 70,1% (G2) bei ,cut off'  $\geq 3$ ) (Tabelle 2). Dies spiegelt sich in den höheren Werten der roten Zellen für die Spezifität (93,1% (R2) zu 82,7% (G2) bei

,cut off'  $\geq 3$ ), den PPV (57,4% (R2) zu 34,3 % (G2) bei ,cut off'  $\geq 3$ ) und die Sensitivität (51,5% (R2) zu 50,0% (G2) bei ,cut off'  $\geq 3$ ) wider (Tabelle 3).

Die Werte für die Akkuratessse lagen bei den roten Zellen (R1 86-86,9%; R2 86,3-86,7% und R3 75-84,7%) bei allen Interpretationsalgorithmen höher als bei den grünen Zellen (G1 82,4-83,6%; G2 77-80,6% und G3 53,2-77,9%). Die höchste Akkuratessse bei den grünen Zellen wurde mit 83,6% für die Zellgruppe G1 bei ,cut off'-Level  $\geq 5$  gemessen. Den insgesamt höchsten Wert für die Akkuratessse erreichte mit 86,9% die Zellgruppe R1 bei ,cut off'-Level  $> 0$  (Tabelle 3).

Häufigkeiten bei dem jeweiligen ,cut off'-Wert	Kein Tumor	Tumor	Gesamt
<b>Zellgruppe G1</b>			
<b>Zellgruppe G1 = 0</b>	n=335 (75,4%)	n=36 (8,1%)	n=371 (83,6%)
<b>Zellgruppe G1 <math>\leq 3</math></b>	n=338 (76,1%)	n=40 (9,0%)	n=378 (85,1%)
<b>Zellgruppe G1 <math>\leq 5</math></b>	n=357 (80,4%)	n=54 (12,2%)	n=411 (92,6%)
<b>Zellgruppe G1 <math>&gt; 0</math></b>	n=41 (9,2%)	n=32 (7,2%)	n=73 (16,4%)
<b>Zellgruppe G1 <math>&gt; 3</math></b>	n=38 (8,6%)	n=28 (6,3%)	n=66 (14,9%)
<b>Zellgruppe G1 <math>&gt; 5</math></b>	n=19 (4,3%)	n=14 (3,2%)	n=33 (7,4%)
<b>Zellgruppe G2</b>			
<b>Zellgruppe G2 = 0</b>	n=300 (67,6%)	n=26 (5,9%)	n=326 (73,4%)
<b>Zellgruppe G2 <math>\leq 3</math></b>	n=311 (70,1%)	n=34 (7,7%)	n=345 (77,7%)
<b>Zellgruppe G2 <math>\leq 5</math></b>	n=343 (77,3%)	n=53 (11,9%)	n=396 (89,2%)
<b>Zellgruppe G2 <math>&gt; 0</math></b>	n=76 (17,1%)	n=42 (9,5%)	n=118 (26,6%)
<b>Zellgruppe G2 <math>&gt; 3</math></b>	n=65 (14,6%)	n=34 (7,7%)	n=99 (22,3%)
<b>Zellgruppe G2 <math>&gt; 5</math></b>	n=33 (7,4%)	n=15 (3,4%)	n=48 (10,8%)
<b>Zellgruppe G3</b>			
<b>Zellgruppe G3 = 0</b>	n=192 (43,2%)	n=24 (5,4%)	n=216 (48,7%)
<b>Zellgruppe G3 <math>\leq 3</math></b>	n=258 (58,1%)	n=32 (7,2%)	n=290 (65,3%)
<b>Zellgruppe G3 <math>\leq 5</math></b>	n=331 (74,6%)	n=53 (11,9%)	n=384 (86,5%)
<b>Zellgruppe G3 <math>&gt; 0</math></b>	n=184 (41,4%)	n=42 (9,9%)	n=228 (51,4%)
<b>Zellgruppe G3 <math>&gt; 3</math></b>	n=118 (26,6%)	n=36 (8,1%)	n=154 (34,7%)
<b>Zellgruppe G3 <math>&gt; 5</math></b>	n=45 (10,1%)	n=15 (3,4%)	n=48 (10,8%)

<b>Zellgruppe R1</b>			
<b>Zellgruppe R1 = 0</b>	n=357 (80,4%)	n=39 (8,8%)	n=396 (89,2%)
<b>Zellgruppe R1 ≤ 3</b>	n=357 (80,4%)	n=42 (9,5%)	n=399 (86,9%)
<b>Zellgruppe R1 ≤ 5</b>	n=367 (82,7%)	n=53 (11,9%)	n=420 (94,6%)
<b>Zellgruppe R1 &gt; 0</b>	n=19 (4,3%)	n=29 (6,5%)	n=48 (10,8%)
<b>Zellgruppe R1 &gt; 3</b>	n=19 (4,3%)	n=26 (5,9%)	n=45 (10,1%)
<b>Zellgruppe R1 &gt; 5</b>	n=9 (2%)	n=15 (3,4%)	n=24 (5,4%)
<b>Zellgruppe R2</b>			
<b>Zellgruppe R2 = 0</b>	n=341 (76,8%)	n=25 (5,6%)	n=366 (82,4%)
<b>Zellgruppe R2 ≤ 3</b>	n=350 (78,8%)	n=33 (7,4%)	n=383 (86,3%)
<b>Zellgruppe R2 ≤ 5</b>	n=366 (82,4%)	n=51 (11,5%)	n=417 (93,9%)
<b>Zellgruppe R2 &gt; 0</b>	n=35 (7,9%)	n=43 (9,7%)	n=78 (17,6%)
<b>Zellgruppe R2 &gt; 3</b>	n=26 (5,9%)	n=35 (7,9%)	n=61 (13,7%)
<b>Zellgruppe R2 &gt; 5</b>	n=10 (2,3%)	n=17 (3,8%)	n=27 (6,1%)
<b>Zellgruppe R3</b>			
<b>Zellgruppe R3 = 0</b>	n=289 (65,1%)	n=24 (5,4%)	n=313 (70,5%)
<b>Zellgruppe R3 ≤ 3</b>	n=325 (73,2%)	n=33 (7,4%)	n=358 (80,6%)
<b>Zellgruppe R3 ≤ 5</b>	n=359 (80,9%)	n=51 (11,5%)	n=410 (92,3%)
<b>Zellgruppe R3 &gt; 0</b>	n=87 (19,6%)	n=44 (9,9%)	n=131 (29,5%)
<b>Zellgruppe R3 &gt; 3</b>	n=51 (12,5%)	n=35 (7,9%)	n=86 (19,4%)
<b>Zellgruppe R3 &gt; 5</b>	n=17 (3,8%)	n=17 (3,8%)	n=34 (7,7%)
	n=376 (84,7%)	n=68 (15,3%)	n=444

Tabelle 2: Kontingenztabelle der Zellgruppen G1-G3 und R1-R3 und der Patienten mit oder ohne Tumor bei den 'cut off'-Werten von 0, 3 und 5

	,cut off' bei 0	,cut off' bei 3	,cuf off' bei 5
<b>Zellgruppe G1</b>			
<b>Sensitivität</b>	47,1	41,2	20,6
<b>Spezifität</b>	89,1	89,9	95,0
<b>PPV</b>	43,8	42,4	42,4
<b>NPV</b>	90,3	89,4	86,9
<b>Akkuratesse</b>	82,7	82,4	83,6
<b>Zellgruppe G2</b>			
<b>Sensitivität</b>	61,8	50,0	22,6
<b>Spezifität</b>	79,8	82,7	91,2
<b>PPV</b>	35,6	34,3	31,3
<b>NPV</b>	92,0	90,1	86,6
<b>Akkuratesse</b>	77,0	77,7	80,6
<b>Zellgruppe G3</b>			
<b>Sensitivität</b>	64,7	52,9	22,1
<b>Spezifität</b>	51,1	68,6	88,3
<b>PPV</b>	19,3	23,4	25,0
<b>NPV</b>	88,9	89,0	86,2
<b>Akkuratesse</b>	53,2	66,2	77,9
<b>Zellgruppe R1</b>			
<b>Sensitivität</b>	42,7	38,2	22,1
<b>Spezifität</b>	95,0	95,0	97,6
<b>PPV</b>	60,4	57,8	62,5
<b>NPV</b>	90,2	89,5	87,4
<b>Akkuratesse</b>	86,9	86,3	86,0
<b>Zellgruppe R2</b>			
<b>Sensitivität</b>	63,2	51,5	25,0
<b>Spezifität</b>	90,7	93,1	97,3
<b>PPV</b>	55,1	57,4	63,0
<b>NPV</b>	93,2	91,4	87,8
<b>Akkuratesse</b>	86,5	86,7	86,3
<b>Zellgruppe R3</b>			
<b>Sensitivität</b>	64,7	51,5	25,0
<b>Spezifität</b>	76,9	86,4	95,5
<b>PPV</b>	33,6	40,7	50,0
<b>NPV</b>	92,3	90,8	87,6
<b>Akkuratesse</b>	75,0	81,1	84,7

Tabelle 3; Sensitivität, Spezifität, PPV (positiver prädiktiver Wert), NPV (negativer prädiktiver Wert) und Akkuratesse der Zellgruppen G1-G3 und R1-R3 bei den 'cut off'-Werten von 0, 3 und 5 (in %)



### 3.2.2 Vergleich der Sensitivität und der Spezifität für die einzelnen Zellgruppen bei ihrem jeweiligen ‚best cut off‘-Wert

Bei Zellgruppe G2 lag der ‚best cut off‘-Wert bei  $\geq 2$  Zellen. Die ‚best cut off‘-Werte aller anderen Zellgruppen lagen bei  $\geq 3$  Zellen (Abbildung 17).

Der höchste Wert für die AUC wurde mit 0,77 bei der Zellgruppe R2 mit dem ‚best cut off‘ von  $\geq 3$  Zellen bestimmt. Bei den grünen Zellen lag der höchste Wert mit 0,70 bei Zellgruppe G2 und dem ‚best cut off‘ von  $\geq 2$  vor (Abbildung 17).

Bei Betrachtung der roten Zellen (Zellgruppen R1-R3) wurden insgesamt höhere Spezifität-Werte errechnet als bei Betrachtung der grünen Zellen (Zellgruppen G1-G3). Die Werte für die Sensitivität lagen in einem ähnlichen Bereich (Abbildung 17)

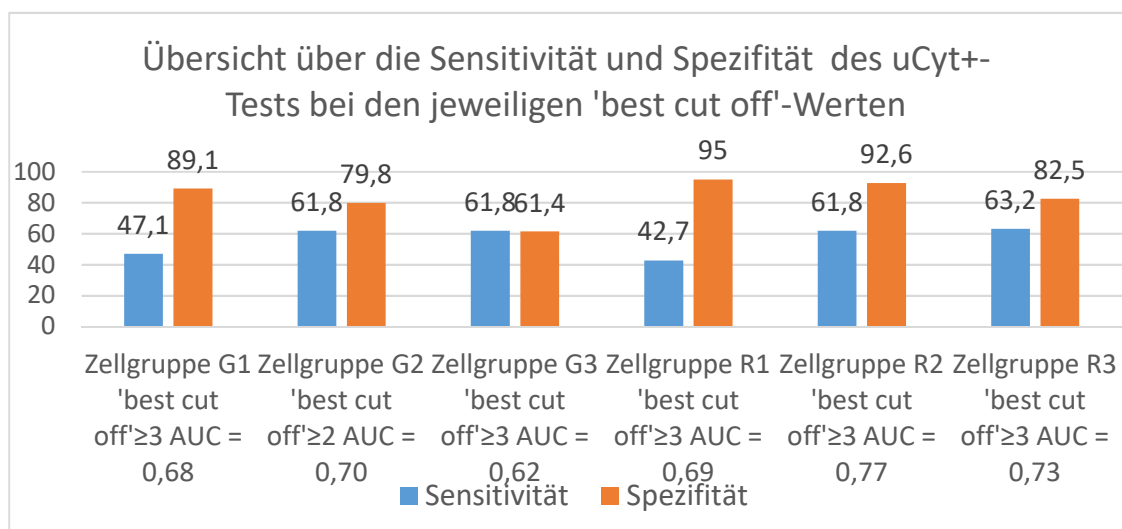


Abbildung 17; Übersicht über die mittels der ROC-Kurve bei dem jeweiligen ‚best cut off‘-Wert ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten (in %), sowie die AUC-Werte des uCyt+-Tests bei Wertung der verschiedenen Zellgruppen G1-G3 und R1-R3

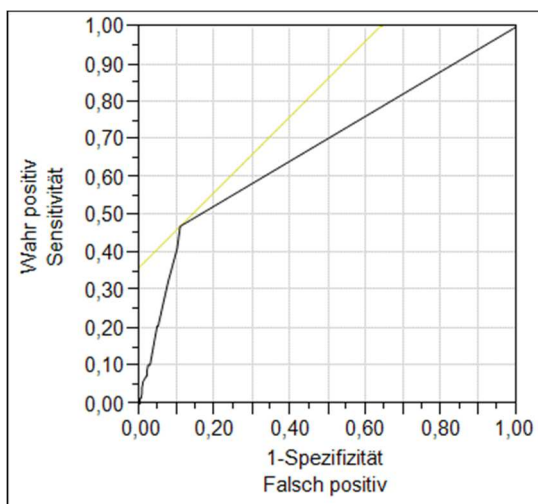


Abbildung 18; ROC-Kurve bei Betrachtung der **Zellgruppe G1**; 'best cut off'-Wert bei  $\geq 3$  Zellen  $\rightarrow$  Sensitivität = 47,1%, Spezifität = 89,1%; AUC = 0,67966

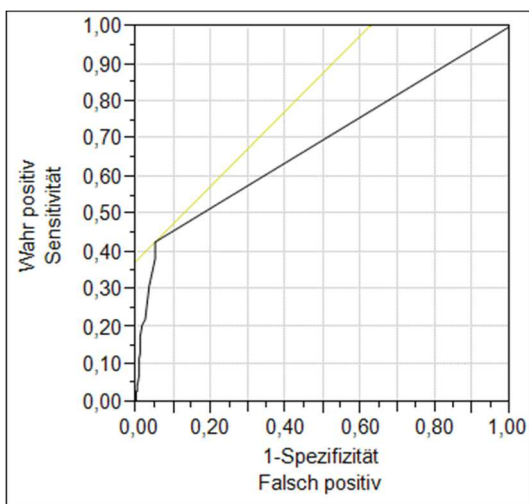


Abbildung 19; ROC-Kurve bei Betrachtung der **Zellgruppe R1**; 'best cut off'-Wert bei  $\geq 3$  Zellen  $\rightarrow$  Sensitivität = 42,7%, Spezifität = 95%; AUC = 0,688972

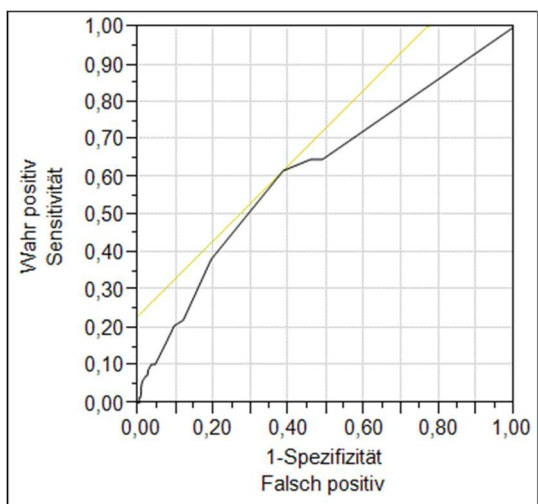


Abbildung 20; ROC-Kurve bei Betrachtung der **Zellgruppe G2**; 'best cut off'-Wert bei  $\geq 2$  Zellen  $\rightarrow$  Sensitivität = 61,8%, Spezifität = 79,8%; AUC = 0,70444

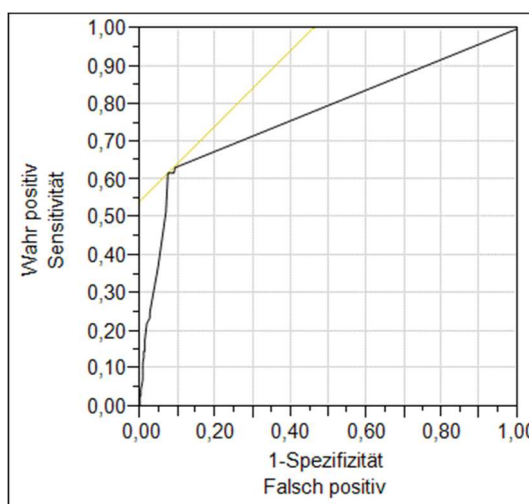


Abbildung 21; ROC-Kurve bei Betrachtung der **Zellgruppe R2**; 'best cut off'-Wert bei  $\geq 3$  Zellen  $\rightarrow$  Sensitivität = 61,8%, Spezifität = 92,6%; AUC = 0,77468

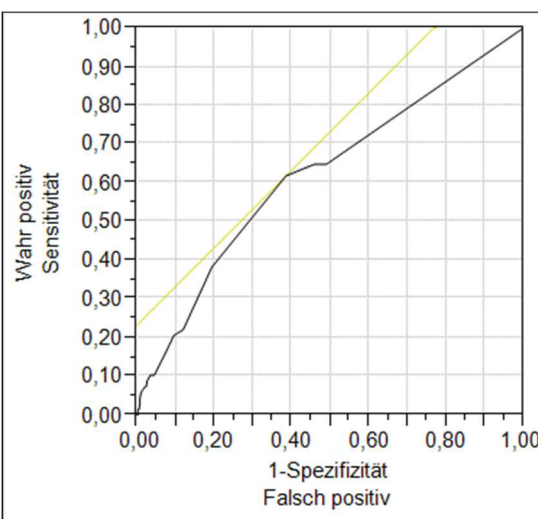


Abbildung 22; ROC-Kurve bei Betrachtung der **Zellgruppe G3**; 'best cut off'-Wert bei  $\geq 3$  Zellen  $\rightarrow$  Sensitivität = 61,8%, Spezifität = 61,4%; AUC = 0,62087

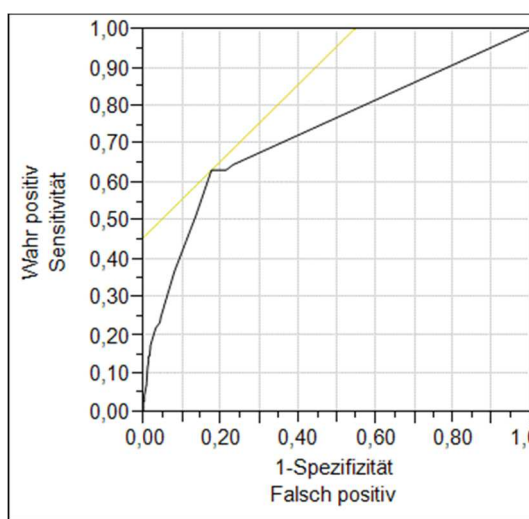


Abbildung 23; ROC-Kurve bei Betrachtung der **Zellgruppe R3**; 'best cut off'-Wert bei  $\geq 3$  Zellen  $\rightarrow$  Sensitivität = 63,2%, Spezifität = 82,5%; AUC = 0,73414

### 3.2.3 Vergleich der diagnostischen Testwertigkeit bei gemeinsamer Betrachtung der roten und grünen Zellen bei variierenden ‚cut off‘-Werten

Häufigkeiten bei dem jeweiligen ‚cut off‘-Wert	Kein Tumor	Tumor	Gesamt
<b>Zellgruppen G1 + R1</b>			
<b>Zellgruppen G1 + R1 = 0</b>	n=335 (75,5%)	n=26 (5,9%)	n=361 (81,3%)
<b>Zellgruppen G1 + R1 ≤ 3</b>	n=337 (75,9%)	n=29 (6,5%)	n=366 (82,4%)
<b>Zellgruppen G1 + R1 ≤ 5</b>	n=352 (79,3%)	n=43 (9,7%)	n=395 (89%)
<b>Zellgruppe G1 ∧ R1 &gt; 0</b>	n=41 (9,2%)	n=42 (9,5%)	n=83 (18,7%)
<b>Zellgruppe G1 ∧ R1 &gt; 3</b>	n=39 (8,8%)	n=39 (8,8%)	n=78 (17,6%)
<b>Zellgruppe G1 ∧ R1 &gt; 5</b>	n=24 (5,4%)	n=25 (5,6%)	n=49 (11%)
<b>Zellgruppen G2 + R2</b>			
<b>Zellgruppen G2 + R2 = 0</b>	n=296 (66,7%)	n=9 (2%)	n=305 (68,7%)
<b>Zellgruppen G2 + R2 ≤ 3</b>	n=306 (68,9%)	n=16 (3,6%)	n=322 (72,5%)
<b>Zellgruppen G2 + R2 ≤ 5</b>	n=337 (75,9%)	n=40 (9%)	n=377 (84,9%)
<b>Zellgruppe G2 ∧ R2 &gt; 0</b>	n=80 (18%)	n=59 (13,3%)	n=139 (31,3%)
<b>Zellgruppe G2 ∧ R2 &gt; 3</b>	n=70 (15,8%)	n=52 (11,7%)	n=122 (27,5%)
<b>Zellgruppe G2 ∧ R2 &gt; 5</b>	n=39 (8,8%)	n=28 (6,3%)	n=67 (15,1%)
<b>Zellgruppen G3 + R3</b>			
<b>Zellgruppen G3 + R3 = 0</b>	n=162 (36,5%)	n=6 (1,4%)	n=168 (37,8%)
<b>Zellgruppen G3 + R3 ≤ 3</b>	n=235 (52,9%)	n=14 (3,2%)	n=249 (56,1%)
<b>Zellgruppen G3 + R3 ≤ 5</b>	n=320 (72,1%)	n=40 (9%)	n=360 (81,1%)
<b>Zellgruppe G3 ∧ R3 &gt; 0</b>	n=214 (48,2%)	n=62 (14%)	n=276 (62,2%)
<b>Zellgruppe G3 ∧ R3 &gt; 3</b>	n=141 (31,8%)	n=54 (12,2%)	n=195 (43,9%)
<b>Zellgruppe G3 ∧ R3 &gt; 5</b>	n=56 (12,6%)	n=28 (6,3%)	n=84 (18,9%)
	n=376 (84,7%)	n=68 (15,3%)	n=444

Tabelle 4; Kontingenztabelle der Zellgruppen G1 + R1, G2 + R2 und G3 + R3 und der Patienten mit oder ohne Tumor bei variierenden ‚cut off‘-Werten

Weiterhin wurden jeweils die grünen und roten Zellen gemeinsam betrachtet. Die Wertung der Zellgruppen G2 + R2 bei dem ‚cut off‘-Wert von 0 entsprach den Kriterien, die das in der Patientenakte dokumentierte Ergebnis des Tests bestimmten (siehe Tabelle 1 und Tabelle 4).

Bei Betrachtung der Zellgruppen G1 + R1 zeigten sich ähnlich viele richtig- und falsch-positive uCyt+-Ergebnisse. Bei Betrachtung der Zellgruppen G2 + R2 bzw. G3 + R3 erhöhte sich vor allem die Anzahl der falsch-positiven uCyt+-Ergebnisse (9,2% (G1+R1) auf 18% (G2+R2) und 48,2% (G3+R3) bei ‚cut off‘ >0). Dieser

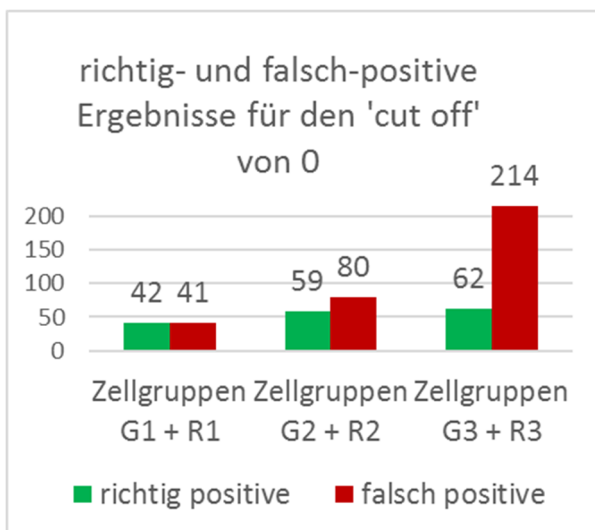


Abbildung 24; Vergleich der richtig- und falsch-positiven Ergebnisse für den 'cut off' von 0 bei gemeinsamer Wertung der roten und grünen Zellen

Zuwachs stellt sich vor allem bei Hinzunahme der unterschwelligen grünen und roten Zellen dar (beispielhaft in Abbildung 24). Bei Wertung der Zellgruppe G3 + R3 konnte zudem ein starker Abfall der richtig-negativen Ergebnisse im Vergleich zur Wertung der anderen Zellgruppen beobachtet werden (75,5% (G1+R1) auf 66,7% (G2+R2) und 36,5% (G3+R3) bei ‚cut off‘ >0) (Tabelle 4).

### 3.2.3.1 Vergleich der Sensitivität und der Spezifität für die einzelnen Fluoreszenzausprägungen bei den unterschiedlichen ‚cut off‘-Werten

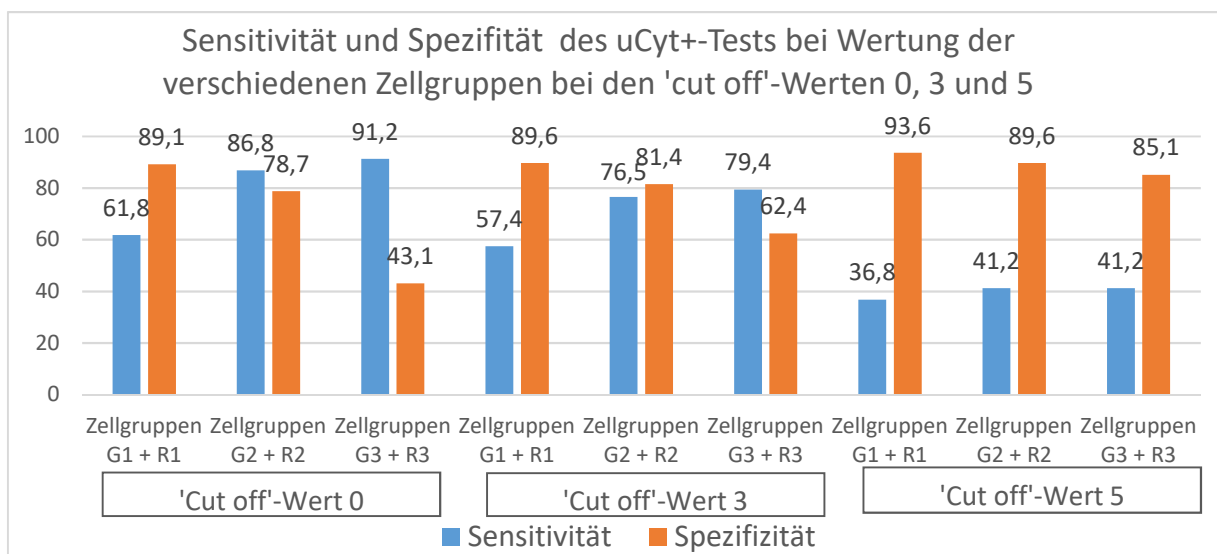


Abbildung 25; Werte für die Sensitivität und die Spezifität (in %) des uCyt+-Tests bei Wertung der verschiedenen Zellgruppen G1 + R1, G2 + R2 und G3 + R3 bei den 'cut off'-Werten von 0, 3 und 5

	,Cut off' bei 0	,Cut off' bei 3	,Cut off' bei 5
<b>Zellgruppen G1 + R1</b>			
<b>Sensitivität</b>	61,8	57,4	36,8
<b>Spezifität</b>	89,1	89,6	93,6
<b>PPV</b>	50,6	50,0	51,0
<b>NPV</b>	92,8	92,1	89,1
<b>Akkuratesse</b>	84,9	84,7	84,9
<b>Zellgruppen G2 + R2</b>			
<b>Sensitivität</b>	86,8	76,5	41,2
<b>Spezifität</b>	78,7	81,4	89,6
<b>PPV</b>	42,5	42,6	41,8
<b>NPV</b>	97,1	95,0	89,4
<b>Akkuratesse</b>	80,0	80,6	82,2
<b>Zellgruppen G3 + R3</b>			
<b>Sensitivität</b>	91,2	79,4	41,2
<b>Spezifität</b>	43,1	62,5	85,1
<b>PPV</b>	22,5	27,7	33,3
<b>NPV</b>	96,4	94,4	88,9
<b>Akkuratesse</b>	50,5	65,1	78,4

*Tabelle 5: Werte für die Sensitivität, die Spezifität, den positiven und den negativen prädiktiven Wert (PPV und NPV) und die Akkuratesses für die Zellgruppen G1 + R1, G2 + R2 und G3 + R3 bei variierenden 'cut off'-Werten (in %)*

In Tabelle 5 wird sichtbar, dass auch bei gemeinsamer Betrachtung der grünen (G1-G3) und roten Zellen (R1-R3) die Steigerung des ,cut off'-Wertes bei jeder der betrachteten Zellgruppen mit einem Anstieg der Spezifität und einem Abfall der Sensitivität einhergeht. Besonders deutlich stellt sich dies bei Erhöhung des ,cut off'-Wertes von 3 auf 5 Zellen dar (Tabelle 5 und Abbildung 25).

Die höchste Akkuratesses (84,9%) liegt bei Betrachtung der Zellgruppen G1 + R1 und dem ,cut off'-Wert >0 (Sensitivität 61,8%, Spezifität 89,1%) (Tabelle 5 und Abbildung 25).

### 3.3 Einfluss der Tumor-Histopathologie auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen

Zur Auswertung des Einflusses der Tumor-Histopathologie auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen entstand ein neues Kollektiv. Dieses bestand aus den 67 Patienten, bei denen durch die Zystoskopie und durch die Histologie im Falle einer Gewebsentnahme ein Tumor nachgewiesen werden konnte und bei denen die Informationen über das Tumorstadium und den Tumorgrad in den Akten dokumentiert waren.

#### 3.3.1 Vergleich der Zellanzahl in Abhängigkeit des jeweils vorhandenen Tumorstadiums

Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der Anzahl der fluoreszierenden Zellen von dem vorhandenen Tumorstadium wurden die Zellgruppen getrennt voneinander betrachtet.

	Zell- gruppe G1	Zell- gruppe G2	Zell- gruppe G3	Zell- gruppe R1	Zell- gruppe R2	Zell- gruppe R3
<b>Stadium Ta</b>	0 (0-5)	4 (0-5)	4 (0-5)	0 (0-5)	3 (0-5)	3 (0-3)
<b>Stadium T1</b>	3 (0-6,5)	3 (0-6,5)	3 (0-6,5)	5 (0-12,5)	5 (0-12,5)	5 (1,5-12,5)
<b>Stadium T2a</b>	0 (0-3,25)	3,5 (1,5-4,25)	3,5 (1,5-4,25)	0 (0-0)	1,5 (0-5,25)	1,5 (0-5,25)
<b>Stadium T2b</b>	1,5 (0-8,25)	1,5 (0-8,25)	1,5 (0-8,5)	0 (0-0)	1,5 (0-3,75)	1,5 (0-3,75)
<b>Stadium T3a</b>	16 (16-16)	16 (16-16)	16 (16-16)	18 (18-18)	18 (18-18)	18 (18-18)
<b>p-Wert</b>	0,4085	0,5686	0,5151	<b>0,0267</b>	0,2909	0,2279

Tabelle 6; Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte für die grünen und roten Zellen bei Betrachtung der jeweiligen Tumorstadien im Kollektiv der Patienten mit Tumor

Betrachtet man die Zellgruppe R1 konnte festgestellt werden, dass weder bei Tumoren im Stadium T2a, noch bei denen im T2b definitiv positive rote Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in den Urinproben sichtbar gewesen waren. Die meisten fluoreszierenden Zellen wurden bei Tumoren im T1-Stadium gefunden. Mit dem p-Wert von 0,0267 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl definitiv positiver roter Zellen (R1) in Abhängigkeit des T-Stadiums beobachtet. Wurden die Borderline-Zellen (R2) ebenfalls betrachtet, konnten auch bei den Tumorstadien T2a und T2b rot fluoreszierende Zellen festgestellt werden (Abbildung 26 und Abbildung 27).

Bei Wertung der Zellgruppe G2 lagen in den Stadien Ta und T2a mehr fluoreszierenden Zellen vor, als bei Wertung der Zellgruppe G1 (Medianwerte erhöhten sich). Die Unterschiede bei den Zellgruppen G1-G3, R2 und R3 erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Wie in Tabelle 6 sichtbar, lagen die höchsten Medianwerte mit 16 grünen Zellen (IQR 16-16) und 18 roten Zellen (IQR 10-18) für das Tumorstadium T3a vor. Diese Ergebnisse mussten jedoch wegen des zu kleinen Kollektivs (nur ein Patient) mit diesem fortgeschrittenen Stadium als Ausreißer gewertet werden (Tabelle 6).

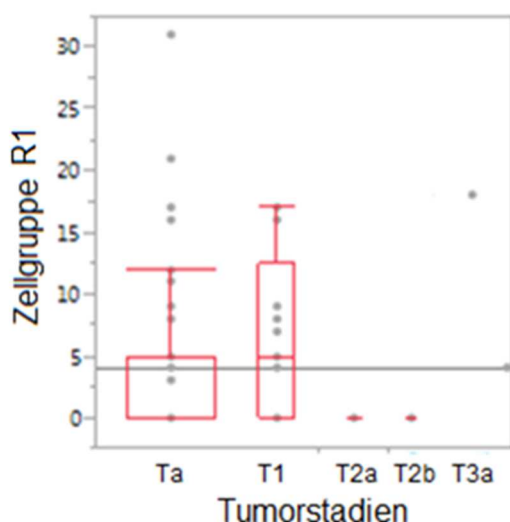


Abbildung 26; Boxplot der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen (Zellgruppe R1) in Bezug auf die Tumorstadien im Kollektiv der Patienten mit Tumor; **p-Wert = 0,0267**

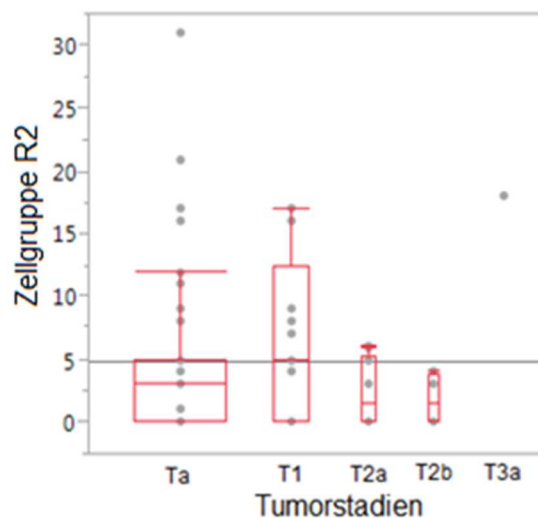


Abbildung 27; Boxplot der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen und roten Borderline-Zellen (Zellgruppe R2) in Bezug auf die Tumorstadien im Kollektiv der Patienten mit Tumor; **p-Wert = 0,2909**

### 3.3.2 Einfluss der Tumor-Invasivität auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen

Zur Beurteilung des Einflusses der Invasivität eines Harnblasentumors auf die Anzahl der definitiv positiven Zellen, der Borderline-Zellen und der unterschwelligen Zellen wurden die 67 Tumoren, für welche Informationen über das Tumorstadium vorlagen, in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe setzte sich aus allen Patienten zusammen, bei denen ein oberflächliches Tumorstadium (Ta oder T1) nachgewiesen wurde (n=56). Die zweite Gruppe vereinte die Patienten, bei denen muskelfiltrierende Tumoren der Stadien  $\geq T2$  dokumentiert wurden (n=11).

	Zell- gruppe G1	Zell- gruppe G2	Zell- gruppe G3	Zell- gruppe R1	Zell- gruppe R2	Zell- gruppe R3
<b>Stadium <math>\leq T1</math></b>	0 (0-5)	4 (0-5)	4 (0-5)	0 (0-6,5)	4 (0-7,75)	4 (0-7,75)
<b>Stadium <math>\geq T2</math></b>	0 (0-4)	3 (0-5)	3 (0-5)	0 (0-0)	3 (0-5)	3 (0-5)
<b>p-Wert</b>	0,6538	0,9791	0,8282	<b>0,0384</b>	0,3979	0,3661

Tabelle 7; Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte für die jeweiligen Zellgruppen bei Betrachtung der Invasivität der Tumoren im Kollektiv der Patienten mit Tumor

Bei der Analyse der Abhängigkeit der definitiv positiven roten Zellen (R1) von der Invasivität eines Tumors konnte eine statistische Signifikanz erwiesen werden (p-Wert 0,0384). Bis auf einen Ausreißer (Maximalwert = 18), der im Boxplot außerhalb des Whiskers lag, wurden bei Tumoren mit Stadien  $\geq T2$  keine definitiv positiven roten Zellen (R1) gefunden (Tabelle 7 und Abbildung 28).

Die weiteren in Tabelle 7 erkennbaren Unterschiede zeigten keine statistische Signifikanz.

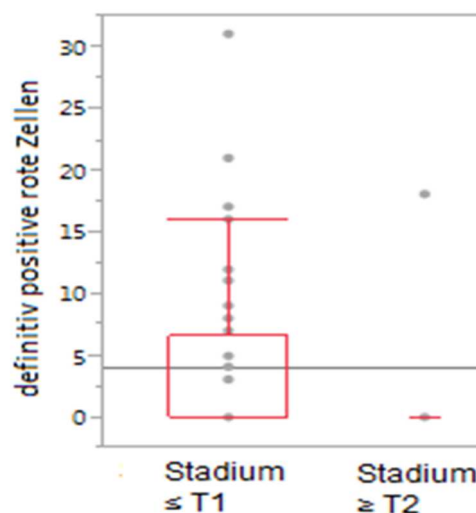


Abbildung 28; Boxplot der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen (Zellgruppe R1) in Bezug auf die Invasivität der Tumore, **p-Wert = 0,0384**



### 3.3.3 Korrelation des Tumorgrades mit der Anzahl der fluoreszierenden Zellen

Bei der Analyse der Tumorgrade fiel auf, dass bei Tumoren mit Differenzierungsgrad 1 und 3 nur wenige definitiv positive grüne und rote Zellen (Zellgruppen G1 und R1) gezählt wurden. Wurden die weiteren Zellgruppen G2, G3, R2 und R3 betrachtet, stiegen die Medianwerte jeweils an. Nur bei den Tumoren mit Differenzierungsgrad 3 blieb die Anzahl der grünen Zellen von der betrachteten Zellgruppe (G1-G3) unbeeinflusst.

Die Anzahl der rot-fluoreszierenden Zellen erhöhte sich mit steigendem Tumorgrad. Grün-fluoreszierende Zellen waren dagegen bei Differenzierungsgrad 1 häufiger zu finden, als bei Differenzierungsgrad 3. Die Unterschiede zeigten jedoch keine statistische Signifikanz (siehe p-Werte in Tabelle 8).

	Zell- gruppe G1	Zell- gruppe G2	Zell- gruppe G3	Zell- gruppe R1	Zell- gruppe R2	Zell- gruppe R3
<b>Tu- mor- grad 1</b>	0 (0-4,5)	4 (0-5,5)	4 (2,5- 5,5)	0 (0-3,5)	3 (0-5)	3 (0-5)
<b>Tu- mor- grad 2</b>	4 (0-5)	4 (0-5)	4 (0-5)	3 (0-7,5)	4 (0-7,5)	4 (0-7,5)
<b>Tu- mor- grad 3</b>	0 (0-5)	0 (0-5)	0 (0-5)	0 (0- 10,5)	4 (0- 10,5)	4 (1,5- 10,5)
<b>p-Wert</b>	0,4549	0,5150	0,3346	0,1263	0,1991	0,1445

Tabelle 8; Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte für die jeweiligen Zellgruppen bei Betrachtung der Tumorgrade 1-3 im Kollektiv der Patienten mit Tumor

### 3.4 Wirkung potenzieller Einflussparameter auf das Testergebnis

Um die möglichen Einflussfaktoren: ‚Alter‘, ‚Geschlecht‘, ‚Rauchgewohnheiten‘, ‚Harnwegsinfekte‘, ‚mechanische Manipulation bei Urinentnahme‘, ‚benigne Prostatahyperplasie oder Prostatakarzinom‘ und ‚Hämaturie-Typ‘ auf das uCyt+-Testergebnis zu untersuchen, wurden 376 Patienten analysiert, bei denen mittels Zystoskopie und histologischem Gutachten kein Tumor der Harnblase nachgewiesen werden konnte.

#### 3.4.1 Einfluss der Rauchgewohnheit auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Die Nichtraucher machten mit 65,7% den Großteil des Gesamtkollektivs aus. Weitere 19,7% zählten zu den früheren Rauchern, während 14% angaben, regelmäßig Nikotin zu konsumieren. Unter den 376 Patienten, die keinen Tumor aufwiesen, konnten bei 26 Untersuchten in den Dokumenten keine Angaben zu ihrem Rauchverhalten gefunden werden. So entstand ein neues Kollektiv von 350 Patienten.

<b>Einfluss von Nikotin</b>	<b>Zellgruppe G2</b>	<b>Zellgruppe G3</b>	<b>Zellgruppe R2</b>	<b>Zellgruppe R3</b>
<b>Raucher</b>	1,33 0 (0-0)	2,31 0 (0-4)	0,43 0 (0-0)	0,81 0 (0-0)
<b>Nichtraucher</b>	1,53 0 (0-0)	2,57 0 (0-4)	0,66 0 (0-0)	1,26 0 (0-1)
<b>Frühere Raucher</b>	1,32 0 (0-0)	2,44 2 (0-4)	0,25 0 (0-0)	0,76 0 (0-0)
<b>p-Wert</b>	0,8978	0,9043	0,3654	0,2897

*Tabelle 9; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten*

Es konnte kein statistisch signifikanter Einfluss des Nikotins auf die Anzahl der roten oder grünen falsch-positiv fluoreszierenden Zellen gefunden werden. Durchschnittlich lagen bei den Nichtrauchern die meisten falsch-positiv fluoreszierenden Zellen vor. Bei Mitbewertung der unterschwelligen Zellen (G3 bzw. R3) stieg die falsch-positiv fluoreszierende Rate an (siehe Tabelle 9).

### 3.4.2 Einfluss einer vorliegenden Makro- oder Mikrohämaturie auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Bei 79,7% des Gesamtkollektivs wurde eine Mikrohämaturie und bei den restlichen 20,3% eine Makrohämaturie nachgewiesen. Bei allen 376 tumorfreien Patienten lagen Informationen über den Hämaturie-Typ vor.

<b>Einfluss des Hämaturie-Typs</b>	<b>Zellgruppe G2</b>	<b>Zellgruppe G3</b>	<b>Zellgruppe R2</b>	<b>Zellgruppe R3</b>
<b>Mikrohämaturie</b>	1,28 0 (0-0)	2,26 0 (0-4)	0,52 0 (0-0)	1,13 0 (0-0)
<b>Makrohämaturie</b>	1,92 0 (0-2,5)	3,08 2 (0-4,5)	0,60 0 (0-0)	0,85 0 (0-0)
<b>p-Wert</b>	0,1726	0,0888	0,7804	0,4128

Tabelle 10; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Hämaturie-Typs

Es konnte kein statistisch signifikanter Einfluss einer Hämaturie auf die Anzahl der roten oder grünen falsch-positiv fluoreszierenden Zellen gefunden werden. Im Durchschnitt lagen mehr falsch-positiv fluoreszierende grüne Zellen vor, als rote. Der Vergleich der Hämaturiestärken zeigte, dass bei den Patienten mit Makrohämaturie bei Betrachtung der Zellgruppen G2, G3 und R2 durchschnittlich mehr grüne falsch-fluoreszierende Zellen gefunden wurde, als bei den Patienten mit Mikrohämaturie. Bei Hinzunahme der unterschwelligen Zellen (G3 bzw. R3) stieg die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen an (Tabelle 10).

### 3.4.3 Einfluss mechanischer Manipulation bei der Uringewinnung auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Bei 20,5% der 444 Patienten des Gesamtkollektivs wurde der Urin mittels nicht-invasiver Methoden entnommen. Invasive Methoden kamen bei den restlichen 79,5% des Gesamtkollektivs zum Einsatz.

Einfluss mechanische Manipulation	Zellgruppe G2	Zellgruppe G3	Zellgruppe R2	Zellgruppe R3
<b>Nicht invasiv</b>	0,78 0 (0-0)	1,20 0 (0-2)	0,41 0 (0-0)	0,58 0 (0-0)
<b>invasiv</b>	1,59 0 (0-0)	2,78 2 (0-4)	0,60 0 (0-0)	1,22 0 (0-1)
<b>p-Wert</b>	0,0677	<b>0,0005</b>	0,5129	<b>0,0447</b>

Tabelle 11; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit der angewendeten Urinentnahme-Methode

Wie in Tabelle 11 sichtbar, zeigte sich erst bei Mitbetrachtung der unterschwelligen Zellen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen invasiv und nicht invasiv entnommenem Urin. Die Anzahl der roten und grünen falsch-fluoreszierenden Zellen lag jeweils in den Urinproben höher, die invasiv gewonnen wurden und somit mechanisch manipuliert wurden (siehe Tabelle 11 und Abbildung 29).

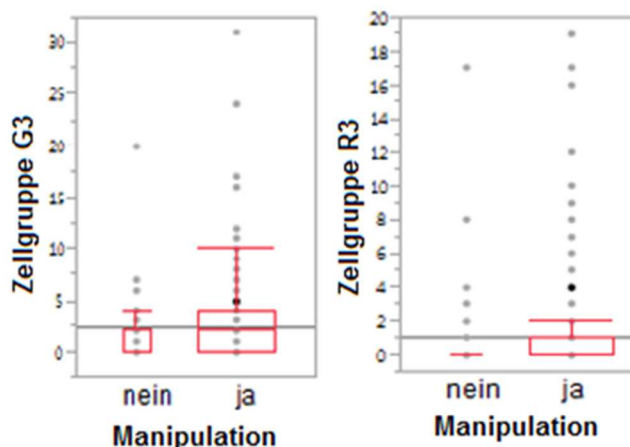


Abbildung 29; Boxplot der Zellanzahl der Zellgruppen G3 (**p-Wert = 0,0005**) und R3 (**p-Wert = 0,0447**) für den Einfluss der mechanischen Manipulation im Kollektiv der Patienten ohne Tumor

### 3.4.4 Einfluss von Harnwegsinfekten auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Aus dem Gesamtkollektiv wiesen 81,1% keinen Harnwegsinfekt (HWI) auf, während 18,9% der Patienten an einem solchen erkrankt waren.

<b>Einfluss eines HWI</b>	<b>Zellgruppe G2</b>	<b>Zellgruppe G3</b>	<b>Zellgruppe R2</b>	<b>Zellgruppe R3</b>
<b>Kein HWI</b>	1,50 0 (0-0)	2,53 0 (0-4)	0,59 0 (0-0)	1,19 0 (0-0)
<b>HWI</b>	0,96 0 (0-0)	1,96 0 (0-4)	0,31 0 (0-0)	0,58 0 (0-0)
<b>p-Wert</b>	0,2492	0,2430	0,3155	0,0732

*Tabelle 12; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Harnwegsinfekts (HWI)*

Ein statistisch signifikanter Unterschied abhängig von dem Vorhandensein eines HWIs konnte weder bei den grünen Zellen (G2-G3), noch bei den roten Zellen (R2-R3) festgestellt werden (p-Werte siehe Tabelle 12). Durchschnittlich wurden bei Patienten ohne HWI mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen gefunden, als bei Patienten mit HWI (Tabelle 12).

### 3.4.5 Einfluss einer vorhandenen benignen Prostatahyperplasie oder eines Prostatakarzinoms auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Das Ziel dieser Untersuchung war es, zu überprüfen, ob die falsch-positive Zellanzahl bei den durchgeführten uCyt+-Tests der blasentumorfreen Patienten von einem vorhandenen Prostataumor (PC; 7,2% des Gesamtkollektivs) oder einer benignen Prostatahyperplasie (BPH; 32% des Gesamtkollektivs) beeinflusst wurde.

Dazu wurde das Kollektiv der Patienten ohne Tumor (n=376) in drei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 besaß keine der beiden oben genannten Erkrankungen (n=208), die Patienten der Gruppe 2 litten an einer benignen Prostatahyperplasie (n=137) und die der dritten Gruppe waren an einem Prostatakarzinom erkrankt (n=31).

Einfluss von BPH und PC	Zellgruppe G2	Zellgruppe G3	Zellgruppe R2	Zellgruppe R3
Kein BPH oder PC	1,08 0 (0-0)	1,20 0 (0-4)	0,53 0 (0-0)	1,02 0 (0-0)
BPH	1,71 0 (0-0)	2,88 1 (0-4)	0,50 0 (0-0)	1,11 0 (0-1)
PC	2,23 0 (0-4)	3,32 2 (0-5)	0,74 0 (0-0)	1,23 0 (0-2)
p-Wert	0,1157	<b>0,0311</b>	0,8541	0,9005

Tabelle 13; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) oder eines Prostatakarzinoms (PC)

Wie in Tabelle 13 sichtbar, hatte das Vorhandensein einer BPH oder eines PCs einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen der Zellgruppe G3 (p-Wert = 0,0311). Durchschnittlich wurden mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen bei Patienten mit BPH oder PC gefunden, als bei Patienten ohne eine der beiden Erkrankungen (Tabelle 13 und Abbildung 30).

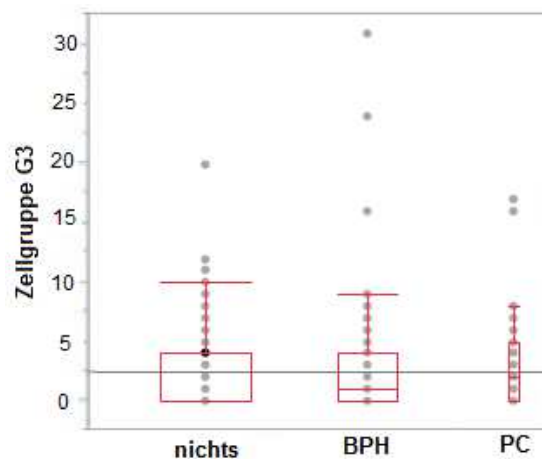


Abbildung 30; Boxplot der Zellanzahl der Zellgruppen G3 (p-Wert = 0,0311) in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) oder eines Prostatakarzinoms (PC) im Kollektiv der Patienten ohne Tumor

### 3.4.6 Einfluss des Geschlechts auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Wie bereits unter 3.1.1 erläutert, beinhaltete unser Kollektiv deutlich mehr männliche als weibliche Probanden. Auch in dem Kollektiv aller Patienten ohne Tumornachweis dominierte das männliche Geschlecht mit 322 (85,6%) gegenüber 54 (14,5%) weiblichen Patienten.

Einfluss des Geschlechts	Zellgruppe G2	Zellgruppe G3	Zellgruppe R2	Zellgruppe R3
<b>Männlich</b>	1,56 0 (0-0)	2,61 1 (0-4)	0,59 0 (0-0)	1,18 0 (0-1)
<b>Weiblich</b>	0,37 0 (0-0)	1,31 0 (0-2)	0,22 0 (0-0)	0,41 0 (0-0)
<b>p-Wert</b>	<b>0,0227</b>	<b>0,0175</b>	0,2393	<b>0,0408</b>

Tabelle 14; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Geschlechts

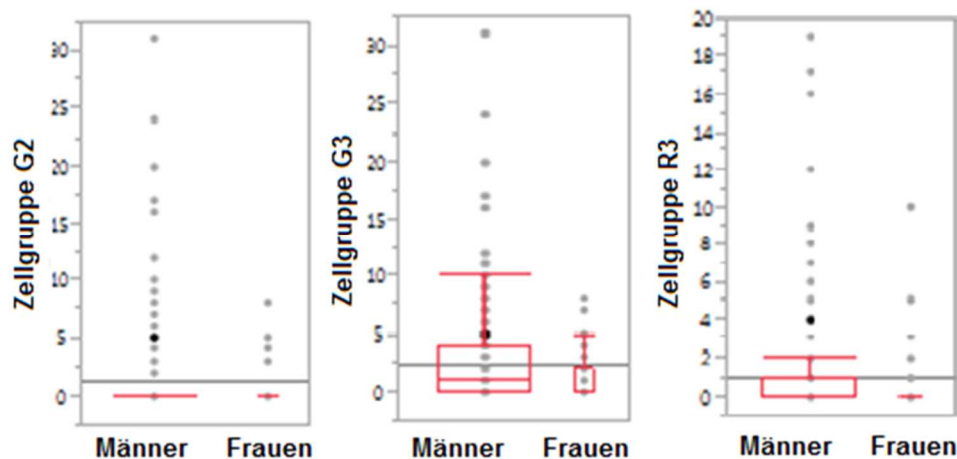


Abbildung 31; Boxplot der Zellanzahl der Zellgruppen G2 (**p-Wert = 0,0227**), G3 (**p-Wert = 0,0175**) und R3 (**p-Wert = 0,0408**) für Männer und Frauen im Kollektiv der Patienten ohne Tumor

Bei Betrachtung der Zellgruppen G2, G3 und R3 wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen der falsch-positiv fluoreszierenden Zellanzahl der beiden Geschlechter erkannt (p-Werte 0,0227, 0,0175 und 0,0408). Bei den Männern

lagen durchschnittlich mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen vor, als bei den Frauen (siehe Abbildung 31 und Tabelle 14).

### 3.4.7 Einfluss des Alters auf die Zellanzahl der Patienten ohne Tumornachweis

Einfluss des Alters	Zellgruppe G2	Zellgruppe G3	Zellgruppe R2	Zellgruppe R3
R <sup>2</sup>	9,5 x10 <sup>-5</sup>	6,5 x10 <sup>-4</sup>	1,6 x10 <sup>-3</sup>	4,5 x10 <sup>-5</sup>
p-Wert	0,8503	0,6231	0,4431	0,8963

Tabelle 15; Determinationskoeffizient R<sup>2</sup> und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Alters

Die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen zeigten keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Alter. Bei allen Zellgruppen lagen die Werte für R<sup>2</sup> weit unter dem Wert 1 (Tabelle 15).

### 3.5 Betrachtung der positiven uCyt+-Ergebnisse unter den Patienten mit falsch-negativem Zytologie-Ergebnis

Ziel dieser Untersuchung war es, zu erfassen, wie viele Tumoren, die durch die Zytologie nicht erkannt wurden, bei der Durchführung des uCyt+-Tests auffindig gemacht werden konnten. Bei einem Patienten waren nicht alle erforderlichen Daten dokumentiert, daher musste dieser von der Analyse ausgeschlossen werden.

Das Kollektiv wurde dazu erneut in zwei Gruppen geteilt. Zur ersten Gruppe (96,1%; n=426) gehörten alle Patienten, die keinen Blasentumor hatten oder ein positives Zytologie-Ergebnis vorwiesen. Der zweiten Gruppe (3,8%; n=17) gehörten die Patienten an, bei denen durch die Zystoskopie ein Harnblasenkarzinom diagnostiziert wurde und bei denen gleichzeitig das Zytologie-Ergebnis negativ ausgefallen war (falsch negatives Zytologie-Resultat).



Häufigkeiten Gesamt % Spalte % Zeile %	Gruppe 1	Gruppe 2	
<b>uCyt+ negativ</b> Zellgruppe G2 + R2 = 0	298 67,27 69,95 98,03	<b>6</b> 1,35 35,29 1,97	304 68,6 2
<b>uCyt+ positiv</b> Zellgruppe G3 + R3 > 0	128 28,89 30,05 92,09	<b>11</b> 2,48 64,71 7,91	139 31,3 8
	426 96,16	<b>17</b> 3,84	443

Häufigkeiten Gesamt % Spalte % Zeile %	Gruppe 1	Gruppe 2	
<b>uCyt+ negativ</b> Zellgruppe G3 + R3 = 0	164 37,02 38,50 98,20	<b>3</b> 0,68 17,65 1,80	167 37,7
<b>uCyt+ positiv</b> Zellgruppe G3 + R3 > 0	262 59,14 61,50 94,93	<b>14</b> 3,16 82,35 5,07	276 62,3
	426 96,16	<b>17</b> 3,84	443

Tabelle 16; Darstellung der Kontingenz des uCyt+-Ergebnisses und der Gruppen 1 + 2 (Gruppe 1: Tumornegativ oder Zytologie positiv; Gruppe 2: Tumorpositiv und Zytologie negativ) links bei Wertung der Zellgruppen G2 + R2 und rechts bei Wertung der Zellgruppen G3 + R3

In der Kontingenztabelle (Tabelle 16 links) ist erkennbar, dass bei Wertung der Zellgruppen G2 und R2 bei 11 der 139 positiven uCyt+ Ergebnisse ein falsch-negatives Zytologie-Ergebnis vorlag. Durch den uCyt+-Test konnten demnach 64,7% der 17 Tumore aufgespürt werden, die durch die Zytologie nicht erkannt wurden. Sechs Tumore wären auch durch den uCyt+-Test nicht bemerkt worden. Tabelle 16 (rechts) zeigt, dass bei Hinzunahme der unterschwelligeren Zellen bei 14 der 276 positiven uCyt+ Ergebnisse ein falsch-negatives Zytologie-Ergebnis vorlag. Durch den uCyt+-Test konnten in diesem Fall demnach 82,4% der 17 Tumore aufgespürt werden, die durch die Zytologie nicht ermittelt wurden. Drei Tumore wären auch durch den uCyt+-Test nicht bemerkt worden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stellenwert des uCyt+-Tests in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Für eine erfolgreiche Therapie des Harnblasenkarzinoms und eine bessere Prognose ist eine frühe Diagnose von Ersttumoren und Rezidiven sowie das Verhindern des Fortschreitens oder der Metastasierung essenziell. Bisher gilt die invasive Zystoskopie mit anschließendem histologischem Gutachten des entnommenen Präparates als Standardmethode zur Diagnostik von Blasentumoren. Mit dieser Methode können Carcinoma in situ jedoch nur eingeschränkt diagnostiziert werden (Babjuk et al., 2011). Die oft zusätzlich angewendete Zytologie weist zwar eine hohe Spezifität auf, aufgrund der zytologisch ähnlichen Architektur zu gesunden Urothelzellen jedoch auch erhebliche Schwächen in der Diagnostik gut differenzierter Tumore (Fradet and Lockhard, 1997). In der Literatur wurden für die Zytologie teils sehr geringe Sensitivitätswerte von 5 oder 8% bei Differenzierungsgrad 1 gefunden (Lodde et al., 2003, Comploj et al., 2013). Um die in der Zystoskopie noch nicht sichtbaren Tumore (v.a. Cis) auffindig zu machen (Lodde et al., 2003), die Sensitivität der Zytologie und die Detektion von Low-Grade-Tumoren zu erhöhen (Comploj et al., 2013) und um die Nachsorge von Patienten mit Tumorgeschichte zu optimieren, wird intensiv nach alternativen Diagnosemethoden geforscht (Toma et al., 2004).

Die Nutzung des uCyt+-Tests ist durch seine hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen und die damit verbundene geringe Spezifität umstritten und bisher noch eingeschränkt. In der Literatur wurden Werte zwischen 63 – 79,4% für die Spezifität und 76 – 86,1% für die Sensitivität errechnet (Sullivan et al., 2009, Toma et al., 2004, Mian et al., 1999). Die in unserem Patientenkollektiv gefundenen Werte für die Spezifität (78,7%) und die Sensitivität (86,8%) befinden sich in einem ähnlichen Bereich. Cha et al. fanden jedoch sehr hohe Spezifitäts- und Sensitivitätswerte von 86,6% und 82,4% und schrieben einem positiven uCyt+-Test eine hohe Vorhersagegenauigkeit für ein Harnblasenkarzinom zu (Cha et

al., 2012). Aufgrund der häufig eher geringen Spezifität und seiner untersucherabhängigen Auswertung ist er bisher jedoch nicht als Standarddiagnostikmethode etabliert (Vriesema et al., 2001).

Allerdings ergab die Kombination des uCyt+-Tests mit anderen Diagnostikmethoden gute Ergebnisse. In einer Studie fanden Schmitz-Dräger et al. bei der Kombination des uCyt+-Tests mit der Zystoskopie bei Patienten mit schmerzloser Makrohämaturie eine Sensitivität von 100%, weswegen der Test von den Autoren als zusätzliches Diagnostikmittel empfohlen wird (Schmitz-Dräger et al., 2010). Auch die Kombination des uCyt+-Tests mit der Zytologie ergab in der Literatur gesteigerte Sensitivitätswerte von 59 – 85,7% für Tumorgrad 1 und 83,3 – 100% für Tumorgrad 3 (Comploj et al., 2013, Toma et al., 2004, Lodde et al., 2003, Mian et al., 1999).

Ein großes Problem stellt noch immer die aufgrund der hohen Rezidivrate lebenslang notwendige Nachsorge der BC-Patienten dar (Kamat et al., 2013). Das klassische Follow-up Programm sieht Zystoskopien alle 3-12 Monate vor (Comploj et al., 2013). Frühere Studien erkannten im uCyt+-Test (bestenfalls in Kombination mit der Zytologie) aufgrund der hohen Sensitivität bei der Detektion von Low-Grade-Tumoren und des hohen NPVs das Potential einer geeigneten nicht-invasiven Diagnostikmethode, um Tumorrezidive frühzeitig zu erkennen. Dies könnte die Nachsorge vor allem bei Patienten mit geringem Rezidivrisiko angenehmer und kostengünstiger gestalten (Mian et al., 2006, Messing et al., 2005).

## **4.2 Klinische Aussage des uCyt+-Tests bei Wertung verschiedener Zellgruppen bei variierenden ‚cut off‘-Werten**

### **4.2.1 Einfluss der Erhöhung der ‚cut off‘-Werte**

Insgesamt kann in unserer Studie festgestellt werden, dass bei steigendem ‚cut off‘-Wert die Sensitivität sinkt und die Spezifität steigt. Die Anzahl der negativen Ergebnisse erhöht und die Zahl der positiven Resultate reduziert sich. Am deutlichsten verringert sich die Sensitivität jeweils bei Erhöhung des ‚cut off‘-Levels

von  $\geq 3$  auf  $\geq 5$  Zellen. Dies geht allerdings mit einer erstaunlich hohen Spezifität einher. Diese erklärt die gefundenen hohen Werte für die Akkuratessse bei dem ‚cut off‘-Level von  $\geq 5$  (z.B. G1: 83,6% und R1: 86,0%).

In unserer Studie lag der ‚best cut off‘-Wert für die Zellgruppe G2 bei  $\geq 2$  fluoreszierenden Zellen, für alle anderen Zellgruppen bei  $\geq 3$  fluoreszierenden Zellen.

In einer Studie von Fradet und Lockhart wurde, bei gleichbleibendem ‚cut off‘-Wert der grünen Zellen, der ‚cut off‘-Wert der roten Zellen von  $\geq 1$  auf  $\geq 5$ , dann auf  $\geq 10$  Zellen erhöht und dabei ebenfalls ein Absinken der Sensitivität und eine Steigerung der Spezifität beobachtet. Als ‚best cut off‘-Wert wurden hier eine grüne und eine rote fluoreszierende Zelle gemessen, was dem vom Hersteller empfohlenen ‚cut off‘-Wert entspricht (Fradet and Lockhard, 1997).

Der variierende ‚best cut off‘-Wert der beiden Studien kann durch eine ungenaue Dokumentation der Betrachter entstanden sein. Möglich ist, dass manche Untersucher nach dem Auffinden von einer fluoreszierenden Zelle direkt ein positives Ergebnis eintrugen, ohne nach weiteren Zellen zu suchen, während andere die Anzahl der gesehenen Zellen grob einschätzten oder die genaue Zellanzahl notierten.

Da die Vergleichswerte der Literatur insgesamt dürftig sind, kann erst nach weiteren, genaueren Studien bestimmt werden, ob es sinnvoll wäre, den ‚cut off‘-Wert des uCyt+-Tests, der aktuell bei einer roten oder einer grünen Zelle liegt, zu verändern. Unseren Ergebnissen zufolge könnte das Verhältnis von Spezifität und Sensitivität mit einer Anhebung des ‚cut off‘-Levels auf  $\geq 2$  oder  $\geq 3$  Zellen verbessert werden.

Je nach diagnostischer Fragestellung könnte auch eine Anpassung der Auswertestrategie (Variieren des ‚cut off‘-Levels) eine genauere, auf die Fragestellung abgestimmte Aussage des uCyt+-Tests ermöglichen. In der Rezidiv-Diagnostik ist laut Mian et al. beispielsweise ein hoher NPV hilfreich (Mian et al., 2006). In solchen Fällen kann gegebenenfalls eine Erhöhung des ‚cut off‘-Levels sinnvoll

sein, um bei gesunden Patienten ein BC mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können. Doch auch diese Idee sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.

#### **4.2.2 Einfluss der betrachteten Zellgruppen**

Bei Betrachtung der verschiedenen Zellgruppen kann festgestellt werden, dass die Sensitivität mit Zunahme der betrachteten Zellgruppen (von G1 auf G3 und R1 auf R3) steigt, während die Spezifität sinkt. Eine deutliche Erhöhung der Sensitivität ist vor allem bei Hinzunahme der Borderline-Zellen (G2 und R2) im Vergleich zur alleinigen Betrachtung der definitiv positiven Zellen (G1 und R1) zu beobachten. Zur Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit des uCyt+-Tests ist es unseren Ergebnissen zufolge sinnvoll, eine Urinprobe, in der ausschließlich Borderline-Zellen zu sehen sind, als positiv zu werten. Daraufhin stellt sich die Frage, ob es nötig ist, die Borderline-Zellen so klar von den definitiv positiven Zellen abzugrenzen.

Bei Hinzunahme der unterschwelligen Zellen sinken die Spezifität und der PPV merkbar ab. Es ist also nicht zielführend, die unterschwelligen Zellen, deren Zytoplasma deutlich unter 50% granulierend fluoresziert, als ausschlaggebend für ein positives Testergebnis zu werten.

Werden die grünen und roten Zellen gemeinsam betrachtet, kann eine deutliche Erhöhung der Sensitivität erreicht werden, während die Spezifität leicht sinkt. Insgesamt ist es durch die starke Erhöhung der Sensitivität und die vergleichsweise geringe Reduktion der Spezifität von Vorteil, beide Fluoreszenztypen gemeinsam zu werten. In der bereits erwähnten Studie von Fradet und Lockhart wurden ebenfalls eine höhere Sensitivität und eine geringere Spezifität bei Betrachtung beider Fluoreszenztypen gemeinsam gegenüber der getrennten Betrachtung grüner und roter Zellen ermittelt (Fradet and Lockhart, 1997).

### 4.2.3 Vergleich der diagnostischen Wertigkeit der grünen und roten Zellen

Mittels der ROC-Kurven konnte die beste diagnostische Aussagekraft in unserer Studie bei Zellgruppe R2 ermittelt werden, da hier der höchste Wert für die AUC (0,77) vorliegt.

Die Spezifität und der PPV sind in unseren Ergebnissen bei Betrachtung der roten Zellen (R1-R3) stets höher als bei Betrachtung der grünen Zellen (G1-G3). Zwar sind bei den roten Zellen insgesamt weniger positive Ergebnisse zu finden, dennoch ist der prozentuale Anteil der richtig-positiven Resultate unter allen positiven Testergebnissen wesentlich höher als in der grünen Vergleichszellgruppe.

Bei der Untersuchung der Wirkung potentieller Einflussparameter, bei der nur das tumorfreie Kollektiv betrachtet wurde, liegt die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden grünen Zellen stets etwas höher als die der roten Zellen. Dieser Unterschied zwischen den roten und grünen Zellen fällt vor allem bei Mitbetrachtung der unter-schweligen Zellen (Zellgruppen G3 und R3) auf.

Um dieses Studienergebnis zu diskutieren, muss man sich zunächst die molekularen Grundlagen des uCyt+-Tests vor Augen führen. Die rot markierten 19A211-Antikörper binden an karzinoembryonale Antigene (CEA). Diese werden bekanntermaßen gelegentlich auch von Schirmzellen exprimiert, welche die oberflächliche Schicht des gesunden Urothels bilden (Cordon-Cardo et al., 1992, Bergeron et al., 1996b). Die grüne Fluoreszenz wird durch die monoklonalen Antikörper M344 und LDQ10 erzeugt, die mit Fluoreszein markiert sind. Diese richten sich gegen Mucin-Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht, welche in Tumorzellen weniger stark glykosyliert sind. Verschiedene Quellen bestätigen, dass diese nicht von normalen, nicht-neoplastischen Urothelzellen exprimiert werden (Fradet et al., 1987, Bergeron et al., 1996a). Daher entspricht diese obige Beobachtung (mehr grüne falsch-positiv fluoreszierende Zellen als rote) nicht unseren Erwartungen.

In einem Review von Scholfield et al. wurde die Funktion und Struktur des Schleimstoffs MUC1, der auf Urothelzellen vorkommt, diskutiert. Dieser

Schleimstoff wird bei vielen malignen Tumoren in größeren Mengen sezerniert und weist eine erhöhte Anzahl an abnormal verkürzten Kohlenhydrat-Seitenketten auf. Hierdurch sind größere Teile des Proteinrückgrates exponiert (Scholfield et al., 2003). Auch die Bindung der M344- und LDQ10-Antikörper des uCyt+-Tests an bestimmte Mucin-Glykoproteine lässt sich wie oben beschrieben auf eine veränderte Glykosylierung der Tumorzellen und damit einer Expression von neuen Kohlenhydrat-Epitopen zurückführen (Bergeron et al., 1996a). Es ist bekannt, dass die Harnblasentumorgenese mit einer Veränderung der Glykosylierung einhergeht (Cotton et al., 2017). Denkbar wäre daher, dass anhand der falsch-positiv fluoreszierenden grünen Zellen Tumore in sehr frühen Stadien erkannt werden, die mittels Zystoskopie noch nicht sichtbar sind. Durch eine schon begonnene Veränderung der Glykosylierung könnten einige M344- und LDQ10-Epitope bereits dem Immunsystem exponiert sein, was die leichte grüne Fluoreszenz (v.a. unterschwellig) hervorrufen könnte. In folgenden Studien wäre die Untersuchung des weiteren Verlaufs der Patienten mit solchen vermeintlich falsch-positiv fluoreszierenden grünen Zellen daher von Interesse.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die M344- und LDQ10-Epitope (Mucin-Glykoproteine) verschiedenen Einflüssen gegenüber anfälliger sind als die 19A211-Epitope (CEA). Eine durch Umweltparameter hervorgerufene Veränderung der Glykosylierung der Mucin-Glykoproteine mit einer daraus resultierenden verstärkten Bindung der M344- und LDQ10-Antikörper an gesunde Urothelzellen ist vorstellbar, muss aber durch gezielte Studien evaluiert werden.

Weiterhin ist es möglich, dass es durch Fehler während der Anfertigung der Sedimentpräparate, beispielsweise durch zu hohen Druck während des Filtervorgangs, zu einer Veränderung der Zellmorphologie kommt, was schwach grünfluoreszierende Zellen als Folge haben kann (DiagnoCure™, 2000).

## 4.3 Einfluss der Histopathologie auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen

### 4.3.1 Einfluss des Tumorstadiums und der Tumorinvasivität

Unter den 67 Tumoren, bei denen Informationen über die TNM-Klassifikation vorliegen, weisen 84% ein oberflächliches und 16% ein infiltrierendes Wachstum auf. Die Verteilung auf die einzelnen Stadien ist wie folgt: pTa: 64,2%, pT1: 19,4%, pT2a: 9%, pT2b: 6%, pT3a: 1,5%.

In der Literatur sind in verschiedenen Studien in 57,9 - 83,9% der Fälle oberflächliche und in 10,6 - 36,8% der Fälle invasive Tumoren zu finden. Auf die einzelnen Stadien verteilt machen pTa-Tumore 36,8 - 65,8%, pT1-Tumore 18,1 - 30%, pT2-Tumore 8,2 - 26,3%, pT3-Tumore 1,2 - 5,3% und pT4 Tumore 1,2 - 5,3% der Fälle aus (Cha et al., 2012, Todenhöfer et al., 2013a, Hautmann et al., 2004, Schmitz-Drager et al., 2010). Der Divergenz dieser Ergebnisse könnte einer natürlichen Varianz zugrunde liegen, da das Tumorstadium entscheidend vom jeweiligen Diagnosezeitpunkt abhängt. Es ist ebenso denkbar, dass Pathologen die pT-Kategorien unterschiedlich interpretieren. In einer Studie von Tosoni et al. wurden statistisch signifikante Variationen zwischen den histologisch ermittelten Tumorstadien und -graden verschiedener Pathologen entdeckt (Tosoni et al., 2000).

Der Unterschied bei der Verteilung der grünen Zellen (G1-G3) auf die einzelnen Tumorstadien ist statistisch nicht signifikant. Bei pTa- und pT2a-Tumoren waren nur wenige definitiv positive grüne Zellen (G1) sichtbar. Bei Mitbetrachtung der grünen Borderline-Zellen (G2) steigt der Medianwert jedoch besonders bei pT2a Tumoren deutlich an. Dennoch wurden insgesamt bei invasiven Tumoren weniger grüne Zellen gefunden als bei oberflächlichen Tumoren. Ursächlich könnte die in einer Studie von Fradet et al. gefundene geringe Expression der M344-Antigene auf invasiven Karzinomzellen sein. Zwar präsentierten sich diese auf 68% der oberflächlichen, jedoch nur auf 15% der invasiven Blasen-tumorzellen (Fradet et al., 1987).



Bei den roten Zellen (R1-R3) ist das Fehlen von definitiv positiven Zellen (R1) in allen 10 Urinproben der Patienten mit pT2a- und pT2b-Tumoren statistisch signifikant (p-Wert 0,0267). Erst bei Mitbetrachtung der Borderline-Zellen (R2) waren rot-fluoreszierende Zellen sichtbar. Auch im Vergleich der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen (R1) bei oberflächlichen und invasiven Tumoren spiegelt sich der statistisch signifikante Unterschied wider (p-Wert 0,0384). Fradet et al. zeigen in einer ähnlichen Studie analog zum M344-Antigen die hohe Expression von 19A211-Antigenen auf oberflächlichen Karzinomen (über 60%), während nur etwa 20% der invasiven Tumoren dieses Antigen präsentieren (Fradet et al., 1990). 1992 stellten auch Cardon-Cardo et al. in ihrer Studie die Expression des 19A211-Antigens auf 77% der Ta-T1 Tumoren und auf nur 10% der T3-T4 Tumoren fest (Cordon-Cardo et al., 1992). Diese Erkenntnis unterstützt eine Studie von Fradet und Lockhard von 1997, in der nur die roten Zellen gewertet wurden. Der uCyt+-Test zeigt in deren Analyse bei pTa-Tumoren eine Sensitivität von 93%. Bei pT1-Tumoren steigt sie leicht auf 96% an und bei pT2- und pT3-Tumoren liegt sie bei nur 80% (Fradet and Lockhard, 1997).

In einigen weiteren Studien wurde ebenfalls die Sensitivität der Immunzytologie bei verschiedenen Tumorstadien untersucht. Dabei ist jedoch die Tendenz erkennbar, dass die Sensitivität für pTa Tumoren mit 50-71,4% am niedrigsten liegt (Comploj et al., 2013, Toma et al., 2004, Hautmann et al., 2004, Sullivan et al., 2009). Ein Grund dafür könnte das geringe Vorkommen von eindeutig positiven grünen und roten Zellen (G1 und R1) bei pTa-Tumoren sein, sofern nur diese für ein positives Testergebnis ausschlaggebend waren. Cha et al. werteten die Anzahl an Immunzytologie-positiven und -negativen Ergebnissen bei Tumoren der unterschiedlichen Stadien aus. Dabei fällt auf, dass nur im Stadium pTa die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse überwiegt (Cha et al., 2012). Diese Ergebnisse widersprechen jedoch den von Fradet et al. gefundenen Resultaten, nach denen die Sensitivität gerade bei den oberflächlichen Tumoren durch die hohe Expression der M344- und 19A211-Antigene besonders hoch ausfallen sollte (Fradet et al., 1987, Fradet et al., 1990).

### 4.3.2 Einfluss des Tumorgrades

In unserem Kollektiv ist bei 37,3% der Tumorpatienten der Tumorgrad 1, bei ebenso vielen der Tumorgrad 2 und bei 25,4% der Tumorgrad 3 diagnostiziert worden. Eine Studie von Todenhöfer et al. zeigt eine ähnliche Verteilung mit 43,1%, 32,1% und 22% für Tumorgrad 1, 2 und 3 (Todenhöfer et al., 2013a). In anderen Studien unterscheidet man nach der neuen WHO-Klassifikation teils nur zwischen Low-Grade-Tumoren (58,7%) und High-Grade-Tumoren (41,3%) (Cha et al., 2012). Auch hier kann eine variierende Interpretation der histologisch untersuchten Präparate zwischen den Pathologen nicht ausgeschlossen werden (Tosoni et al., 2000). Die höhere Rate an oberflächlichen Tumoren könnte in einer besseren Vorsorge und damit einem früheren Erkennen der Erkrankung begründet sein.

Da Low-Grade-Tumore nur in wenigen Fällen progressive Atypie oder invasives Wachstum zeigen und daher meist oberflächlich sind, ergibt sich eine Verbindung zu den unter 4.3 gefundenen Erkenntnissen. Nach Sagerman et al. erkennen die monoklonalen Antikörper M344 und 19A211 tumorassoziierte Antigene, die sich vor allem auf Zellen von Low-Grade-Tumoren befinden. Nach Fradet et al. werden diese Antigene vor allem von Zellen oberflächlicher Tumoren präsentiert. Daher würde man erwarten, dass in unserer Studie bei den Low-Grade-Tumoren mehr fluoreszierende Zellen gezählt werden (Sagerman et al., 1993, Fradet et al., 1987, Fradet et al., 1990). Unsere Ergebnisse können dies jedoch bei den grünen Zellen (G1-G3) nur eingeschränkt und bei den roten Zellen (R1-R3) nicht bestätigen (Tabelle 8). Bei den grünen Zellen ist nur bei Mitbetrachtung der Borderline-Zellen (G2) und unterschwelligen Zellen (G3) eine höhere Zellanzahl bei Tumoren ersten Grades im Vergleich zu Tumoren dritten Grades erkennbar. Die Anzahl der roten Zellen dagegen ist bei höherem Tumorgrad im Gegensatz zu unseren Vermutungen sogar erhöht. Jedoch ist keiner der genannten Unterschiede statistisch signifikant.

## **4.4 Wirkung potentieller Einflussparameter auf das Testergebnis**

### **4.4.1 Einfluss der Rauchgewohnheit**

Es ist bereits durch viele Studien bewiesen, dass Raucher eine erhöhte Prävalenz für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms zeigen (Zeegers et al., 2000, Castelao et al., 2001, Bjerregaard et al., 2006). Bei ehemaligen Rauchern verringert sich zwar das Risiko, an einem BC zu erkranken, doch bleibt es im Vergleich zu Nichtrauchern stets erhöht (Boffetta, 2008). Weiterhin beobachteten Allard et al. eine höhere Rezidivrate unter Rauchern und ehemaligen Rauchern als unter Nichtrauchern (Allard et al., 1995).

Die genauen molekularen Mechanismen der Blasenkarzinogenese sind nicht abschließend geklärt. Ein wichtiger Ansatz ist die Wirkung von den im Tabak enthaltenen Kanzerogenen (u.a. aromatische Amine und Arylamine) auf die DNA der Urothelzellen. Es konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass diese Kanzerogene zu einer DNA-Schädigung und letztendlich zu einer Mutagenese führen können (Vineis et al., 1996, Besaratinia and Tommasi, 2013). Diese genetische Veränderung kann eine Ursache für die Entstehung von Blasen Tumoren sein. Der Einfluss des Tabakkonsums auf das normale Urothel und auf die unterschiedlichen Harnmarkertests ist in der Literatur jedoch bislang unzureichend geklärt.

Auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen scheint der Nikotinkonsum unseren Ergebnissen zufolge jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss zu haben.

#### 4.4.2 Einfluss einer Mikro-/ Makrohämaturie

Alle 444 Patienten in unserem Kollektiv wiesen eine Hämaturie auf. Davon war bei 79,7% eine Mikrohämaturie und bei 20,3% eine Makrohämaturie dokumentiert. In der Literatur lagen die Werte bei 68% zu 32% in einem ähnlichen Kollektiv aus Patienten mit schmerzloser Hämaturie ohne BC-Vorgeschichte (Cha et al., 2012).

Noch nie wurde der genaue Unterschied der falsch-positiv fluoreszierenden grünen und roten Zellanzahl bei Patienten mit Mikro- und Makrohämaturie betrachtet. Aus unseren Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Hämaturiestärke keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die falsch-positiv fluoreszierende Zellanzahl hat. Dennoch ist ein häufigeres Vorkommen von falsch-positiv fluoreszierenden Zellen in Urinproben der Patienten mit Makrohämaturie zu verzeichnen.

Der Einfluss der Hämaturie auf den uCyt+-Tests wurde bereits 2013 von Todenhöfer et al. untersucht. Es wurde eine statistisch signifikante Abhängigkeit der uCyt+-Ergebnisse von einer vorhandenen Hämaturie beobachtet. Die Rate der falsch-positiven Testergebnisse lag bei Patienten mit Hämaturie höher und die Rate der falsch-negativen Ergebnisse tiefer als bei Patienten ohne Hämaturie. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde auch ein statistisch signifikanter Einfluss der Hämaturiestärke (Grad1-3) auf den uCyt+-Test beobachtet. Es wurde festgestellt, dass mit der Stärke der Hämaturie die Anzahl der falsch-positiven Testergebnisse steigt, während die Anzahl der falsch-negativen uCyt+-Resultate sinkt. Die höchste Akkuratess des uCyt+-Tests unter den Patienten mit Hämaturie ergab sich bei jenen mit einer schwach ausgeprägten Hämaturie (Grad 1: 81,5%) (Todenhöfer et al., 2013b).

Die Zytologie zeigt in der Studie von Todenhöfer et al. bei Patienten mit Hämaturie ebenfalls eine erhöhte Rate an falsch-positiven Ergebnissen. Diese wird durch eine morphologische Veränderung der Zellstruktur durch das Vorhandensein einer Entzündung zu erklären versucht. Da der uCyt+-Test jedoch vor allem von der Expression tumorassoziierter Antigene abhängig ist, reichen diese

Theorien nicht, um die steigende Rate an falsch-positiven Ergebnisse des uCyt+-Tests bei einer Hämaturie zu erklären (Todenhöfer et al., 2013b).

Auch andere nicht-invasive Harntests wurden bezüglich ihrer Beeinflussbarkeit durch eine vorhandene Hämaturie untersucht. Hennenlotter et al. fanden bei einigen Schnelltests zur Harnblasendiagnostik (BTAstat<sup>R</sup>, BioNexia-BTA<sup>R</sup> und BCM<sup>R</sup>) eine statistisch signifikante Erhöhung der falsch-positiven Rate bei steigender Hämaturiestärke. Am meisten resistent gegen eine Manipulation durch Blut im Urin war in diesen Untersuchungen der NMP22-BladderCheck-Test (Hennenlotter et al., 2011).

#### **4.4.3 Einfluss der mechanischen Manipulation bei Uringewinnung**

Zu mechanischer Manipulation bei der Uringewinnung kam es in unserer Studie in 79,5% der Patientenfälle, bei denen Katheterurin, Exprimaturin oder Spülurin für die Auswertungen verwendet wurde. In einer anderen Studie liegt die Rate bei 71,2% (Todenhofer et al., 2012).

Ob invasive Urinentnahmemethoden zu einer Erhöhung der falsch-positiven Ergebnisse führen, ist bereits 2012 von Todenhöfer et al. untersucht worden. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden. Dennoch lag mit 26,3% zu 20,2% die falsch-positive Rate bei den Patienten mit mechanischer Manipulation höher (Todenhofer et al., 2012).

In unserer Studie wirkt sich die invasive Urinentnahme lediglich auf die unterschwelligen Zellen aus, bei denen ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden kann (G3: p-Wert = 0,0005 und R3: p-Wert = 0,0447). Durch die mechanische Manipulation scheinen sich mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen in den Urinpräparaten tumorfreier Patienten zu befinden als bei den Patienten mit nicht-invasiv gewonnenem Urin.

Eine gesteigerte Affinität der gesunden abgeschilferten Urothelzellen zu den monoklonalen Antikörpern des uCyt+-Tests könnte in einer morphologischen Veränderung deren Oberfläche durch die invasive Urinentnahme begründet

sein. Da dies bisher jedoch nur wenig untersucht ist und in der Literatur nur wenige Vergleichswerte zu finden sind, sollten weitere Untersuchungen folgen, um eine Beeinflussung der Testergebnisse von der Art der Urinentnahme definitiv ausschließen zu können.

#### **4.4.4 Einfluss eines Harnwegsinfektes**

Ein bestehender Harnwegsinfekt (HWI) stellt laut des Herstellers SCIMEDX Corporation (Denville, USA) keine Kontraindikation für den uCyt+-Test dar. Dennoch wurden Patienten mit dieser Erkrankung in einigen Studien nicht ins Patientenkollektiv aufgenommen, da man eine Beeinflussung des uCyt+-Ergebnisses annahm (Toma et al., 2004, Soyuer et al., 2009). In weiteren Studien wird vermutet die im Vergleich zu anderen Tests relativ hohe Rate der falsch-positiven Ergebnisse des uCyt+-Tests käme durch Harnwegsinfekte zustande (Greene et al., 2006, Mitra et al., 2012).

Diese Annahme kann den Ergebnissen unserer Studie zufolge nicht bestätigt werden. Es ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Harnwegsinfekt erkennbar.

In einer vergleichbaren Studie von Todenhöfer et al. ist ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied erkannt worden. Hier weisen 24,8% der Patienten ohne HWI und 25,9% der Patienten mit HWI falsch-positive uCyt+-Ergebnisse auf (Todenhöfer et al., 2012).

#### **4.4.5 Einfluss einer benignen Prostatahyperplasie oder eines Prostatakarzinoms**

In unserer Studie ist nur bei Betrachtung der Zellgruppe G3 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der falsch-positiv fluoreszierenden Zellanzahl der Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), Prostatakarzinom (PC) oder keiner der beiden Erkrankungen erkennbar. Doch auch bei Wertung der anderen Zellgruppen wurden vor allem bei dem Vorliegen eines Prostatakarzinoms,

aber auch bei Vorliegen einer BPH mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen gefunden.

In verschiedenen Studien wurde bereits diskutiert, ob sich ein Prostatakarzinom oder eine BPH auf das uCyt+-Resultat auswirkt. Bereits 1992 erkannten Cardon-Cardo et al. in einer Minderheit von Prostata-, Colon- und Brustkarzinomen eine Reaktivität mit den monoklonalen Antikörpern M344 und 19A211. Diese reagierten mit 10 bzw. 6 von 105 Tumoren, die sich nicht in der Harnblase befanden. Allesamt waren gut differenzierte Adenokarzinome (Cordon-Cardo et al., 1992). Weiterhin bemerkten Gambus et al. eine leichte Affinität von LDQ10 zu Prostatakarzinomzellen (Gambus et al., 1993). In einer Studie von Mian et al. ist die Rate der falsch-positiven uCyt+-Ergebnisse bei Patienten mit BPH oder nephrogenem Adenom mit 50% auffallend hoch (Mian et al., 1999). In einer späteren Studie mutmaßen Mian et al., dass die falsch-positiven Ergebnisse von Nieren- oder Blasensteinen, Prostatahypertrophie, Prostatakarzinom oder nach intravesikaler Therapie herrühren könnten (Mian et al., 2006). Weitere Autoren halten es gleichermaßen für möglich, dass die BPH für einen Teil der falsch-positiven Ergebnisse verantwortlich ist (Mitra et al., 2012, Greene et al., 2006).

1993 vermuteten Sagerman et al., dass das Vorhandensein oder die Behandlung eines malignen Tumors an einem anderen Organ antigene Veränderungen im Urothelium induzieren könnte. Sie schlussfolgern, dass die Ergebnisse der Immunzytologie vor allem bei Patienten mit in der Vergangenheit aufgetretenen Prostatakarzinomen oder gestreuten Karzinomen jeglicher Art mit Vorsicht interpretiert werden sollten (Sagerman et al., 1993).

#### **4.4.6 Einfluss des Geschlechts**

In einigen Studien wurde bereits der Einfluss des Geschlechts auf die Entwicklung oder das Stadium eines Harnblasenkarzinoms untersucht (Shariat et al., 2010, Dobruch et al., 2016). Es ist bekannt, dass mehr Männer an Harnblasenkarzinomen erkranken als Frauen. In einer Studie von Mungan et al., welche ein großes Patientenkollektiv aufweist, stellt das männliche Geschlecht 79,9% des Tumorkollektivs dar, während die Frauen mit nur 20,1 % vertreten sind

(Mungan et al., 2000). In unserem Kollektiv liegt eine ähnliche Geschlechtsverteilung von 85% Männern zu 15% Frauen vor.

Als Gründe für das häufigere Erkranken von Männern wurden unter anderem der höhere Nikotinkonsum und die häufigere Exposition gegenüber Karzinogenen diskutiert (Mungan et al., 2000). 1990 interviewten Hartge et al. ein großes Patientenkollektiv bezüglich ihrer Lebensgewohnheiten. Dabei wurden unter anderem auch der Tabakkonsum und die Berufsgeschichte erfragt. Anschließend wurde das BC-Aufkommen in einer Patientengruppe, bestehend aus Patienten die keiner der Risikofaktoren ausgesetzt waren, bestimmt. Auch hier wurde eine höhere BC-Inzidenz bei den männlichen Patienten erkannt. Somit wurden oben genannte Einflussfaktoren als Ursache der Unterschiede zwischen Männern und Frauen für unwahrscheinlich erachtet. Stattdessen wurde die hormonelle Ungleichheit für möglich gehalten. Einige Tumorzellen scheinen in Präsenz von Androgenen besser zu wachsen als in Anwesenheit von Östrogenen. Für eine weitere Möglichkeit wurde der größere Harnverhalt unter Männern, beispielsweise auch durch eine BPH, gehalten (Hartge et al., 1990).

Dobruch et al. führten eine Metaanalyse bezüglich des Einflusses des Geschlechts auf das Vorkommen von Blasenkarzinomen durch. Eine unterschiedliche Metabolisierung von Kanzerogenen bei Männern und Frauen wird in dieser Studie für möglich gehalten. Dadurch kommt es zu einer anderen Exposition des Urotheliums gegenüber den Kanzerogenen. Weiterhin wurde der Einfluss der Sexualhormone untersucht. Auf vielen Tumoren, vor allem auf ‚low-stage‘ Tumoren, wurden Androgen-Rezeptoren nachgewiesen. Es gilt für wahrscheinlich, dass eine Androgen-vermittelte Anfälligkeit von Blasenkrebszellen gegenüber Karzinogenen besteht (Dobruch et al., 2016).

Bei den Frauen liegen jedoch das Tumorstadium und damit die Mortalität durchschnittlich meist höher. Cohn et al. untersuchten den geschlechtsspezifischen Diagnoseverlauf nach Erstauftreten einer Hämaturie. Bei Frauen dauerte die Zeit zwischen Hämaturie-Beginn und Diagnose deutlich länger. Es wurden häufiger Urinanalysen und -kulturen durchgeführt sowie Antibiotika verschrieben als bei Männern und es wurde öfter eine HWI diagnostiziert (Cohn et al., 2014).



Bei unserer Analyse des potentiellen Einflusses des Geschlechts auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen ist bei den Zellgruppen G2, G3 und R3 ein statistisch signifikanter Unterschied aufgefallen. Bei den durch die Zystoskopie und das histologische Gutachten als tumorfrei diagnostizierten Männern wurden mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen in den Urinproben erfasst als bei den tumorfreien weiblichen Patientinnen.

Wie oben erläutert, wird vermutet, dass Blasenkarzinome der Männer durch die Androgen-Rezeptoren auf eine andere Weise auf Kanzerogene reagieren als die der Frauen. Es ist also auch denkbar, dass sich das gesunde Urothel oder die Blasentumore der beiden Geschlechter in weiteren morphologischen Strukturen unterscheiden, die einen Einfluss auf die uCyt+-Antikörperbindung haben könnten. Beispielsweise wäre eine unterschiedlich starke Glykosylierung der Mucin-Glykoproteine denkbar, sodass bei Männern vermehrt M344- und LDQ10-Antikörper an gesunde Urothelzellen binden können. Weitere mögliche Ursachen, die die anatomischen, hormonellen oder sozialen Unterschiede zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht betreffen, sind vorstellbar, müssen jedoch in folgenden Studien weiter evaluiert werden.

#### **4.4.7 Einfluss des Alters**

Das Alter gilt als einer der Risikofaktoren für das Entwickeln eines Harnblasenkarzinoms. Die höchste Inzidenz liegt zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr (Horstmann et al., 2013).

Aus unseren Ergebnisse ergibt sich kein statistisch signifikanter Einfluss des Alters auf die Anzahl falsch-positiv fluoreszierender Zellen des uCyt+-Tests.

Horstmann et al. untersuchten 2013 als bislang erste den Einfluss des Alters auf die falsch-positive Rate von vier Urintests zur Blasentumordiagnostik (Zytologie, uCyt+, NMP22 und FISH). Bei Patienten unter 50 Jahren wurden bei 17% falsch-positive uCyt+-Ergebnisse gefunden. Bei Patienten zwischen 50 und 70 Jahren waren es bereits 24% und bei Patienten über 70 Jahren waren es 28%. Diese Unterschiede zwischen den Altersklassen zeigten keine statistische Signifikanz.

Dennoch ließ sich eine Tendenz der steigenden Anzahl an falsch-positiven uCyt+-Ergebnissen bei fortgeschrittenem Alter erkennen.

In derselben Studie wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Patientenalter und den Zytologie-Ergebnissen festgestellt. Die erhöhte Anzahl falsch-positiver Resultate bei höherem Alter wurde auf eine altersbedingte Veränderung des Urothels zurückgeführt. Vermutet wurde, dass der Alterungsprozess mit einem erhöhten Zellpolymorphismus, Hyperchromatose und einem verringerten Zytoplasma-Gehalt einhergehe und dadurch ein erhöhter Anteil an alten, untypischen Zellen im Urin vorliege. Diese könnten durch ihr ungewöhnliches Aussehen fälschlicherweise als positiv gewertet worden sein.

Auch der uCyt+-Test basiert zum Teil auf der urothelialen Zellmorphologie, die sich wie oben erläutert mit zunehmendem Alter verändern kann. Im Gegensatz zur Zytologie wird der Urin beim uCyt+-Test jedoch zusätzlich auf tumorassoziierte Antigene getestet (Horstmann et al., 2013).

#### **4.5 Diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests als Ergänzung zur Zytologie**

Die Zytologie ist die am weitesten verbreitete nicht-invasive Diagnostikmethode beim Harnblasenkarzinom. Sie weist jedoch durch die geringe Sensitivität in der Detektion von Low-Grade-Tumoren entscheidende Mängel auf (Lokeshwar and Soloway, 2001). Bei einem negativen Zytologie-Ergebnis ist demnach das Vorhandensein eines Harnblasentumors nicht vollständig ausgeschlossen.

In unserer Studie sind bei zusätzlicher Durchführung des uCyt+-Tests bei Betrachtung der Zellgruppen G2 + R2 und G3 + R3 64,7% bzw. 82,4% der falsch-negativen Zytologie-Ergebnisse als tumorpositiv enthüllt worden. Dies macht 16,2% bzw. 20,6% der Tumore im Gesamtkollektiv aus. Die Sensitivität kann also durch Kombination der Zytologie mit dem uCyt+-Test, wie bereits in anderen Studien beobachtet, optimiert werden (Comploj et al., 2013, Toma et al., 2004, Lodde et al., 2003, Mian et al., 1999). Dennoch bleiben 8,8% der Tumore durch beide

Tests nicht erkannt. In einer Studie von Mian et al. waren beide Tests in 10,1% falsch-negativ (Mian et al., 1999).

## **4.6 Limitationen und Aspekte der vorliegenden Arbeit**

Eine potentielle Fehlerquelle unserer Studie liegt darin, dass das Zystoskopie-Ergebnis mit der im Falle einer Gewebsentnahme gefolgten histologischen Auswertung als Referenz-Standard für das Vorhandensein oder das Nichtvorhandensein eines Harnblasenkarzinoms gewählt wurde. Denn auch die Sensitivität der Zystoskopie liegt nicht immer bei 100% (Schmitz-Drager et al., 2010). Es ist also möglich, dass durch die Zystoskopie einige Tumore nicht erkannt wurden. Wie bereits von Vriesema et al. diskutiert, könnte der uCyt+-Test Zellen von makroskopisch mittels der Zystoskopie noch nicht sichtbaren Tumoren erkannt haben, was die hohe falsch-positive Rate erklären würde (Vriesema et al., 2001). Dennoch stellt das oben genannte Vorgehen den Goldstandard dar (Lokeshwar et al., 2005).

Unsere Studie weist weiterhin die Nachteile einer retrospektiven Studie auf. Es wurde mit standardmäßig erfassten Daten aus dem klinischen Routinebetrieb gearbeitet. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Dokumentation der im Testbericht angegebenen Zellanzahl einer Untersucherabhängigkeit unterlag oder nur ungenau erfolgte, da die auswertenden Personen sich der späteren Bedeutung dieser Daten nicht bewusst sein konnten.

### **4.6.1 Technische Limitationen des uCyt+-Tests**

Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben weist der uCyt+-Test einige technische Limitationen auf:

Im Vergleich zu anderen Tests wird für die Immunzytologie eine relativ große Urinmenge benötigt (20-40 ml). Problematisch kann das sein, wenn ein Test wiederholt werden muss, was leider aufgrund einer zu geringen Zellanzahl auf dem Sedimentpräparat relativ häufig der Fall ist. Dies kann an einer zu geringen

Zellanzahl in der Urinprobe oder an einem Fehler während des Filtervorgangs liegen (Vriesema et al., 2001).

Der uCyt+-Tests ist laborintensiv, technisch aufwendig und erfordert eine spezielle Ausstattung sowie eine besondere Schulung und Fachkenntnis des auswertenden Personals (Vriesema et al., 2001, Soyuer et al., 2009). Ein weiterer Nachteil sind die hohen Kosten, der große Personalaufwand und die bereits oben erwähnte hohe Misserfolgsrate (Schmitz-Drager et al., 2010, Mitra et al., 2012).

Die hohe Photosensibilität der Farbmarker Fluoreszein und Texas Red führen zu einer geringen Stabilität der Sedimentpräparate gegenüber Lichtquellen. Das Fluoreszenzsignal wird durch Beleuchtung schnell abgeschwächt (Vriesema et al., 2001). Es muss also darauf geachtet werden, dass die Objektträger dem Licht möglichst nur kurz ausgesetzt sind und diese anschließend wieder dunkel gelagert werden. Wegen des Nachlassens der Fluoreszenz-Intensität sollte die Auswertung der Präparate innerhalb von 7 Tagen nach Herstellung erfolgen.

Weitere technische Limitationen stellen nur schwach fluoreszierende grüne Zellen und eine Beeinträchtigung der Auswertbarkeit durch den roten Hintergrund dar (Greene et al., 2006). Diese Einschränkungen lassen sich häufig auf Herstellungsfehler zurückführen. Beispielsweise können laut Hersteller ein zu hoher Druck oder ein Austrocknen des Filters während des Filtervorgangs zu einer veränderten Morphologie der Zellen führen und eine zu kurze oder zu lange Inkubationszeit einen störenden Hintergrund erzeugen und so die Auswertung erschweren (DiagnoCure™, 2000). Auch das Vorkommen von Schleim auf der Trägerplatte kann das Erkennen von Tumorzellen beeinträchtigen.

#### **4.6.2 Untersucherabhängigkeit der Testergebnisse**

2001 wurde in der Studie von Vriesema et al. zum ersten Mal die Reproduzierbarkeit des uCyt+-Tests untersucht. Dazu wurden dieselben Präparate von drei verschiedenen Untersuchern bewertet. Es wurden große Unterschiede beim Vergleich der Testergebnisse festgestellt und auf eine hohe untersucherabhängige Variabilität der Testresultate geschlossen. Die von den Auswertern errechnete

Sensitivität lag zwischen 18% und 38% und die Spezifität zwischen 81% und 90% (Vriesema et al., 2001). Auch andere Studien bestätigen das Vorkommen von untersucherabhängigen Bewertungsunterschieden (Mitra et al., 2012, Greene et al., 2006, Hautmann et al., 2004). Diese Überlegungen werden von verschiedenen Studien gestützt, die beschreiben, dass die beobachteten Variationen entscheidend von den unterschiedlichen Erfahrungen und Fachkenntnissen der Untersucher abhängen (Hautmann et al., 2004, Mitra et al., 2012, Greene et al., 2006).

Diese durch untersucherabhängige Faktoren bedingten Fehlerquellen lassen sich durch einheitliche Definitionen der auszuwertenden Untersuchungspunkte sowie adäquates Training und eine professionelle Schulung des Personals in gewissem Rahmen minimieren, können sicherlich jedoch nie gänzlich vermieden werden (Vriesema et al., 2001, Greene et al., 2006, Soyuer et al., 2009).

#### **4.6.3 Falsch-positiv fluoreszierende Zellen**

Die hohe Rate an falsch-positiven uCyt+-Ergebnissen und die damit verbundene geringe Spezifität stellt eine bedeutende Limitation des uCyt+-Tests dar (Sullivan et al., 2009). In der Literatur liegt die falsch-positive Rate bei 20-21% (Mian et al., 1999, Lodde et al., 2003). In unserer Studie liegt sie mit 18% bei Wertung der Zellgruppen G2 + R2 knapp darunter. Falsch-positive Ergebnisse verängstigen den Patienten und führen dazu, dass sich diese vermeidbaren invasiven und kostenintensiven Tests unterziehen (Lokeshwar et al., 2005, Horstmann et al., 2013).

Schon 1992 bemerken Cardon-Cardo et al. in ihrer Studie zu den Antikörpern M344 und 19A211, dass sich teilweise auch die Schirmzellen und oberflächlichen Urothelzellen durch den 19A211 Antikörper anfärben und falsch-positive Ergebnisse resultieren (Cordon-Cardo et al., 1992). Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie von Bergeron et al., in der der 19A211 Antikörper bei 25% der Erwachsenen oder Föten mit urothelialen Schirmzellen reagiert (Bergeron et al., 1996b). Dass diese Zellen, die teilweise Tumorantigene präsentieren, jedoch allein für die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen verantwortlich sind, ist unwahrscheinlich.

Als Ursache für die falsch-positiv fluoreszierenden Zellen wird in der Literatur bereits die Beeinflussung des Tests durch Blasen- oder Nierensteine, eine BPH, ein Prostatakarzinom, einen HWI, Hämaturie oder vorausgegangene intravesikale Therapie diskutiert (Mian et al., 2006, Mitra et al., 2012). Darüber hinaus wird auch das Vorhandensein oder die Behandlung eines malignen Tumors an einem anderen Organ als Einflussfaktor diskutiert, da dies antigene Veränderungen im Urothel induzieren könnte (Sagerman et al., 1993). Eine Assoziation mit Harnwegsinfekten oder der Hämaturiestärke erscheinen nach den Ergebnissen unserer Studie aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz unwahrscheinlich. Das Vorhandensein eines PC oder einer BPH und eine invasive Urinentnahme wirken sich laut unseren Ergebnissen nur auf die unterschwelligeren Zellen in einem statistisch signifikanten Maß aus. Nur der Parameter ‚Geschlecht‘ zeigt auch einen Einfluss auf die Zellgruppen G2 und R2.

Eine weitere Vermutung, die die hohe Rate an falsch-positiv fluoreszierenden Zellen erklären könnte, ist, dass Tumormarker bereits von den entarteten Urothelzellen exprimiert werden, bevor zystoskopisch ein Tumor sichtbar ist (Vriesema et al., 2001). Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Kenntnis über den Krankheitsverlauf der Patienten mit falsch-positiven uCyt+-Ergebnissen. Möglicherweise traten bei ihnen innerhalb von kurzer Zeit Harnblasenkarzinome auf. Eben dieser Verlauf wurde 2003 von Piaton et al. untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass 47% der Patienten mit positivem uCyt+-Test und negativer Zystoskopie innerhalb eines Jahres ein Blasenkarzinom entwickelten, während dies nur bei 11% der Patienten mit negativen Ergebnissen in beiden Tests der Fall war (Piaton et al., 2003). Auch Lodde et al. und Mian et al. machten 2003 und 2006 eine interessante Beobachtung. In ihren Studien sinkt die Spezifität der uCyt+-Tests, die im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen durchgeführt wurden, durch die Erhöhung der falsch-positiven Ergebnisse deutlich ab. Eine denkbare Erklärung scheint das Erkennen von Tumorrezidiven, bevor diese makroskopisch durch die Zystoskopie sichtbar waren. In der letztgenannten Studie wiesen 11% der untersuchten Patienten innerhalb des Folgejahres ein Rezidiv auf (Lodde et al., 2003, Mian et al., 2006).

## 4.7 Schlussfolgerung

In dieser Studie wurden erstmals die vom Hersteller definierten, für ein positives uCyt+-Testergebnis ausschlaggebenden Kriterien hinterfragt und bei variierenden Kriterien dessen diagnostische Wertigkeit validiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei einer Erhöhung des ‚cut off‘-Wertes von  $>0$  auf  $\geq 2$  oder  $\geq 3$  Zellen, sowie durch die gemeinsame Wertung der grünen und roten Zellen ein besseres Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann. Es sollte kritisch überdacht werden, ob eine scharfe Abgrenzung der definitiv positiven Zellen (über 50% granulierte und deutlich fluoreszierende Zytoplasmafläche) von den Borderline-Zellen (Zytoplasmafläche knapp  $< 50\%$  fluoreszierend granuliert) nötig ist. Denn die gemeinsame Wertung dieser Zellen führt zu einer Erhöhung der Testwertigkeit (Zellgruppen G2: AUC 0,70 und Zellgruppe R2 AUC 0,77).

In der Literatur wurde mehrfach eine höhere Expression der M344 - und 19A211-Antigenen auf der Zelloberfläche nicht-invasiver Tumore im Vergleich zu invasiven Tumoren beschrieben. Dies konnte auch in unserer Studie anhand des geringeren Vorkommens von fluoreszierenden Zellen in Urinproben der Patienten mit invasivem Tumor bestätigt werden. Der Unterschied war jedoch nur bei den roten Zellen (Zellgruppe R1) von statistischer Signifikanz. Eine Korrelation zwischen dem Tumorgrad und der Anzahl der fluoreszierenden Zellen ergaben unsere Analysen nicht.

Des Weiteren wurde der Einfluss von verschiedenen Parametern auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen untersucht. Die Einflussparameter ‚Rauchgewohnheit‘, ‚Hämaturie-Typ‘ und ‚Harnwegsinfekt‘ wirkten sich in keinem statistisch signifikanten Maß auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen aus. Der Einfluss der ‚mechanischen Manipulation bei Urinentnahme‘ und des Vorliegens ‚einer benignen Prostatahyperplasie oder eines Prostatakarzinoms‘ beschränkte sich auf die unterschwellig Zellen (Zellgruppen G3 und R3). Bei deren Mitbewertung wurden in invasiv entnommenen Urinproben sowie bei dem Vorliegen einer BPH oder eines PCs jeweils mehr falsch-positiv fluoreszierende Zellen gefunden wurden. Das Vorhandensein unterschwelliger Zellen

sollte unserer Empfehlung nach weiterhin zu keinem positiven Ergebnis führen, womit auch die Beeinflussung des uCyt+-Ergebnisses durch die oben genannten Parameter zu vernachlässigen wäre. Lediglich das ‚Geschlecht‘ der Patienten wirkt sich in einem statistisch signifikanten Maß auf die grünen Borderline-Zellen (G2) und auf die unterschwellig roten und grünen Zellen (G3 und R3) aus. Ein Ansatzpunkt für weitere Studien besteht darin, die Ursache für diesen Einfluss zu untersuchen, um falsch-positive uCyt+-Ergebnisse vor allem bei männlichen Patienten reduzieren zu können.

Die in unserer Studie gefunden Ergebnisse und Zusammenhänge sollten aufgrund des vorhandenen Stellenwertes und des möglichen Potenzials des uCyt+-Tests zur Harnblasenkarzinomdiagnostik zum Wohle der Patienten in weiteren Studien untersucht werden. Zur Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit sollten vor allem die verschiedenen Interpretationsalgorithmen validiert werden. Dabei muss auf eine genaue Dokumentation der exakten Anzahl der drei Zelltypen mit den unterschiedlichen Fluoreszenzausprägungen geachtet werden. Essenziell ist dabei eine intensive Schulung des auswertenden Personals, um die untersucherabhängige Varianz möglichst gering zu halten. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu stärken wäre ein größeres Patientenkollektiv wünschenswert.



## 5 Zusammenfassung

Der uCyt+-Test des Herstellers SCIMEDX Corporation (Denville, USA) ist ein nicht-invasiver, urinbasierter Test zur Diagnostik von Harnblasenkarzinomen. Die mit fluoreszierenden Markern (Texas Red und Fluoreszein) versehenen monoklonalen Antikörper 19A211, M344 und LDQ10 binden an tumorassoziierte Antigene auf der Urothelzellmembran und lassen so über den Urin ausgeschiedene Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten. Zellen, die eine fluoreszierende Granulation von über 50% der Zytoplasmafläche aufweisen, gelten als definitiv positive Zellen. Ab dem Vorhandensein einer solchen Zelle (,cut off'-Wert  $\geq 0$ ) gilt ein uCyt+-Test nach Herstellerangaben als positiv. Dem Hersteller zufolge sollten alle Zellen mit einer fluoreszierenden Granulation von unter 50% als negatives Testergebnis interpretiert werden. Im Rahmen dieser Studie wurde zudem zwischen den von uns neu definierten ,Borderline-Zellen' (deutliche fluoreszierende Granulation, aber nicht eindeutig über 50% der Zytoplasmafläche, führten zu einem positiven Ergebnis) und den ,unterschwelligen Zellen' (deutlich unter 50% der Zytoplasmafläche fluoreszierend granuliert, führten zu einem negativen Ergebnis) differenziert.

Das Patientenkollektiv bestand aus 444 Patienten ohne Blasentumor in der Vorgeschichte, welche sich während des Zeitraums vom 02.11.2006 bis zum 27.11.2009 in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen mit dem Vorliegen einer Hämaturie vorstellten und einer Harnblasenkarzinom-Diagnostik zugeführt wurden. Zudem mussten ein gültiges uCyt+-Testergebnis und eine zystoskopische Untersuchung mit einem histologischen Gutachten vorliegen.

Ziel der Studie war es zu überprüfen, ob durch Variieren des ,cut off'-Wertes ( $>0$ ,  $\geq 3$ ,  $\geq 5$ ) und der für ein positives Testergebnis relevanten Zelltypen (definitiv positive Zellen, Borderline-Zellen oder unterschwellige Zellen) die diagnostische Wertigkeit des uCyt+-Tests verbessert werden kann. Weiterhin wurde die Abhängigkeit der fluoreszierenden Zellanzahl vom Tumorstadium, der Tumorinvasivität und dem Tumorgrad, sowie der potentielle Einfluss verschiedener Parameter auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen untersucht. Es wurden Kontingenzanalysen und univariate Varianzanalysen durchgeführt, mittels Receiver

Operating Characteristic-Kurven der ‚best cut off‘-Wert errechnet und die statistische Signifikanz mittels des Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests und der Varianzanalyse ermittelt (p-Wert).

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass sich mit steigendem ‚cut off‘-Wert die Anzahl der negativen Testergebnisse erhöhte. Die Sensitivität sank, während die Spezifität stieg. Wurden die Borderline-Zellen und schließlich die unterschwelligen Zellen ebenfalls als Parameter für ein positives Testergebnis integriert, stieg die Sensitivität, während die Spezifität sank. Das beste Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität wurde bei den ‚best cut off‘-Werten von  $\geq 2$  und  $\geq 3$  Zellen errechnet. Durch die gemeinsame Wertung der grünen und roten Zellen konnte ein besseres Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität erreicht werden (Akkuratesse 84,9% bei ‚cut off‘  $> 0$ ).

Im Rahmen der Analysen wurden im Urin der Patienten mit invasivem Tumor im Vergleich zu denen mit oberflächlichem Tumor weniger fluoreszierenden Zellen gefunden. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits in der Literatur erwähnte höhere Expression der M344- und 19A211-Antigenen auf der Zelloberfläche nicht-invasiver Tumore. Der Unterschied war jedoch nur bei den roten definitiv positiven Zellen statistisch signifikant (p-Wert 0,0384). Unsere Studie ergab keine Korrelation zwischen dem Tumorgrad und der Anzahl fluoreszierender Zellen.

Einen statistisch signifikanten Einfluss auf die falsch-positiv fluoreszierende Zellanzahl konnte bei den Parametern ‚Geschlecht‘ (p-Werte 0,0175-0,0408), ‚benigne Prostatahyperplasie oder Prostatakarzinom‘ (p-Wert 0,0311) und ‚mechanische Manipulation bei Urinentnahme‘ (p-Werte 0,0005 - 0,0447) erkannt werden. Die statistische Signifikanz der beiden zuletzt genannten Parameter beschränkt sich auf die Ergebnisse bei Mitbewertung der unterschwelligen Zellen. Die untersuchten Parameter ‚Rauchgewohnheit‘, ‚Hämaturie-Typ‘, ‚Harnwegsinfekt‘ und ‚Alter‘ wirkten sich in keinem statistisch signifikanten Maß auf die Anzahl der falsch-positiv fluoreszierenden Zellen aus.

Eine wesentliche Limitation des uCyt+-Tests stellt die untersucherabhängige Ergebnisvariabilität dar. In der Literatur ist man sich einig, dass durch eine professionelle Schulung und gute Fachkenntnisse des auswertenden Personals die letztgenannte Limitation minimiert werden kann.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under curve
BC	Harnblasenkarzinom
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BPH	benigne Prostatahyperplasie
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CEA	karzinoembryonalen Antigens
CIS	Carcinoma in situ
CT	Computertomographie
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
et al.	et alii (lateinisch, steht für „und andere“)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HWI	Harnwegsinfekt
IQR	Interquartilsabstand
IVP	Ausscheidungsurogramm
MRT	Magnetresonanztomographie
MAbs	monoklonale Antikörper der Maus
NPV	negativer prädiktiver Wert
NMP22	nukleäres Matrixprotein 22
OHT	oberen Harntraktes
PBS	phosphate-buffered saline solution
PC	Prostatakarzinom
PDD	Photodynamische Diagnostik
PPV	positiver prädiktiver Wert
pT	histopathologisch beurteilter Primärtumor
PUNLMP	papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
RKI	Robert-Koch-Institut
ROC-Kurven	Receiver Operating Characteristic-Kurven

TNM-System	Tumor-Node-Metastasis-System
TUR-B	transurethrale Resektion
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
URS	Ureterorenoskopie
vs.	versus (lateinisch, steht für "gegen")
WHO	World Health Organisation
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

## 7 Literaturverzeichnis

- ALLARD, P., FRADET, Y., TETU, B. & BERNARD, P. 1995. Tumor-associated antigens as prognostic factors for recurrence in 382 patients with primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*, 1, 1195-202.
- AMIN, M. B., MCKENNEY, J. K., PANER, G. P., HANSEL, D. E., GRIGNON, D. J., MONTIRONI, R., LIN, O., JORDA, M., JENKINS, L. C., SOLOWAY, M., EPSTEIN, J. I., REUTER, V. E. & INTERNATIONAL CONSULTATION ON UROLOGIC DISEASE-EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY CONSULTATION ON BLADDER, C. 2013. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Pathology. *Eur Urol*, 63, 16-35.
- BABJUK, M., OOSTERLINCK, W., SYLVESTER, R., KAASINEN, E., BOHLE, A., PALOU-REDORTA, J. & EUROPEAN ASSOCIATION OF, U. 2008. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*, 54, 303-14.
- BABJUK, M., OOSTERLINCK, W., SYLVESTER, R., KAASINEN, E., BOHLE, A., PALOU-REDORTA, J., ROUPRET, M. & EUROPEAN ASSOCIATION OF, U. 2011. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol*, 59, 997-1008.
- BERGERON, A., CHAMPETIER, S., LARUE, H. & FRADET, Y. 1996a. MAUB is a new mucin antigen associated with bladder cancer. *J Biol Chem*, 271, 6933-40.
- BERGERON, A., LARUE, H. & FRADET, Y. 1996b. Identification of a superficial bladder tumor-associated glycoform of the carcinoembryonic antigen by monoclonal antibody 19A211. *Cancer Res*, 56, 908-15.
- BESARATINIA, A. & TOMMASI, S. 2013. Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. *The FASEB Journal*, 27, 2090-2100.
- BJERREGAARD, B. K., RAASCHOU-NIELSEN, O., SORENSEN, M., FREDERIKSEN, K., CHRISTENSEN, J., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., CHAPELON, F. C., NAGEL, G., CHANG-CLAUDE, J., BERGMANN, M. M., BOEING, H., TRICHOPOULOS, D., TRICHOPOULOU, A., OIKONOMOU, E., BERRINO, F., PALLI, D., TUMINO, R., VINEIS, P., PANICO, S., PEETERS, P. H., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., KIEMENEY, L., GRAM, I. T., BRAATEN, T., LUND, E., GONZALEZ, C. A., BERGLUND, G., ALLEN, N., RODDAM, A., BINGHAM, S. & RIBOLI, E. 2006. Tobacco smoke and bladder cancer--in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*, 119, 2412-6.
- BOFFETTA, P. 2008. Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 42, 45-54.
- BOHLE, A., BALCK, F., VON WIETERSHEIM, J. & JOCHAM, D. 1996. The quality of life during intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. *The Journal of urology*, 155, 1221-1226.
- BÖHLE, A. & BOCK, P. R. 2004. Intravesical bacille calmette-guérin versus mitomycin c in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology*, 63, 682-686.

- BOMAN, H., HEDELIN, H., JACOBSSON, S. & HOLMANG, S. 2002. Newly diagnosed bladder cancer: the relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status. *J Urol*, 168, 1955-9.
- BOTTEMAN, M. F., PASHOS, C. L., REDAELLI, A., LASKIN, B. & HAUSER, R. 2003. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*, 21, 1315-30.
- BRAUSI, M., WITJES, J. A., LAMM, D., PERSAD, R., PALOU, J., COLOMBEL, M., BUCKLEY, R., SOLOWAY, M., AKAZA, H. & BÖHLE, A. 2011. A Review of Current Guidelines and Best Practice Recommendations for the Management of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer by the International Bladder Cancer Group. *The Journal of Urology*, 186, 2158-2167.
- BURGER, M., VAN DER AA, M. N., VAN OERS, J. M., BRINKMANN, A., VAN DER KWAST, T. H., STEYERBERG, E. C., STOEHR, R., KIRKELS, W. J., DENZINGER, S., WILD, P. J., WIELAND, W. F., HOFSTAEDTER, F., HARTMANN, A. & ZWARTHOF, E. C. 2008. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol*, 54, 835-43.
- CASTELAO, J. E., YUAN, J. M., SKIPPER, P. L., TANNENBAUM, S. R., GAGODOMINGUEZ, M., CROWDER, J. S., ROSS, R. K. & YU, M. C. 2001. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 93, 538-45.
- CHA, E. K., TIRSAR, L. A., SCHWENTNER, C., CHRISTOS, P. J., MIAN, C., HENNENLOTTER, J., MARTINI, T., STENZL, A., PYCHA, A., SHARIAT, S. F. & SCHMITZ-DRAGER, B. J. 2012. Immunocytology is a strong predictor of bladder cancer presence in patients with painless hematuria: a multicentre study. *Eur Urol*, 61, 185-92.
- CHENG, L., MONTIRONI, R., DAVIDSON, D. D. & LOPEZ-BELTRAN, A. 2009. Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol*, 22 Suppl 2, S70-95.
- CHOI, H. S., LEE, S. I., KIM, D. J. & JEONG, T. Y. 2010. Usefulness of the NMP22BladderChek Test for Screening and Follow-up of Bladder Cancer. *Korean J Urol*, 51, 88-93.
- CHU, H., WANG, M. & ZHANG, Z. 2013. Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility. *Journal of biomedical research*, 27, 170.
- COHN, J. A., VEKHTER, B., LYTTLE, C., STEINBERG, G. D. & LARGE, M. C. 2014. Sex disparities in diagnosis of bladder cancer after initial presentation with hematuria: A nationwide claims-based investigation. *Cancer*, 120, 555-561.
- COMPLOJ, E., MIAN, C., AMBROSINI-SPALTRO, A., DECHET, C., PALERMO, S., TRENTI, E., LODDE, M., HORNINGER, W. & PYCHA, A. 2013. uCyt+/ImmunoCyt and cytology in the detection of urothelial carcinoma: an update on 7422 analyses. *Cancer Cytopathol*, 121, 392-7.
- CORDON-CARDO, C., WARTINGER, D. D., MELAMED, M. R., FAIR, W. & FRADET, Y. 1992. Immunopathologic analysis of human urinary bladder cancer. Characterization of two new antigens associated with low-grade superficial bladder tumors. *Am J Pathol*, 140, 375-85.
- COTTON, S., AZEVEDO, R., GAITEIRO, C., FERREIRA, D., LIMA, L., PEIXOTO, A., FERNANDES, E., NEVES, M., NEVES, D., AMARO, T.,

- CRUZ, R., TAVARES, A., RANGEL, M., SILVA, A. M., SANTOS, L. L. & FERREIRA, J. A. 2017. Targeted O-glycoproteomics explored increased sialylation and identified MUC16 as a poor prognosis biomarker in advanced stage bladder tumours. *Mol Oncol*.
- DELNERO, A., ESPOSITO, N., CURRÒ, A., BIASONI, D., MONTANARI, E., MANGIAROTTI, B., TRINCHIERI, A., ZANETTI, G., SERRAGO, M. P. & PISANI, E. 1999. Evaluation of Urinary Level of NMP22 as a Diagnostic Marker for Stage pTa-pT1 Bladder Cancer: Comparison with Urinary Cytology and BTA Test. *European Urology*, 35, 93-97.
- DEMPKE, W. 2006. *Lehrbuch Hämato-Onkologie : Hämatologie - Onkologie - Hämostaseologie*, Bern, Huber.
- DENZINGER, S., BURGER, M., WALTER, B., KNUECHEL, R., ROESSLER, W., WIELAND, W. F. & FILBECK, T. 2007. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study. *Urology*, 69, 675-9.
- DIAGNOCURE™ 2000. ImmunoCyt™ - Technical Manual - in vitro diagnostic test for the detection of bladder cancer  
Québec, Canada: DiagnoCureINC.
- DKG, K. 2013. ONKO Internetportal.
- DKG, K. 2014. ONKO Internetportal. *Computertomografie (CT)*.
- DOBRUCH, J., DANESHMAND, S., FISCH, M., LOTAN, Y., NOON, A. P., RESNICK, M. J., SHARIAT, S. F., ZLOTTA, A. R. & BOORJIAN, S. A. 2016. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *European Urology*, 69, 300-310.
- EL-GHOBASHY, S., EL-LEITHY, T. R., ROSHDY, M. M. & EL-GANZOURY, H. M. 2007. Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term follow-up. *J Egypt Natl Canc Inst*, 19, 121-6.
- FEIL, G., BICHLER, K. H., PAULGEN-NELDE, H. J., HENNENLOTTER, J., ZUMBRAGEL, A. & STENZL, A. 2003. [ImmunoCyt--a new urine test in diagnosis of bladder cancer]. *Urologe A*, 42, 531-7.
- FRADET, Y., ISLAM, N., BOUCHER, L., PARENT-VAUGEOIS, C. & TARDIF, M. 1987. Polymorphic expression of a human superficial bladder tumor antigen defined by mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7227-31.
- FRADET, Y., LARUE, H., PARENT-VAUGEOIS, C., BERGERON, A., DUFOUR, C., BOUCHER, L. & BERNIER, L. 1990. Monoclonal antibody against a tumor-associated sialoglycoprotein of superficial papillary bladder tumors and cervical condylomas. *Int J Cancer*, 46, 990-7.
- FRADET, Y. & LOCKHARD, C. 1997. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: ImmunoCyt trade mark. *Can J Urol*, 4, 400-405.
- FUHRMANN, A. 2013. *Zahnärztliche Radiologie*, Georg Thieme Verlag.
- GAMARRA, M. C. & ZEIN, T. 1984. Cytologic spectrum of bladder cancer. *Urology*, 23, 23-26.

- GAMBUS, G., DE BOLOS, C., ANDREU, D., FRANCI, C., EGEEA, G. & REAL, F. X. 1993. Detection of the MUC2 apomucin tandem repeat with a mouse monoclonal antibody. *Gastroenterology*, 104, 93-102.
- GASSER, T. 2011. *Basiswissen Urologie : mit 13 Tab*, Heidelberg, Springer.
- GASSER, T. 2015. *Basiswissen Urologie. Springer-Lehrbuch, SpringerLink : Bücher*. 6., überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer.
- GOEBELL, P. J., GROSHEN, S. L. & SCHMITZ-DRÄGER, B. J. 2008. Guidelines for development of diagnostic markers in bladder cancer. *World Journal of Urology*, 26, 5-11.
- GREENE, K. L., BERRY, A. & KONETY, B. R. 2006. Diagnostic Utility of the ImmunoCyt/uCyt+ Test in Bladder Cancer. *Rev Urol*, 8, 190-7.
- GROSSFELD, G. D., WOLF, J. S., JR., LITWAN, M. S., HRICAK, H., SHULER, C. L., AGERTER, D. C. & CARROLL, P. R. 2001. Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of the AUA best practice policy recommendations. *Am Fam Physician*, 63, 1145-54.
- HAAG, P., HANHART, N. & MÜLLER, M. 2009. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis : inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen - 2010/11*, Breisach am Rhein, Med. Verl.- und Informationsdienste.
- HALL, M. C., CHANG, S. S., DALBAGNI, G., PRUTHI, R. S., SEIGNE, J. D., SKINNER, E. C., WOLF, J. S., JR. & SCHELLHAMMER, P. F. 2007. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol*, 178, 2314-30.
- HAMASAKI, T., SUZUKI, Y., TOMITA, Y., KIMURA, G. & KONDO, Y. 2010. Efficacy of transurethral resection of the bladder tumor (TUR-BT) for huge bladder cancer. *J Nippon Med Sch*, 77, 190-4.
- HARTGE, P., HARVEY, E. B., LINEHAN, W. M., SILVERMAN, D. T., SULLIVAN, J. W., HOOVER, R. N. & FRAUMENI, J. F. 1990. Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1636-1640.
- HAUTMANN, R. 2010. *Urologie : mit 143 Tabellen*, Heidelberg, Springer.
- HAUTMANN, S., TOMA, M., LORENZO GOMEZ, M. F., FRIEDRICH, M. G., JAEKEL, T., MICHL, U., SCHROEDER, G. L., HULAND, H., JUENEMANN, K. P. & LOKESHWAR, V. B. 2004. Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer: a side-by-side comparison. *Eur Urol*, 46, 466-71.
- HENNENLOTTER, J., HUBER, S., TODENHÖFER, T., KUEHS, U., SCHILLING, D., AUFDERKLAMM, S., GAKIS, G., SCHWENTNER, C. & STENZL, A. 2011. Point-of-Care Tests for Bladder Cancer: The Influencing Role of Hematuria. *Advances in Urology*, 2011, 937561.
- HERR, H. W. 2010. Re: Derya Tilki, Oliver Reich, Pierre I. Karakiewicz, et al. Validation of the AJCC TNM substaging of pT2 bladder cancer: deep muscle invasion is associated with significantly worse outcome. *Eur Urol* 2010;58:112-7. *Eur Urol*, 58, e21-2.
- HORSTMANN, M., TODENHOFER, T., HENNENLOTTER, J., AUFDERKLAMM, S., MISCHINGER, J., KUEHS, U., GAKIS, G., STENZL, A. &



- SCHWENTNER, C. 2013. Influence of age on false positive rates of urine-based tumor markers. *World J Urol*, 31, 935-40.
- JEONG, I. G., PARK, J., SONG, K., RO, J. Y., SONG, C., HONG, J. H., AHN, H. & KIM, C. S. 2011. Comparison of 2002 TNM nodal status with lymph node density in node-positive patients after radical cystectomy for bladder cancer: analysis by the number of lymph nodes removed. *Urol Oncol*, 29, 199-204.
- JIMENEZ, R. E., KEANE, T. E., HARDY, H. T. & AMIN, M. B. 2000. pT1 urothelial carcinoma of the bladder: criteria for diagnosis, pitfalls, and clinical implications. *Adv Anat Pathol*, 7, 13-25.
- KAATSCH, P., SPIX, C., HENTSCHEL, S., KATALINIC, A., LUTTMANN, S., STEGMAIER, C., CASPRITZ, S., CERNAJ, J., ERNST, A. & FOLKERTS, J. 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010.
- KAKEHI, Y., HIRAO, Y., KIM, W. J., OZONO, S., MASUMORI, N., MIYANAGA, N., NASU, Y. & YOKOMIZO, A. 2010. Bladder Cancer Working Group report. *Jpn J Clin Oncol*, 40 Suppl 1, i57-64.
- KAMAT, A. M., HEGARTY, P. K., GEE, J. R., CLARK, P. E., SVATEK, R. S., HEGARTY, N., SHARIAT, S. F., XYLINAS, E., SCHMITZ-DRAGER, B. J., LOTAN, Y., JENKINS, L. C., DROLLER, M., VAN RHIJN, B. W. & KARAKIEWICZ, P. I. 2013. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol*, 63, 4-15.
- KAUFMAN, D. S., SHIPLEY, W. U. & FELDMAN, A. S. 2009. Bladder cancer. *Lancet*, 374, 239-49.
- KIEMENEY, L. A., WITJES, J. A., VERBEEK, A. L., HEIJBROEK, R. P. & DEBRUYNE, F. M. 1993. The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. *Br J Cancer*, 67, 806-12.
- LAMM, D. L. & TORTI, F. M. 1996. Bladder cancer, 1996. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 46, 93-112.
- LAWRENTSCHUK, N., LEE, S. T. & SCOTT, A. M. 2013. Current role of PET, CT, MR for invasive bladder cancer. *Curr Urol Rep*, 14, 84-9.
- LEE, R. & DROLLER, M. J. 2000. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am*, 27, 1-13, vii.
- LODDE, M., MIAN, C., COMPLOJ, E., PALERMO, S., LONGHI, E., MARBERGER, M. & PYCHA, A. 2006. uCyt+ test: alternative to cystoscopy for less-invasive follow-up of patients with low risk of urothelial carcinoma. *Urology*, 67, 950-4.
- LODDE, M., MIAN, C., NEGRI, G., BERNER, L., MAFFEI, N., LUSUARDI, L., PALERMO, S., MARBERGER, M., BRSSNER, C. & PYCHA, A. 2003. Role of uCyt+ in the detection and surveillance of urothelial carcinoma. *Urology*, 61, 243-7.
- LODDE, M., MIAN, C., WIENER, H., HAITEL, A., PYCHA, A. & MARBERGER, M. 2001. Detection of upper urinary tract transitional cell carcinoma with ImmunoCyt: a preliminary report. *Urology*, 58, 362-6.
- LOKESHWAR, V. B., HABUCHI, T., GROSSMAN, H. B., MURPHY, W. M., HAUTMANN, S. H., HEMSTREET, G. P., 3RD, BONO, A. V., GETZENBERG, R. H., GOEBELL, P., SCHMITZ-DRAGER, B. J.,

- SCHALKEN, J. A., FRADET, Y., MARBERGER, M., MESSING, E. & DROLLER, M. J. 2005. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, 66, 35-63.
- LOKESHWAR, V. B. & SOLOWAY, M. S. 2001. Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol*, 165, 1067-77.
- LOPEZ-BELTRAN, A., BASSI, P., PAVONE-MACALUSO, M. & MONTIRONI, R. 2004. Handling and pathology reporting of specimens with carcinoma of the urinary bladder, ureter, and renal pelvis. *Eur Urol*, 45, 257-66.
- MAKAR, N. 1957. A note on the pathogenesis of cancer in the bilharzial bladder. *Br J Surg*, 45, 240-50.
- MBEUTCHA, A., LUCCA, I., MATHIEU, R., LOTAN, Y. & SHARIAT, S. F. 2016. Current Status of Urinary Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Urologic Clinics of North America*, 43, 47-62.
- MERKLE, W. & DIEDERICHS, W. 1997. *Urologie : mit 117 Tabellen*, Stuttgart, Hippokrates-Verl.
- MESSING, E. M., TEOT, L., KORMAN, H., UNDERHILL, E., BARKER, E., STORK, B., QIAN, J. & BOSTWICK, D. G. 2005. Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States. *J Urol*, 174, 1238-41.
- MIAN, C., LODDE, M., COMPLOJ, E., PALERMO, S., MIAN, M., MAIER, K. & PYCHA, A. 2005. The value of the ImmunoCyt/uCyt+ test in the detection and follow-up of carcinoma in situ of the urinary bladder. *Anticancer Res*, 25, 3641-4.
- MIAN, C., MAIER, K., COMPLOJ, E., LODDE, M., BERNER, L., LUSUARDI, L., PALERMO, S., VITTADELLO, F. & PYCHA, A. 2006. uCyt+/ImmunoCyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma: an update on 1991 analyses. *Cancer*, 108, 60-5.
- MIAN, C., PYCHA, A., WIENER, H., HAITEL, A., LODDE, M. & MARBERGER, M. 1999. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol*, 161, 1486-9.
- MILLAN-RODRIGUEZ, F., CHECHILE-TONIOLO, G., SALVADOR-BAYARRI, J., PALOU, J. & VICENTE-RODRIGUEZ, J. 2000. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol*, 163, 73-8.
- MITRA, A. P., JORDA, M. & COTE, R. J. 2012. Pathological possibilities and pitfalls in detecting aggressive bladder cancer. *Curr Opin Urol*, 22, 397-404.
- MUNGAN, N. A., KIEMENEY, L. A., VAN DIJCK, J. A., VAN DER POEL, H. G. & WITJES, J. A. 2000. Gender differences in stage distribution of bladder cancer. *Urology*, 55, 368-71.
- MURTA-NASCIMENTO, C., SILVERMAN, D. T., KOGEVINAS, M., GARCIA-CLOSAS, M., ROTHMAN, N., TARDON, A., GARCIA-CLOSAS, R., SERRA, C., CARRATO, A., VILLANUEVA, C., DOSEMECI, M., REAL, F. X. & MALATS, N. 2007. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 1595-600.

- ÖNAL, B., HAN, Ü., YILMAZ, S., KÖYBASIOĞLU, F. & ALTUĞ, U. 2015. The use of urinary nuclear matrix protein 22 (NMP22) as a diagnostic adjunct to urine cytology for monitoring of recurrent bladder cancer—institutional experience and review. *Diagnostic cytopathology*, 43, 307-314.
- OOSTERLINCK, W., LOBEL, B., JAKSE, G., MALMSTRÖM, P.-U., STÖCKLE, M. & STERNBERG, C. 2002. Guidelines on Bladder Cancer. *European Urology*, 41, 105-112.
- PAPANICOLAOU, G. N. & MARSHALL, V. F. 1945. URINE SEDIMENT SMEARS AS A DIAGNOSTIC PROCEDURE IN CANCERS OF THE URINARY TRACT. *Science*, 101, 519-20.
- PASHOS, C. L., BOTTEMAN, M. F., LASKIN, B. L. & REDAELLI, A. 2002. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*, 10, 311-22.
- PIATON, E., DANIEL, L., VERRIELE, V., DALIFARD, I., ZIMMERMANN, U., RENAUDIN, K., GOBET, F., CARATERO, A., DESVAUX, D., POUILLE, Y. & SEIGNEURIN, D. 2003. Improved detection of urothelial carcinomas with fluorescence immunocytochemistry (uCyt+ assay) and urinary cytology: results of a French Prospective Multicenter Study. *Lab Invest*, 83, 845-52.
- PLOEG, M., ABEN, K. K. & KIEMENEY, L. A. 2009. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*, 27, 289-93.
- REISENDE, D. 2005. "Blasenkrebs" [Online]. [www.wikipedia.de](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/TNM_Blasenkrebs.JPG). Available: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/TNM\\_Blasenkrebs.JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/TNM_Blasenkrebs.JPG) [Accessed 08.03.2017 2017].
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2017a. Zentrum für Krebsregisterdaten - Datenbankabfrage.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2017b. Zentrum für Krebsregisterdaten - Krebsarten. 17.12.2015 ed.
- SAGERMAN, P. M., SAIGO, P. E., SHEINFELD, J., CHARITONOWICS, E. & CORDON-CARDO, C. 1993. Enhanced detection of bladder cancer in urine cytology with Lewis X, M344 and 19A211 antigens. *Acta cytologica*, 38, 517-523.
- SAVIC, S., ZLOBEC, I., THALMANN, G. N., ENGELER, D., SCHMAUSS, M., LEHMANN, K., MATTARELLI, G., EICHENBERGER, T., DALQUEN, P., SPIELER, P., SCHOENEGG, R., GASSER, T. C., SULSER, T., FORSTER, T., ZELLWEGER, T., CASELLA, R. & BUBENDORF, L. 2009. The prognostic value of cytology and fluorescence in situ hybridization in the follow-up of nonmuscle-invasive bladder cancer after intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy. *International Journal of Cancer*, 124, 2899-2904.
- SCHMELZ, H. U. 2010. *Facharztwissen Urologie : differenzierte Diagnostik und Therapie*, Berlin ; Heidelberg [u.a.], Springer.
- SCHMITZ-DRÄGER, B. J., TIRSAR, L.-A., SCHMITZ-DRÄGER, C., DÖRSAM, J., MELLAN, Z., BISMARCK, E. & EBERT, T. 2008. Immunocytology in the assessment of patients with asymptomatic hematuria. *World Journal of Urology*, 26, 31-37.
- SCHMITZ-DRÄGER, B. J., TIRSAR, L. A., SCHMITZ-DRÄGER, C., DÖRSAM, J., EBERT, T. & BISMARCK, E. 2010. [Role of immunocytology in the

- evaluation of patients with painless gross hematuria]. *Urologe A*, 49, 741-6.
- SCHOLFIELD, D., SIMMS, M. & BISHOP, M. 2003. MUC1 mucin in urological malignancy. *BJU international*, 91, 560-566.
- SCHOLZ, M., BUCHER, A., DE SANTIS, M. & KLIMPFINGER, M. 2010. Leitlinie Blasenkarzinom. *J Urol Urogynäkol*, 12, 22-25.
- SCHROEDER, G. L., LORENZO-GOMEZ, M. F., HAUTMANN, S. H., FRIEDRICH, M. G., EKICI, S., HULAND, H. & LOKESHWAR, V. 2004. A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol*, 172, 1123-6.
- SCHWENZER, N. & EHRENFELD, M. 2010. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, Georg Thieme Verlag.
- SCIMEDX, C. 2007. Overview of Bladder Cancer.
- SCIMEDX, C. 2015. uCyt+ - INSTRUCTIONS - An in vitro Diagnostic Test. *An in vitro diagnostic test for the detection of bladder cancer* Denville.
- SECTION OF CANCER INFORMATION, I. 2014. Cancer Incidence in Five Continents Volume X.
- SHARIAT, S. F., SFAKIANOS, J. P., DROLLER, M. J., KARAKIEWICZ, P. I., MERYN, S. & BOCHNER, B. H. 2010. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int*, 105, 300-8.
- SÖKELAND, J., SCHULZE, H., RÜBBEN, H. & ALKEN, C.-E. 2008. *Taschenlehrbuch Urologie : 39 Tabellen*, Stuttgart [u.a.], Thieme.
- SOYUER, I., SOFIKERIM, M., TOKAT, F., SOYUER, S. & OZTURK, F. 2009. Which urine marker test provides more diagnostic value in conjunction with standard cytology- ImmunoCyt/uCyt+ or Cytokeratin 20 expression. *Diagn Pathol*, 4, 20.
- STENZL, A., COWAN, N. C., DE SANTIS, M., JAKSE, G., KUCZYK, M. A., MERSEBURGER, A. S., RIBAL, M. J., SHERIF, A. & WITJES, J. A. 2009. The updated EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol*, 55, 815-25.
- STENZL, A., COWAN, N. C., DE SANTIS, M., KUCZYK, M. A., MERSEBURGER, A. S., RIBAL, M. J., SHERIF, A., WITJES, J. A. & EUROPEAN ASSOCIATION OF, U. 2011. Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. *Eur Urol*, 59, 1009-18.
- STENZL, A. & KRUCK, S. 2009. Should photodynamic diagnosis be standard practice for bladder cancer? *Expert Rev Anticancer Ther*, 9, 697-9.
- STENZL, A., NAGELE, U., KUCZYK, M., SIEVERT, K.-D., ANASTASIADIS, A., SEIBOLD, J. & CORVIN, S. 2005. Cystectomy – Technical Considerations in Male and Female Patients. *EAU Update Series*, 3, 138-146.
- SULLIVAN, P. S., NOORAIE, F., SANCHEZ, H., HIRSCHOWITZ, S., LEVIN, M., RAO, P. N. & RAO, J. 2009. Comparison of ImmunoCyt, UroVysion, and urine cytology in detection of recurrent urothelial carcinoma: a "split-sample" study. *Cancer*, 117, 167-73.
- SYLVESTER, R. J. 2006. Natural History, Recurrence, and Progression in Superficial Bladder Cancer. *TheScientificWorldJOURNAL*, 6.

- SYLVESTER, R. J. & OOSTERLINCK, W. 2009. An immediate instillation after transurethral resection of bladder tumor in non-muscle-invasive bladder cancer: has the evidence changed? *European urology*, 56, 43-45.
- SYLVESTER, R. J., VAN DER MEIJDEN, A. P., OOSTERLINCK, W., WITJES, J. A., BOUFFIOUX, C., DENIS, L., NEWLING, D. W. & KURTH, K. 2006. 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*, 49, 466-5; discussion 475-7.
- TETU, B., TIGUERT, R., HAREL, F. & FRADET, Y. 2005. ImmunoCyt/uCyt+ improves the sensitivity of urine cytology in patients followed for urothelial carcinoma. *Mod Pathol*, 18, 83-9.
- THIEBLEMONT, C., FENDLER, J. P., TRILLET-LENOIR, V., PETRIS, C., CHAUVIN, F., BRUNAT-MENTIGNY, M., DEVAUX, Y., DEVONEC, M., GERARD, J. P. & PERRIN, P. 1996. [Prognostic factors of survival in infiltrating urothelial bladder carcinoma. A retrospective study of 158 patients treated by radical cystectomy]. *Bull Cancer*, 83, 139-46.
- TODENHÖFER, T., HENNENLOTTER, J., ESSER, M., MOHRHARDT, S., TEWS, V., AUFDERKLAMM, S., GAKIS, G., KUEHS, U., STENZL, A. & SCHWENTNER, C. 2013a. Combined application of cytology and molecular urine markers to improve the detection of urothelial carcinoma. *Cancer cytopathology*, 121, 252-260.
- TODENHOFER, T., HENNENLOTTER, J., KUHS, U., TEWS, V., GAKIS, G., AUFDERKLAMM, S., STENZL, A. & SCHWENTNER, C. 2012. Influence of urinary tract instrumentation and inflammation on the performance of urine markers for the detection of bladder cancer. *Urology*, 79, 620-4.
- TODENHÖFER, T., HENNENLOTTER, J., TEWS, V., GAKIS, G., AUFDERKLAMM, S., KUEHS, U., STENZL, A. & SCHWENTNER, C. 2013b. Impact of different grades of microscopic hematuria on the performance of urine-based markers for the detection of urothelial carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31, 1148-1154.
- TODENHÖFER, T., HENNENLOTTER, J., WITSTRUK, M., GAKIS, G., AUFDERKLAMM, S., KUEHS, U., STENZL, A. & SCHWENTNER, C. 2012. Influence of renal excretory function on the performance of urine based markers to detect bladder cancer. *The Journal of urology*, 187, 68-73.
- TOMA, M. I., FRIEDRICH, M. G., HAUTMANN, S. H., JAKEL, K. T., ERBERSDOBLER, A., HELLSTERN, A. & HULAND, H. 2004. Comparison of the ImmunoCyt test and urinary cytology with other urine tests in the detection and surveillance of bladder cancer. *World J Urol*, 22, 145-9.
- TOSONI, I., WAGNER, U., SAUTER, G., EGLOFF, M., KNÖNAGEL, H., ALUND, G., BANNWART, F., MIHATSCH, M., GASSER, T. & MAURER, R. 2000. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU international*, 85, 48-53.
- UICC 2015. UICC Global Cancer Control. *UICC Global Cancer Control*.

- VAN RHIJN, B. W., VAN DER POEL, H. G. & VAN DER KWAST, T. H. 2005. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*, 47, 736-48.
- VINEIS, P., TALASKA, G., MALAVEILLE, C., BARTSCH, H., MARTONE, T., SITHISARANKUL, P. & STRICKLAND, P. 1996. DNA adducts in urothelial cells: relationship with biomarkers of exposure to arylamines and polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco smoke. *International journal of cancer*, 65, 314-316.
- VRIESEMA, J. L., ATSMA, F., KIEMENEY, L. A., PEELEN, W. P., WITJES, J. A. & SCHALKEN, J. A. 2001. Diagnostic efficacy of the ImmunoCyt test to detect superficial bladder cancer recurrence. *Urology*, 58, 367-71.
- WITJES, J. A., COMPÉRAT, E., COWAN, N. C., DE SANTIS, M., GAKIS, G., LEBRET, T., RIBAL, M. J., VAN DER HEIJDEN, A. G. & SHERIF, A. 2014. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2013 Guidelines. *European Urology*, 65, 778-792.
- ZEEGERS, M. P., TAN, F. E., DORANT, E. & VAN DEN BRANDT, P. A. 2000. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*, 89, 630-9.
- ZELLWEGER, T., BENZ, G., CATHOMAS, G., MIHATSCH, M. J., SULSER, T., GASSER, T. C. & BUBENDORF, L. 2006. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 119, 1660-1665.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1; Kontingenztabelle der Zellgruppe G2 + R2 (definitiv positive grüne und rote Zellen und grüne und rote Borderline-Zellen) und der Patienten mit oder ohne Tumor bei dem ‚cut off‘-Wert von 0 .....	43
Tabelle 2: Kontingenztabelle der Zellgruppen G1-G3 und R1-R3 und der Patienten mit oder ohne Tumor bei den ‚cut off‘-Werten von 0, 3 und 5....	48
Tabelle 3; Sensitivität, Spezifität, PPV (positiver prädiktiver Wert), NNV (negativer prädiktiver Wert) und Akkuratessse der Zellgruppen G1-G3 und R1-R3 bei den ‚cut off‘-Werten von 0, 3 und 5 (in %) .....	49
Tabelle 4; Kontingenztabelle der Zellgruppen G1 + R1, G2 + R2 und G3 + R3 und der Patienten mit oder ohne Tumor bei variierenden ‚cut off‘-Werten	52
Tabelle 5; Werte für die Sensitivität, die Spezifität, den positiven und den negativen prädiktiven Wert (PPV und NPV) und die Akkuratessse für die Zellgruppen G1 + R1, G2 + R2 und G3 + R3 bei variierenden ‚cut off‘-Werten (in %) .....	54
Tabelle 6; Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte für die grünen und roten Zellen bei Betrachtung der jeweiligen Tumorstadien im Kollektiv der Patienten mit Tumor .....	55
Tabelle 7; Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte für die jeweiligen Zellgruppen bei Betrachtung der Invasivität der Tumoren im Kollektiv der Patienten mit Tumor .....	57
Tabelle 8; Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte für die jeweiligen Zellgruppen bei Betrachtung der Tumorgrade 1-3 im Kollektiv der Patienten mit Tumor.....	58
Tabelle 9; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten.....	59
Tabelle 10; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Hämaturie-Typs .....	60

Tabelle 11; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit der angewendeten Urinentnahme-Methode .....	61
Tabelle 12; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Harnwegsinfekts (HWI) .....	62
Tabelle 13; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) oder eines Prostatakarzinoms (PC) .....	63
Tabelle 14; Mittelwerte, Medianwerte (Interquartilsabstand 25%-75%) und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Geschlechts .....	64
Tabelle 15; Determinationskoeffizient $R^2$ und p-Werte der Zellgruppen G2, R2, G3 und R3 im Kollektiv der Patienten ohne Tumor in Abhängigkeit des Alters .....	65
Tabelle 16; Darstellung der Kontingenz des uCyt+-Ergebnisses und der Gruppen 1 + 2 (Gruppe 1: Tumornegativ oder Zytologie positiv; Gruppe 2: Tumorpositiv und Zytologie negativ) links bei Wertung der Zellgruppen G2 + R2 und rechts bei Wertung der Zellgruppen G3 + R3 .....	66



## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1; Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) - Angaben in Prozent (Robert-Koch-Institut, 2017b) .....	2
Abbildung 2; TNM-Klassifikation für Harnblasenkarzinome (Schmelz, 2010).....	5
Abbildung 3; Invasionstiefen des Harnblasenkarzinoms (Stadien Ta-T3b) in Bezug auf die Harnblasenwand (Reisende, 2005) .....	6
Abbildung 4; Einteilung der Harnblasentumore nach der WHO-Klassifikation von 2004 .....	7
Abbildung 5; Beispiel von roten, eindeutig negativen Zellen ohne granulierende Fluoreszenz aus einem Studienpräparat (21.08.2014) .....	33
Abbildung 6; Beispiel einer roten definitiv positiven Zelle mit granulierender Fluoreszenz in > 50% der Zytoplasmafläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014) .....	34
Abbildung 7; Beispiel einer grünen definitiv positiven Zelle mit granulierender Fluoreszenz in > 50% der Zytoplasmafläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014) .....	34
Abbildung 8; Beispiel einer roten Borderline-Zelle mit granulierender Fluoreszenz in < 50% der Zytoplasmafläche aus einem Studienpräparat, 40-fache Vergrößerung (21.08.2014) .....	35
Abbildung 9; Beispiel einer roten unerschwelligen Zelle mit granulierender Fluoreszenz in < 50% der Zytoplasmafläche aus einem Studienpräparat, 40-ache Vergrößerung (21.08.2014) .....	35
Abbildung 10; Einteilung der unterschiedlichen Fluoreszenzausprägungen in die Zellgruppen G1-3 und R1-3.....	37
Abbildung 11; Vier-Felder-Tafel (Kontingenztafel) mit Formeln zur Berechnung von Spezifität, Sensitivität, PPV (positiver prädiktiver Wert) und NPV (negativer prädiktiver Wert); Akkuratessse: $(A+D)/(A+B+C+D)$ .....	38
Abbildung 12; Beispiel einer ROC-Kurve mit ‚best cut off‘ bei einer Sensitivität von 42,65% und einer Spezifität von 94,7%, $AUC = 0,68799$ .....	39

Abbildung 13; Altersverteilung des endgültigen Patientenkollektivs in Jahren . 42	
Abbildung 14; Tumorverteilung im Patientenkollektiv nach zystoskopischen und histologischen Ergebnissen (in%) .....	43
Abbildung 15; Verteilung der Tumorstadien innerhalb des Kollektivs mit Tumor (in %).....	44
Abbildung 16; Verteilung des Tumorgades bei Patienten mit Harnblasentumor (in %).....	44
Abbildung 17; Übersicht über die mittels der ROC-Kurve bei dem jeweiligen 'best cut off'-Wert ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten (in %), sowie die AUC-Werte des uCyt+-Tests bei Wertung der verschiedenen Zellgruppen G1-G3 und R1-R3 .....	50
Abbildung 18; ROC-Kurve bei Betrachtung der Zellgruppe G1; 'best cut off'-Wert bei $\geq 3$ Zellen $\rightarrow$ Sensitivität = 47,1%, Spezifität = 89,1%; AUC = 0,67966 .....	51
Abbildung 19; ROC-Kurve bei Betrachtung der Zellgruppe R1; 'best cut off'-Wert bei $\geq 3$ Zellen $\rightarrow$ Sensitivität = 42,7%, Spezifität = 95%; AUC = 0,688972 51	
Abbildung 20; ROC-Kurve bei Betrachtung der Zellgruppe G2; 'best cut off'-Wert bei $\geq 2$ Zellen $\rightarrow$ Sensitivität = 61,8%, Spezifität = 79,8%; AUC = 0,70444 .....	51
Abbildung 21; ROC-Kurve bei Betrachtung der Zellgruppe R2; 'best cut off'-Wert bei $\geq 3$ Zellen $\rightarrow$ Sensitivität = 61,8%, Spezifität = 92,6%; AUC = 0,77468 51	
Abbildung 22; ROC-Kurve bei Betrachtung der Zellgruppe G3; 'best cut off'-Wert bei $\geq 3$ Zellen $\rightarrow$ Sensitivität = 61,8%, Spezifität = 61,4%; AUC = 0,62087 .....	51
Abbildung 23; ROC-Kurve bei Betrachtung der Zellgruppe R3; 'best cut off'-Wert bei $\geq 3$ Zellen $\rightarrow$ Sensitivität = 63,2%, Spezifität = 82,5%; AUC = 0,73414 51	
Abbildung 24; Vergleich der richtig- und falsch-positiven Ergebnisse für den 'cut off' von 0 bei gemeinsamer Wertung der roten und grünen Zellen.....	53
Abbildung 25; Werte für die Sensitivität und die Spezifität (in %) des uCyt+-Tests bei Wertung der verschiedenen Zellgruppen G1 + R1, G2 + R2 und G3 + R3 bei den 'cut off'-Werten von 0, 3 und 5 .....	53

Abbildung 26; Boxplot der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen (Zellgruppe R1) in Bezug auf die Tumorstadien im Kollektiv der Patienten mit Tumor; p-Wert = 0,0267.....	56
Abbildung 27; Boxplot der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen und roten Borderline-Zellen (Zellgruppe R2) in Bezug auf die Tumorstadien im Kollektiv der Patienten mit Tumor; p-Wert = 0,2909.....	56
Abbildung 28; Boxplot der Anzahl der definitiv positiven roten Zellen (Zellgruppe R1) in Bezug auf die Invasivität der Tumore, p-Wert = 0,0384.....	57
Abbildung 29; Boxplot der Zellanzahl der Zellgruppen G3 (p-Wert = 0,0005) und R3 (p-Wert = 0,0447) für den Einfluss der mechanischen Manipulation im Kollektiv der Patienten ohne Tumor .....	61
Abbildung 30; Boxplot der Zellanzahl der Zellgruppen G3 (p-Wert = 0,0311) in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) oder eines Prostatakarzinoms (PC) im Kollektiv der Patienten ohne Tumor.....	63
Abbildung 31; Boxplot der Zellanzahl der Zellgruppen G2 (p-Wert = 0,0227), G3 (p-Wert = 0,0175) und R3 (p-Wert = 0,0408) für Männer und Frauen im Kollektiv der Patienten ohne Tumor .....	64

## 10 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Dissertationsschrift wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. C. Schwentner durchgeführt.

An der Konzeption und Betreuung der Arbeit waren PD Dr. med. Tilman Todenhöfer, Dr. med. Steffen Rausch und Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter beteiligt. Das Manuskript wurde von Dr. med. Steffen Rausch und Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter überprüft.

Sämtliche Auswertungen der Urinproben mittels des Fluoreszenzmikroskops und deren Dokumentation erfolgten während des Zeitraums vom 02.11.2006 bis zum 27.11.2009 durch das Team des urologischen Labors der Klinik für Urologie Tübingen. Teile der Datenbank wurden von Dr. med. dent. Marc Witstruk übernommen, überprüft und ergänzt.

Die statistischen Auswertungen wurden nach Anleitung von Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter von mir persönlich durchgeführt.

Ich versichere hiermit die Dissertationsschrift selbstständig verfasst und ausschließlich die in der Arbeit angegebenen Quellen genutzt zu haben.

Die Veröffentlichung der vorliegenden Daten in einer wissenschaftlichen Publikation mit dem Titel ‚Impact of variant microscopic interpretation of the uCyt+ immunocytological urine test for the detection of bladder cancer‘ von Schnürer et al. ist in Vorbereitung.

Mainz, den 12.04.2017

---

Jennifer Schwarz

## 11 Danksagung

Bei Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, dem Ärztlichen Direktor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen möchte ich für die Ermöglichung zur Durchführung dieser interessanten Arbeit und für die Bereitstellung der nötigen Mittel bedanken.

In diesem Rahmen möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christian Schwentner für das Betreuen und das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. med. Steffen Rausch für das nette Betreuungsverhältnis und die investierte Zeit sowie die konstruktive Kritik und fachliche Unterstützung beim Anfertigen dieser Dissertationsschrift. Auch bei PD Dr. med. Tilman Todenhöfer möchte ich mich für das Betreuen meiner Arbeit bedanken.

Herzlich möchte ich mich bei Dipl.- Biol. Jörg Hennenlotter, dem Leiter des Labors der Klinik für Urologie bedanken, der mich mit großer Mühe und Fachkenntnis unterstützt hat. Dank seinem Humor und den eingestreuten Fotoshootings war im Labor stets für Spaß bei der Arbeit gesorgt.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Team des urologischen Labors der Klinik für Urologie Tübingen, insbesondere bei Frau Valentina Gerber, Frau Gunthild Berger und Frau Ursula Kühs für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken.

Dr. med. dent. Marc Witstruk danke ich dafür, dass er mir seine ehemalige Dissertationsdatenbank zur Verfügung stellte, die als Grundlage für meine Datenzusammenstellung diente.

Auch meine Freunde, die mich während des Studiums begleitet und unterstützt haben, verdienen für die vielen hilfreichen Tipps und die motivierenden Worte meinen herzlichen Dank. Ganz besonders bei Thomi, der mir während der Anfertigung dieser Arbeit immer hilfreich, motivierend und verlässlich zur Seite stand

und dessen Hilfe und Mühe ich sehr zu schätzen weiß, möchte ich mich von Herzen bedanken. Durch aufmerksames Korrekturlesen und zahlreiche Tipps hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Von ganzem Herzen danken möchte ich meinen Eltern Agnes Jörger und Otto Schwarz, die mir mein Studium und die Anfertigung dieser Dissertationsschrift ermöglicht, mich ermutigt, uneingeschränkt unterstützt und jederzeit an mich geglaubt haben. Besonders meinen drei Schwestern Jolanda, Leila und Samira möchte ich dafür danken, dass sie mich auf die unterschiedlichsten Weisen unterstützt und meinen Weg geprägt haben. Sei es durch verständnisvolles Zuhören, wertvolle Tipps oder durch die Ablenkung und Bestätigung durch frohes Kinderlachen.