



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Departament de Cirurgia

Programa de Doctorat de Cirurgia i Ciències Morfològiques

Facultat de Medicina

**Evaluación de una prueba rápida de citoqueratinas 8 y 18
en orina para la detección del carcinoma urotelial vesical**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Fernando Agreda Castañeda

para optar al título de Doctor en Medicina por la Universitat Autònoma de Barcelona

(UAB). Barcelona, 2020.

Directores

Juan Morote Robles

Carles Xavier Raventós Busquets

Tutor:

Juan Morote Robles

Escola de Doctorat

El Dr. Juan Morote Robles, catedrático de la Universitat Autònoma de Barcelona y Consultor Senior del Servicio de Urología del Hospital Universitario Vall d’Hebron y el Dr. Carles Xavier Raventós Busquets, profesor asociado de la Universitat Autònoma de Barcelona y Jefe Clínico del Servicio de Urología del Hospital Universitario Vall d’Hebron.

Certifican:

Que la tesis doctoral titulada **“Evaluación de una prueba rápida de citoqueratinas 8 y 18 en orina para la detección del carcinoma urotelial vesical”**, presentada por Fernando Agreda Castañeda, para optar al título de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección, cumpliendo los requisitos formales y científicos para su lectura y defensa pública.

Para que conste a tales efectos, firmamos la presente certificación en Barcelona, junio de 2020.

Juan Morote Robles (Director y Tutor)

Carles X. Raventós Busquets (Codirector)

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	7
INDICE DE ACRONIMOS.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	17
INTRODUCCION.....	23
1. Epidemiología.....	25
2. Etiología.....	25
3. Clasificación histológica	28
4. Diagnóstico del TVNMI.....	32
5. Recidiva y progresión en el TVNMI	34
6. Tratamiento inicial del TVNMI	38
7. Tratamiento adyuvante del TVNMI.....	40
8. Vigilancia del TVNMI	42
9. Marcadores urinarios para el diagnóstico del TVNMI.....	44
10. Ensayos con proteínas urinarias en el diagnóstico del TVNMI	51
11. ¿Por qué no se han implementado marcadores urinarios en la vigilancia del TVNMI?.....	66
12. Motivación	67

HIPOTESIS	71
OBJETIVOS	75
METODOLOGIA.....	79
1. Marcadores urinarios en la vigilancia del tumor vesical no músculo infiltrante. Revisión de la literatura	81
2. Assessing the clinical benefit of UBC Rapid® in surveillance and initial diagnosis of bladder cancer.....	83
RESULTADOS (publicaciones)	87
Publicación 1	89
Marcadores urinarios en la vigilancia del tumor vesical no músculo infiltrante. Revisión de la literatura	
Publicación 2	101
Assessing the Clinical Benefit of UBC Rapid® in the Surveillance and Initial Diagnosis of Bladder Cancer	
DISCUSION.....	109
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFIA.....	123
ANEXO	159
Informe aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (Hospital Vall d’Hebron)	161

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas, directa o indirectamente, han intervenido para llevar a cabo este proyecto. Empezaré desde mi principio.

Mis abuelos maternos, Kiko y Doris han sido fundamentales para mi desarrollo como hombre de ciencia. Su tenacidad, su inmensidad y su gran humildad han sido, son y serán un gran ejemplo para mí.

Mis padres (Dra. mama Idalia y Dr. papa Campo) me dirigieron a la medicina. Fueron una pareja improbable en un entorno extraordinario. Pasaron temporadas muy difíciles. A pesar de esto han logrado llevar a cabo cosas tan inverosímiles como criar correctamente dos hijos y una hija.

A mis compañeros/as en el curso de mi formación en medicina primero y urología después. Mis “resis”, todos/as, han sido fundamentales para culminar este proyecto. El hospital siempre fue como un hogar con todos ellos/as. El ambiente laboral es complicado, pero su compañía siempre lo ha hecho no solo aceptable si no agradable. En especial quiero agradecer a los que colaboraron en la toma de las muestras necesarias para este proyecto. Por orden de antigüedad son: Carlos Gasanz, Ricardo López, Ignacio Arroyo (+), Mercè Cuadras, Enric Miret, Aina Salazar, Adrián Torres, Ignasi Gallardo y Fernando Díaz.

Finalmente, un reconocimiento especial a mi Paola, a Carles Xavier y al Prof. Juan Morote. Han sido mis más importantes lectores y mis más agudos críticos.

Este pequeño trabajo es para todos ustedes.

INDICE DE ACRONIMOS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- BCG: bacilo de Calmette-Guérin
- BTA: proteína H relacionada al complemento
- CiS: carcinoma in situ
- CK: citoqueratina
- CUETO: Club Urológico Español del tratamiento Oncológico
- CYFRA-21: cytokeratin fragments 21
- ELISA: enzyme linked immunosorbent assay
- EORTC: European Organization for Research & Treatment of Cancer
- FISH: fluorescent in situ hybridization
- FN: fibronectina
- LOH: loss of heterozigosity
- MMP: matrix metalloproteinases
- MS: microsátélites
- NMP22: nuclear matrix protein 22
- PdC: punto de control
- ROC: receiver operating characteristic
- RTU: resección transuretral
- TV: tumor vesical
- TVNMI: tumor vesical no músculo invasor
- TVMI: tumor vesical músculo invasor
- UBC: urinary bladder cancer
- VPN: valor predictivo negativo

RESUMEN

El tumor vesical (TV) es la neoplasia maligna más común del tracto urinario. En Europa la mayor tasa de incidencia ajustada por edad se da en España (41,5 en hombres y 4,8 en mujeres) y la más baja en Finlandia (18,1 en hombres y 4,3 en mujeres). En España se diagnostican 12.000 nuevos casos anualmente. El TV se puede clasificar en tumor músculo invasor (TVMI) y no músculo invasor (TVNMI) dependiendo de la afectación del músculo detrusor vesical en el estudio histológico. El diagnóstico del TV se basa en la cistoscopia, que se debe realizar ante la sospecha clínica. En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 75% de los TV son TVNMI. El diagnóstico histológico y tratamiento del TVNMI se realiza a través de la biopsia/resección vesical transuretral (RTU). Una vez establecido el diagnóstico, y con los datos histológicos, se puede estimar el riesgo individual de recidiva y progresión. La vigilancia del TVNMI se realiza con cistoscopias y citologías urinarias seriadas. El tiempo total de vigilancia y la frecuencia de las cistoscopias depende del riesgo individualizado.

La cistoscopia es un procedimiento costoso e invasivo. Por esta razón y buscando simplificar la vigilancia del TVNMI, desde hace más de 30 años se realizan ensayos en orina con el objetivo de hacer el diagnóstico de manera no invasiva. El objetivo principal de los ensayos en orina debería ser integrarse en un protocolo de vigilancia que mejore el existente. La mejor manera de mejorar la vigilancia sería reducir el número de cistoscopias necesarias.

La primera parte de nuestro proyecto ha consistido en revisar la literatura en busca de marcadores/ensayos que hayan demostrado poder mejorar la vigilancia del TVNMI. Se realizó una revisión sistemática de la última década, restringida a marcadores utilizados en la vigilancia. Encontramos que los altos valores predictivos negativos de varios ensayos permitirían reducir el número de cistoscopias en la vigilancia del TVNMI. Seis ensayos de factores de transcripción tuvieron un valor predictivo negativo superior al 90% y uno de ellos, además, se puede realizar en el punto de control. Dos ensayos de factores de transcripción y uno de proteínas demostraron reducir entre el 23% y el 35% del número de cistoscopias realizadas durante la vigilancia. Sin embargo, a pesar de estos buenos resultados, actualmente ninguno de estos ensayos está recomendado para sustituir a la cistoscopia.

Con el objetivo de seleccionar los pacientes con mayor riesgo de recidiva durante la vigilancia y reducir el número de cistoscopias, decidimos evaluar un ensayo, basado en la determinación de proteínas urinarias, que además permite obtener resultados inmediatos en el punto de control (PdC). El UBC (Urinary Bladder Cancer) Rapid® es un ensayo que detecta la presencia de las citoqueratinas 8 y 18 en la orina. De manera prospectiva realizamos el ensayo a 336 pacientes (297 en vigilancia de TVNMI y 39 con diagnóstico inicial). Los hallazgos descritos en la cistoscopia (tamaño y número de tumores), antecedentes de TVNMI, género, edad, tiempo desde la última cirugía transuretral, tratamiento endovesical previo con instilaciones de BCG

y resultados de la citología urinaria fueron documentados. En el grupo de vigilancia fueron diagnosticadas 27 recidivas tumorales (9.8%). En este grupo, UBC Rapid® demostró tener un mejor rendimiento diagnóstico en los TV de alto riesgo. En los pacientes con TV inicial, se observó que el único predictor independiente de elevación y/o positividad UBC Rapid® es el tamaño tumoral. Dado que el nivel de UBC Rapid® depende del tamaño tumoral y que las recidivas durante la vigilancia de los TVNMI suelen ser de pequeño tamaño, como media 5 mm de diámetro, la sensibilidad de UBC Rapid® fue baja. En el grupo de vigilancia, la sensibilidad global fue de 33% y de 46% en los TVNMI de alto riesgo. De esta manera, si sólo hiciéramos cistoscopia a los pacientes con UBC Rapid® positivo evitaríamos un 66% de cistoscopias, pero dejaríamos de diagnosticar 7 de 13 recidivas tumorales de alto riesgo.

Concluimos que la implementación de UBC Rapid® en la vigilancia del TVNMI podría reducir el número global de cistoscopias, pero dejando de diagnosticar la mitad de las recidivas tumorales de alto riesgo y por ello no recomendamos su utilización en el escenario de la vigilancia del TVNMI.

ABSTRACT

Bladder cancer (BC) is the most common malignant neoplasia of the urinary tract. In Europe, the highest age-standardized incidence rate has been reported in Spain (41,5 in men and 4,8 in women) and the lowest in Finland (18.1 in men and 4.3 in women). In Spain, we diagnose 12000 new cases every year. BC can be classified in muscle-invasive BC (MIBC) and non-muscle invasive BC (NMIBC) depending on the affection of bladder detrusor muscle in the histologic specimen. Diagnosis of BC is based in cystoscopy, which should be done whenever there is a clinical suspicion. At diagnosis, circa 75% of BC are NMIBC. The definitive diagnosis and initial treatment of NMIBC is given by trans-urethral resection (TUR). Once we have the diagnosis and the whole histological data, the risk of recurrence and progression can be estimated. Surveillance of NMIBC is performed by cystoscopies and urine cytology. The whole time of surveillance and the frequency of cystoscopic examinations depend on the risk group.

Cystoscopy is an expensive and invasive method of diagnosis. For these reasons and trying to simplify surveillance of NMIBC, urologist have been using urinary assays for around 30 years. The main objective of these assays should be to be part of an alternative surveillance protocol that can improve the actual one. The best manner to improve surveillance is to reduce the number of cystoscopies in surveillance.

The first part of our project was to perform a literature review for assays that had proven to improve the surveillance of NMIBC by reducing cystoscopies. We did a systematic review of published papers of the last decade, focusing only in assays used in surveillance. The negative predictive values (NPV) of several assays could reduce the number of cystoscopies in NMIBC surveillance. Six transcription-factor assays had an NPV rate greater than 90%, and one of them can be performed at point of control. Two transcription factors and one protein assays proved reduction between 23% and 35% of surveillance cystoscopies. Despite this data, no assay / marker is recommended to replace cystoscopy.

Aiming to reduce cystoscopies by selecting high risk patients, we decided to use a protein assay with immediate results (point-of-care, PoC) in our study. We employed UBC Rapid[®], a PoC assay that detects cytokeratins 8 and 18 in urine. We performed the UBC Rapid[®] assay in 336 patients, 297 in surveillance for non–muscle-invasive bladder cancer and 39 with newly diagnosed bladder cancer. Data on cystoscopy findings (size and number of tumors), bladder tumor antecedents, gender, age, time since last TUR, previous treatment with BCG and voided urine cytology were collected. We diagnosed 27 recurrences (9.8%) in the surveillance group. In this group, UBC Rapid[®] sensitivities were better in high risk BC. In the newly diagnosed, the only independent predictor of UBC Rapid[®] elevation / positivity was tumor size. As the urine level of UBC Rapid[®] relates to tumor size and recurrences

during surveillance tend to be small, media of 5 mm, the sensitivity of UBC Rapid® was poor. In surveillance group, overall sensitivity was 33% and 46% in high risk NMIBC. Thereby, performing cystoscopies only in UBC Rapid® positive patients would avoid 184 cystoscopies (66%) but missing 7 out of 13 high risk recurrences.

We concluded that restrict cystoscopies to UBC Rapid® positive patients could result in reduction of surveillance cystoscopies but missing half of high-risk recurrences. For this reason, we do not recommend its use in surveillance of NMIBC.

INTRODUCCION

1. Epidemiología

El tumor vesical (TV) es la neoplasia maligna más común del tracto urinario. De forma global es la séptima más frecuente en hombres y la undécima al considerar ambos sexos¹. A nivel mundial la tasa de incidencia ajustada por edad (por 100000 persona/años) es 9,0 para hombres y 2,2 para mujeres¹. En Europa la mayor tasa incidencia ajustada por edad se da en España (41,5 en hombre y 4,8 en mujeres) y la más baja en Finlandia (18,1 en hombre y 4,3 en mujeres). En España se diagnostican 12.000 nuevos casos anualmente². Mundialmente, la tasa de mortalidad ajustada por edad (por 100000 persona/años) asociada al TV fue de 3,2 para hombres y 0,9 para mujeres en 2015¹. La incidencia y la mortalidad del TV varían según regiones debido a diferentes factores de riesgo, variantes histológicas, métodos de diagnóstico y disponibilidad de tratamiento.

2. Etiología

2.1. Tabaquismo: fumar tabaco es el factor independiente más relacionado con el TV³. Se ha establecido que produce entre el 50% y 65% de los casos en hombres y entre el 20% y 30% en mujeres³. La incidencia del TV está además relacionada con la duración y la intensidad del tabaquismo, a mayor tiempo de fumador/a y mayor cantidad de cigarrillos diarios, mayor incidencia de TV⁴. El primer consejo a un paciente con TV es cesar el tabaquismo⁵. Dejar el hábito tabáquico resulta en disminución inmediata del

riesgo de TV en aproximadamente un 40% menos entre los primeros 1 a 4 años y 60% menos a los 25⁴. Cesar el hábito de fumador disminuye el riesgo de TV por igual en hombres y mujeres³.

2.2.Exposición ocupacional a químicos: es el segundo factor más importante relacionado con el TV. El TV relacionado al trabajo es aproximadamente un 20-30% de todos los casos en algunas series y está más asociado a profesiones que utilizan tintes, cauchos, textiles, pinturas, cueros y químicos industriales⁶. En personas expuestas a aminas aromáticas el riesgo de TV es significativamente mayor a los 10 años y persiste hasta 30 años de la exposición⁷.

2.3.Radioterapia: se han reportado tasas elevadas de TV en pacientes sometidos a radioterapia externa pélvica por tumores ginecológicos, con riesgos relativos de entre 2 y 4⁸. Con el advenimiento de nuevos tipos de radioterapia (de intensidad modulada) en, por ejemplo, el cáncer de próstata se ha sugerido que el riesgo de TV secundario sea menor. A pesar de esto y dado que el TV requiere un tiempo muy largo para su desarrollo, habrá que esperar los resultados a largo plazo⁸.

2.4.Factores dietéticos: se han relacionado varios tipos de alimentos y dietas con la aparición del TV, con resultados controversiales. Un estudio, que sigue en marcha, no encontró relación entre el TV y el consumo de agua, carnes rojas, frutas o vegetales. En cambio, parece haber una relación

inversa con el consumo de flavonoides y ligninas, especialmente en los TV más agresivos⁹.

2.5. *Infecciones crónicas vesicales y esquistosomiasis*: la esquistosomiasis es una parasitosis muy prevalente en el Caribe, África, Asia y América del Sur. Se estima que aproximadamente hay unas 600 millones de personas afectadas, lo que la convierte en la segunda parasitosis a nivel mundial (precedida solo por la malaria)¹⁰. Se ha establecido una relación causal entre la infección por esquistosoma y el TV urotelial y el de estirpe escamosa¹¹. De manera similar, estudios de casos y controles han relacionado la aparición de TV con infecciones crónicas no producidas por esquistosoma¹².

2.6. *Género*: a pesar de que el TV es más frecuente en hombres, en las mujeres suele diagnosticarse en estadios más avanzados y con peor supervivencia general y cáncer específica¹³. Estos hallazgos también se han demostrado en análisis descriptivos de población austriaca¹⁴. Sin embargo, estas diferencias en mortalidad son debatibles; un estudio canadiense demostró que después de ajustar por el tipo de tratamiento recibido no había diferencias de supervivencia general o cáncer específica entre ambos géneros¹⁵. Otro estudio poblacional norteamericano sugiere que las diferencias de mortalidad tienen que ver con el retraso en el diagnóstico. En las mujeres, el diagnóstico diferencial del TV incluye patologías más prevalentes y menos graves, lo que podría retrasar el diagnóstico¹⁶.

2.7. *Factores genéticos*: cada vez hay más evidencia que sugiere la asociación de factores genéticos al desarrollo del TV. Un estudio poblacional reciente demostró un aumento de la frecuencia de TV en familiares de primer y segundo grado independientemente del hábito tabáquico y los factores ambientales¹⁷. Estudios recientes han detectado locus específicos e independientes y que están asociados al TV¹⁸.

3. Clasificación histológica

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) describe varios tipos histológicos de TV (Ver Tabla 2). El 90% de los diagnósticos corresponde a tumor urotelial⁵. Los tipos histológicos que siguen en frecuencia son el TV escamoso, el adenocarcinoma y el TV bilarzhial (secundario a esquistosomiasis). De acuerdo con la OMS, para que un TV sea categorizado como un tipo diferente del urotelial, el 100% del tumor debe representar el tipo histológico descrito. Cualquier otro porcentaje de representación corresponde un TV urotelial con diferenciación.

El TV se puede clasificar en tumor músculo invasor (TVMI) y no músculo invasor (TVNMI) dependiendo de la afectación del músculo detrusor en el estudio histológico (Ver Tabla 1). Además, en el caso del TVNMI se deberá asignar un grado histológico⁵.

3.1. *Tumor vesical Músculo invasor*: el TVMI por definición es de alto grado. Teniendo esto en consideración, determinar las variantes histológicas

puede ayudar a predecir la evolución de la enfermedad y la respuesta a terapias¹⁹. Las variantes histológicas aceptadas actualmente se pueden ver en la Tabla 1. De manera general, las variantes no uroteliales suelen comportar menor sobrevida global y cáncer específica⁵. En la enfermedad músculo invasora el tratamiento debe ser radical (cistectomía radical más reconstrucción de la vía urinaria inferior) juntamente con tratamiento de quimioterapia de ser necesario⁵.

3.2. *Tumor vesical No músculo invasor*: son los TV papilares o planos confinados a la mucosa y que invadan la lámina propia son clasificados como Ta y T1 respectivamente²⁰ (ver tabla 1). En el caso del TVNMI el tratamiento se basa en la resección transuretral del tumor y, de ser necesaria, la posterior instilación vesical con antineoplásicos o inmunoterapia. Las instilaciones vesicales tienen el objetivo de disminuir el riesgo de recidiva y progresión a enfermedad músculo invasora. Una vez tratado el TVNMI, la vigilancia busca anticipar la progresión y hacer el diagnóstico precoz de las recidivas. En nuestro estudio nos centraremos en el TVNMI. En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 75% de los TV son TVNMI²¹.

3.3. *Carcinoma in Situ (CiS)*: es un carcinoma de alto grado, no exofítico (plano), no invasor y de alto grado⁵. La presencia de CiS es un factor de riesgo para progresión y recidiva del TVNMI²². Se estima que sin tratamiento, la mitad de los pacientes con CiS progresará a TVMI²³. El tratamiento del CiS no se puede lograr tan solo con RTU, se debe complementar con instilaciones

(Sección 7). En el caso de CiS recidivante o refractario a tratamiento conservador, la cistectomía radical es el tratamiento de elección⁵.

Tabla 1. Estadaje local (T) del tumor vesical ²⁰		
ESTADIO TUMORAL (T)	DESCRIPCION HISTOLOGICA	INVASION DE MUSCULO
Tx	No se puede evaluar	Tumores vesicales no músculo invasores (TVNMI)
T0	No hay evidencia de tumor	
Ta	Tumor papilar no invasivo	
Tis	Carcinoma in situ	
T1	Tumor que invade el tejido conjuntivo subepitelial	
T2	Tumor que invade la capa muscular (detrusor)	Tumores vesicales músculo invasores
• T2a	• El tumor invade la capa muscular superficial	
• T2b	• El tumor invade la capa muscular profunda	
T3	Tumor que invade la grasa perivesical	
• T3a	• Invasión microscópica	
• T3b	• Invasión macroscópica	
T4	Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: próstata, útero, vagina, pared pélvica o pared abdominal.	

Tabla 2. Clasificación de los tumores vesicales según la OMS 2016²⁴.

Urothelial tumours		Neuroendocrine tumours	
<i>Infiltrating urothelial carcinoma</i>	8120/3	Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3
Nested, including large nested		Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Microcystic		Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3
Micropapillary	8131/3	Paranglioma	8693/1
Lymphoepithelioma-like	8082/3		
Plasmacytoid / signet ring cell / diffuse		Melanocytic tumours	
Sarcomatoid	8122/3	Malignant melanoma	8720/3
Giant cell	8031/3	Naevus	8720/0
Poorly differentiated	8020/3	Melanosis	
Lipid-rich			
Clear cell		Mesenchymal tumours	
<i>Non-invasive urothelial neoplasms</i>		Rhabdomyosarcoma	8900/3
Urothelial carcinoma in situ	8120/2	Leiomyosarcoma	8890/3
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, low-grade	8130/2	Angiosarcoma	9120/3
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high-grade	8130/2	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential	8130/1	Perivascular epithelioid cell tumour	
Urothelial papilloma	8120/0	Benign	8714/0
Inverted urothelial papilloma	8121/0	Malignant	8714/3
Urothelial proliferation of uncertain malignant potential		Solitary fibrous tumour	8815/1
Urothelial dysplasia		Leiomyoma	8890/0
		Haemangioma	9120/0
		Granular cell tumour	9580/0
		Neurofibroma	9540/0
Squamous cell neoplasms		Urothelial tract haematopoietic and lymphoid tumours	
Pure squamous cell carcinoma	8070/3		
Verrucous carcinoma	8051/3	Miscellaneous tumours	
Squamous cell papilloma	8052/0	Carcinoma of Skene, Cowper, and Littre glands	8140/3
Glandular neoplasms		Metastatic tumours and tumours extending from other organs	
Adenocarcinoma, NOS	8140/3	Epithelial tumours of the upper urinary tract	
Enteric	8144/3	Tumours arising in a bladder diverticulum	
Mucinous	8480/3	Urothelial tumours of the urethra	
Mixed	8140/3		
Villous adenoma	8261/0		
Urachal carcinoma	8010/3		
Tumours of Müllerian type			
Clear cell carcinoma	8310/3		
Endometrioid carcinoma	8380/3		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.

4. Diagnóstico del TVNMI

El diagnóstico del TVNMI se basa en la cistoscopia⁵. La cistoscopia se debe realizar ante la sospecha clínica. Los síntomas clínicos que orientan al diagnóstico del TVNMI son poco específicos y nunca patognomónicos. La hematuria macroscópica monosintomática es el signo más importante y está asociada a enfermedad de mayor grado y estadio⁵. Entre las pruebas diagnósticas que podemos utilizar se encuentran:

4.1. Tomografía computarizada: se puede utilizar para detectar tumores vesicales o de la vía urinaria superior. Usualmente se diagnostican como un defecto de repleción del contraste que ocupa la vía urinaria²⁵. La necesidad de realizar una tomografía en pacientes con TVNMI, con el objetivo de evaluar la vía urinaria superior, es dudosa; la incidencia de tumores de la vía urinaria superior va desde 1,8% en los pacientes con tumores de bajo grado hasta 7% en pacientes con tumores de alto grado o con TVNMI en el trigono²⁶. La tomografía no ha demostrado sensibilidad suficiente para reemplazar a la cistoscopia en el diagnóstico de TV²⁷.

4.2. Ultrasonografía: se puede utilizar para determinar alteraciones del tracto urinario (hidronefrosis, masas renales, etc.). No ha demostrado suficiente sensibilidad para reemplazar a la cistoscopia en el diagnóstico de TV ni al TC en el de masas de la vía urinaria superior²⁷.

4.3. *Resonancia magnética multiparamétrica*: la utilidad de la resonancia en el diagnóstico y estadiaje del TVNMI no se ha demostrado.

Recientemente se ha publicado una metodología estandarizada para reportar pacientes con TV, se ha denominado VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System)²⁸.

4.4. *Citología urinaria*: tiene alta sensibilidad para detectar TVMNI de alto grado (84%) pero en los tumores de bajo grado la sensibilidad ronda el 16%²⁹. Una citología positiva sugiere un TV de alto grado en alguna parte del tracto urinario. Por el contrario, un resultado negativo no descarta la presencia de TV (particularmente si es de bajo grado). Otro de los problemas de la citología es la variabilidad dependiente del evaluador. Un estudio reporta tasas de concordancia de entre 0,7 y 0,86 dependiendo del tipo de tumor³⁰.

4.5. *Cistoscopia*: el diagnóstico definitivo del TV se realiza mediante la visión endoscópica más citología o biopsia. La cistoscopia regularmente se realiza como un procedimiento ambulatorio y se ha demostrado que el uso de un instrumento flexible y anestesia local aumenta las tasa de adherencia de los pacientes³¹. La cistoscopia se realiza regularmente utilizando luz blanca. Se han desarrollado tecnologías para identificar el TV que está presente pero que no es posible identificar:

4.5.1. Fotodinámico (fluorescencia): se utiliza luz violeta después de haber instilado ácido 5-aminolaevulínico o ácido hexaminolaevulínico.

Se ha demostrado que la fluorescencia aumenta la tasa de diagnóstico de TV, particularmente CiS³². Una revisión sistemática demostró una reducción de la recidiva del TVNMI a corto y largo plazo, sin embargo, no demostró mejoría en progresión y mortalidad³³.

4.5.2 Imagen de banda estrecha (narrow banding): permite aumentar el contraste entre urotelio normal e hipervascularizado. Ha demostrado aumento del diagnóstico del TV y reducción de recidivas precoces³⁴⁻³⁶.

5. Recidiva y progresión en el TVNMI

En el TVNMI dos factores se deben tener muy en cuenta: recidiva y progresión. Recidiva se refiere a la reaparición de enfermedad con el mismo grado/estadio. Progresión se refiere a la reaparición de la enfermedad con mayor grado/estadio²¹. El tratamiento y vigilancia del TVNMI se debe ajustar al riesgo de recidiva y progresión. Con el objetivo de predecir el riesgo de cada paciente se han creado tablas de riesgo²². Las dos recomendadas por la sociedad europea de urología son:

5.1. *La tabla de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*²²: incluye factores clínicos y anatomopatológicos (número de tumores, diámetro del tumor, tasa de recidiva previa, estadio T, presencia de carcinoma in situ y grado histológico). Esta tabla se basa en 2596 pacientes con TVMNI que fueron aleatorizados a varios ensayos. De acuerdo con las

características de los pacientes se asigna un puntaje que se utiliza para estimar el riesgo de recidiva y progresión al año y a los 5 años. Ver Tabla 3 y 4.

5.2. *El modelo del Club Urológico Español del tratamiento Oncológico (CUETO)*³⁷: está basado en 1062 pacientes tratados con diferentes modalidades de instilación vesical con BCG. En su puntaje incluye factores clínicos y anatomopatológicos diferentes de las tablas de la EORTC (género, edad, tasa de recidiva, número de tumores, estadio T, presencia de carcinoma in situ y grado histológico). Utilizando las tablas de CUETO, los riesgos de recidiva calculados son menores que los de la EORTC, probablemente por el uso de BCG⁵.

Establecer el grupo de riesgo individual es fundamental para determinar el tratamiento y la vigilancia en el TVNMI. La sociedad europea de urología recomienda asignar cada paciente a uno de los tres grupo de riesgo de acuerdo con el puntaje EORTC⁵. La tabla 5 describe los grupos de riesgo.

Tabla 3. Ponderación para puntuar el TVNMI según EORTC²².		
Factor	Recidiva	Progresión
Número de tumores		
Único	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Diámetro del tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3cm	3	3
Frecuencia de recidiva anterior		
Primario	0	0
≤ 1 recidiva / año	2	2
> 1 recidiva / año	4	2
Categoría		
pTa	0	0
pT1	1	4
CiS concomitante		
Si	0	0
No	1	6
Grado (OMS 1973)		
G1	0	0
G2	1	6
G3	2	5
Puntuación total	0 - 17	0 - 23

Tabla 4. Probabilidad de recidiva y progresión según el puntaje EORTC²².					
Puntuación de recidiva	Probabilidad de recidiva al cabo de 1 año		Probabilidad de recidiva al cabo de 5 años		Grupo de riesgo de recidiva
	%	IC al 95%	%	IC al 95%	
0	15	10 - 19	31	21 - 37	Riesgo bajo
1 - 4	24	21 - 26	46	42 - 49	Riesgo intermedio
5 - 9	38	35 - 41	62	58 - 65	Riesgo alto
Puntuación de progresión	Probabilidad de progresión al cabo de 1 año		Probabilidad de progresión al cabo de 5 años		Grupo de riesgo de progresión
	%	IC al 95%	%	IC al 95%	
0	0,2	0 - 0,7	0,8	0 - 1,7	Riesgo bajo
2 - 6	1	0,4 - 1,6	6	5 - 8	Riesgo intermedio
7 - 13	5	4 - 7	17	14 - 20	Riesgo alto
14 - 23	17	10 - 24	45	35 - 55	

Tabla 5. Estratificación en Grupos de riesgo⁵	
Grupo de riesgo	Características
Bajo riesgo	Tumor inicial, solitario, menos de 3 cm sin CiS
Riesgo intermedio	Todos los tumores que no puedan ser asignados a los grupos de bajo o alto riesgo
Alto riesgo	<p>Cualquiera de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • pT1 • Alto grado / Grado 3 • CiS • pTa de Bajo grado múltiple, recidivante y de más de 3cm (se deben cumplir los 3 criterios)

6. Tratamiento inicial del TVNMI

6.1. *Resección transuretral del tumor vesical (RTU)*: el diagnóstico definitivo del TVNMI lo da la biopsia / resección vesical transuretral. El objetivo principal de la RTU debe ser hacer un diagnóstico correcto y eliminar completamente el TV⁵. El procedimiento debe incluir la identificación de los factores necesarios para asignar el grupo de riesgo (tamaño, número, presencia de CiS, etc.), la resección completa (de todas las lesiones y la visualización del músculo detrusor) y la identificación de posibles complicaciones (descartar la perforación vesical)³⁸. Existen dos técnicas para la resección del TV;

6.1.1. **Resección en fragmentos**: se deberá enviar por separado los fragmentos que pertenecen a la base tumoral, la parte exofítica del tumor y los márgenes de resección. La resección en fragmentos extendidos brinda información adicional de la extensión horizontal y en profundidad del TV³⁹.

6.1.2. **Resección en bloque**: se puede realizar mediante el uso de energía monopolar, bipolar, láser de Holmio o Tulio en tumores que lo así lo permitan. Mediante esta técnica la tasa de representación del detrusor llega al 96-100%⁴⁰⁻⁴².

Se ha demostrado que la ausencia de músculo detrusor en el estudio histológico está asociado a persistencia de la enfermedad, recidiva precoz y

sub-estadificación del tumor⁴³. La presencia de músculo detrusor en el tejido resecado indica la calidad de la resección y es necesaria para un correcto estudio histológico⁵.

6.2.*Biopsias vesicales*: el CiS puede presentarse como una zona eritematosa o afelpada del urotelio, semejando zonas inflamatorias. También es posible que no se vea en absoluto⁵. Por estas razones se recomienda tomar biopsias de cualquier zona sospechosa de la superficie vesical. Sin embargo, en pacientes con TV de alto grado o con citologías urinarias positivas, se recomienda tomar biopsias vesicales de zonas aleatorias para “muestrear” la superficie vesical en busca de CiS⁴⁴. Para obtener una representación de toda la vejiga se recomienda tomar muestras del trigono, cúpula y de las paredes laterales y posterior⁴⁵.

6.3.*Biopsia de uretra prostática*: la presencia de CiS en la uretra prostática ha sido demostrada por algunos autores⁴⁶. Es más frecuente en tumores del trigono o cuello vesical, en CiS vesical y en tumores múltiples⁴⁷. Por estas razones, se recomienda hacer biopsia de la uretra prostática en estos casos.

6.4.*Segunda resección*: se ha demostrado un riesgo significativo de enfermedad residual después de una RTU de un TVNMI⁴⁸. Una revisión sistemática de más de 8000 pacientes con TVNMI demostró un 51% de enfermedad residual y hasta un 8% de infra-estadificación en tumores pT1⁴⁹. Una segunda resección puede aumentar el tiempo libre de recidiva, mejorar los resultados de las instilaciones con BCG y dar información pronóstica⁵⁰⁻⁵².

Estudios retrospectivos han demostrado que una segunda resección realizada entre los 14 y 42 días posteriores a la primera RTU supera en tiempo libre de recidiva y progresión a una realizada después de 43 días⁵³. Basados en estos datos, se recomienda una segunda resección entre los 14 y 42 días postoperatorios en resecciones incompletas, ausencia de músculo en la muestra y pT1⁵.

7. Tratamiento adyuvante del TVNMI

A pesar de que el objetivo de la RTU es eliminar por completo el TVNMI, en un porcentaje no desdeñable de pacientes habrá persistencia, recidiva y progresión de la enfermedad⁴⁸. Por esta razón se recomienda considerar terapias adyuvantes en todos los casos. Los tratamientos adyuvantes en el TVNMI consisten en instilaciones vesicales en el postoperatorio inmediato (con agentes antineoplásicos) o instilaciones tardías (con antineoplásicos o bacilos de Calmette-Guérin).

7.1. Instilación postoperatoria inmediata de antineoplásicos: actúa mediante la destrucción de las células tumorales circulantes en la vejiga y las que puedan quedar en el lecho de la resección^{54,55}. En un metaanálisis de 2016 que incluyó datos de más de 2200 pacientes, se redujo la tasa de recidiva a los 5 años en un 14%. Los pacientes beneficiados fueron los que tenían 1 o menos de 1 recidiva en el último año y aquellos en los que el puntaje de la EORTC fue menor de 5⁵⁶. Las instilaciones con mitomicina,

epirrubicina, pirubicina y gemcitabina han demostrado algún beneficio⁵⁶. La instilación deberá hacerse en las primeras horas del postoperatorio, preferiblemente en las primeras 2 horas⁵⁶. No se debe instilar pacientes con perforación vesical ya que se han reportado complicaciones severas⁵⁷.

7.2. Instilación adyuvante con antineoplásicos: la instilación de antineoplásicos disminuye las tasa de recidiva en el primer año en torno al 13-14% cuando se compara con RTU aislada⁵⁸. Por el contrario, no disminuye la tasa de progresión⁵⁹. También se ha demostrado que la instilación tardía y continuada de mitomicina C disminuye la tasa de recidiva en pacientes de riesgo intermedio⁶⁰. Se recomiendan las instilaciones en paciente de riesgo intermedio (disminuyen la recidiva mas no la progresión)⁵. Se han descrito algunos mecanismos para aumentar el efecto antitumoral intravesical; basados en hipertermia⁶¹ y en electromoción⁶². El valor de estas tecnologías está por demostrar.

7.3. Inmunoterapia vesical con bacilos de Calmette-Guérin (BCG): la instilación de BCG ha demostrado reducir la tasa de recidiva y la progresión. Su problema principal es que produce más efectos secundarios que las instilaciones de antineoplásicos.

7.3.1. BCG y recidiva: cinco metaanálisis confirman la superioridad de BCG vs antineoplásicos en la prevención de recidivas⁶³⁻⁶⁷. Un metaanálisis estimó la reducción de recidivas en 32% en los pacientes que hicieron BCG de mantenimiento⁶⁵.

7.3.2. BCG y progresión: dos metaanálisis han probado que se retrasa e incluso disminuye la tasa de progresión con BCG de mantenimiento^{59,68}. Un metaanálisis de la EORTC con más de 4000 pacientes demostró que la tasa de progresión disminuyó un 27% en los que hicieron mantenimiento con BCG (vs RTU sola o RTU más antineoplásicos)⁶⁸.

7.3.3. Toxicidad de la BCG: las instilaciones con BCG producen más efectos secundarios que las de antineoplásicos⁶⁸. A pesar de esto, los efectos secundarios serios suceden en menos del 5% de los pacientes, son tratables, no empeoran en el mantenimiento, suelen presentarse en el primer año y no son peores en las personas más ancianas⁶⁹.

7.3.4. Esquemas de instilación de BCG: la inducción se basa en un esquema empírico de 6 semanas⁷⁰. Para mayor eficacia, BCG debe darse, después de la inducción, en un esquema de mantenimiento (3 semanas cada 3 meses). Se han utilizado mantenimientos de entre 18 semanas y 36 meses con resultados variables⁵. Un estudio observó que esquemas de mantenimiento de menor dosis podrían ser subóptimos en prevenir la progresión y recidiva⁷¹.

8. Vigilancia del TVNMI

La vigilancia del TVNMI se realiza con cistoscopias seriadas. El tiempo total de vigilancia y la frecuencia de estas depende del grupo de riesgo. Durante la

vigilancia, los riesgos más importantes para los pacientes son la recidiva o progresión⁵. La primera cistoscopia se debe realizar a los 3 meses de la resección del tumor. Si se confirma la ausencia de recidiva, el control se ajusta al grupo de riesgo.

8.1. *Grupo de bajo riesgo* (ver tabla 4) la vigilancia debería ser anual y por 5 años. En este grupo la tasa de progresión es muy baja; las recidivas suelen ser también de bajo riesgo. Dado que este tipo de enfermedad no representa un riesgo vital, su diagnóstico precoz no es fundamental⁷²

8.2. *Grupo de alto riesgo* (ver tabla 4) la vigilancia ha de ser semestral por 5 años y luego anual de por vida⁵. En este grupo, dado que la tasa de progresión es elevada, la detección del TV debe ser lo más precoz posible. Un retraso en el diagnóstico puede ser de riesgo vital para el sujeto⁵. Además, las recidivas incluso después de 10 años no son excepcionales. Se recomienda por esta razón, la vigilancia de por vida⁷³.

8.3. *Grupo de riesgo intermedio*: En este grupo la vigilancia debe ajustarse a cada caso.

Además de la cistoscopia se pueden realizar ensayos urinarios para la detección no invasiva del TVMNI. El más utilizado es la citología urinaria (ver punto 4.4). Entre las limitaciones de la citología urinaria se encuentra su baja sensibilidad para los TV de bajo grado, la necesidad de un personal experto y la variabilidad inter e intra evaluador³⁰. Se ha intentado superar estos

problemas con marcadores urinarios para la vigilancia del TVNMI.

Actualmente no hay ningún marcador validado por las principales guías de tratamiento para la vigilancia del TVNMI⁵.

9. Marcadores urinarios para el diagnóstico del TVNMI

Desde hace más de 30 años se realizan ensayos en orina con el objetivo de diagnosticar el TVNMI de manera no invasiva. Los primeros ensayos se orientaron a la detección de una proteína en orina (NMP22, UBC, metaloproteasas, etc.) o ensayos celulares modificados (mejorando la citología)⁷⁴. Con el progreso tecnológico se comenzó a analizar factores de transcripción (ARN, ADN, metilaciones, microsatélites) y múltiples proteínas en ensayos cada vez más simples e incluso que pueden ser inmediatos y en el punto de control (PdC). Dado que los ensayos con proteínas son los más respaldados con literatura y nuestro estudio se centra en este grupo, haremos su descripción por separado (sección 10).

De acuerdo con la Sociedad Europea de Urología, los marcadores urinarios del tumor vesical tendrían tres posibles aplicaciones:

- Cribado en población en riesgo de TV: se han reportado resultados con marcadores proteicos y celulares^{75,76}. Factores asociados a la enfermedad como la baja prevalencia general y largo periodo de evolución dificultan la utilización de marcadores en su cribado^{74,75}. A día de hoy no se recomienda la utilización de marcadores urinarios para el cribado del TV⁵

- Detección primaria: en pacientes con síntomas sugestivos de TV (hematuria, síndrome miccional persistente). En el diagnóstico inicial no se plantea la sustitución de la cistoscopia por marcadores. Sin embargo, podrían ser útiles en el diagnóstico de enfermedad no visible (CiS, tumores de vía urinaria superior)^{5,77}.

- Vigilancia del TVNMI: es en este grupo de pacientes en que sería de mayor utilidad la implementación de marcadores urinarios. El objetivo de la utilización del marcador sería mejorar el protocolo de vigilancia actual (reduciendo el número de cistoscopias, anticipando el diagnóstico de la recidiva, ajustando el grupo de riesgo, sustituyendo la citología, etc.). Se plantean dos posibles escenarios

- Pacientes de alto riesgo: el marcador debería tener una alta sensibilidad y no dar falsos negativos.

- Pacientes de riesgo bajo / intermedio: el objetivo sería reducir el número de cistoscopias o seleccionar los pacientes que requerirían la prueba⁵. El valor predictivo negativo (VPN) del marcador debería ser muy alto.

Para describir los marcadores estudiados en la vigilancia del TVNMI los dividiremos en tres grupos; marcadores de transcripción, ensayos celulares y ensayos de proteínas. Describiremos cada grupo y, dado que es el grupo que estudiamos, haremos más énfasis en los ensayos con proteínas

9.1. *Marcadores de transcripción*: se incluyen pruebas que detectan ADN o ARN (micro ARN, ARN mensajero) en orina acelular o en el “pellet” de células exfoliadas de la vía urinaria. Los ARNs mensajeros (mARN), son cadenas dobles de ARN codificantes que se encuentran en el citoplasma⁷⁸. Su expresión se utiliza para identificar y cuantificar genes mutados asociados al TV⁷⁹. Las mutaciones del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR3) están asociadas al TVNMI hasta el 70% y se asocian a recidivas de bajo grado⁸⁰. Kavalieris et al y Lotan et al, evaluaron el ensayo CxBladder[®]. La sensibilidad fue superior al 90% y el VPN superó el 95%^{81,82}. Pichler et al, evaluaron el ensayo Xpert Bladder Cancer^{®83}. La sensibilidad fue de 84% y el VPN de 93%. Los micro ARNs (miARN) son cadenas simples de ARN, de menos de 22 nucleótidos, no codificantes, que regulan la expresión de mARN. Sapre et al, han utilizado un panel con 6 miARNs y han observado una sensibilidad y especificidad de 88% y 48% respectivamente y un VPN de 75%⁷⁸. Los microsatélites (MS) son regiones altamente polimórficas de ADN, parte integral de la progresión neoplásica, que pueden ser usados como marcadores clonales del TV. El estudio de los MS ha permitido demostrar zonas de pérdida de la heterocigocidad (LOH) que están asociadas al TV⁸⁴. Van der Aa et al, combinaron la detección de la mutación de FGFR3 y la detección de zonas de LOH en MS de 10 cromosomas, observando una sensibilidad de 58% y un VPN de 94%⁸⁵. Couffignal et al, detectaron la mutación de FGFR3 en el 39% de los TV primarios. La detección de la

mutación durante la vigilancia tuvo una sensibilidad del 73% y un VPN del 94%⁸⁶. Las metilaciones del ADN son cambios epigenéticos, estables y que se asocian al desarrollo de neoplasias mediante la inactivación de genes supresores y/o la sobreexpresión de oncogenes⁸⁷. La detección de metilaciones se ha estudiado extensamente como biomarcadores del TVNMI, en paneles exclusivos de metilaciones o combinados con otros ensayos. Kandimalla et al, combinaron la detección de FGFR3 y tres metilaciones; observaron una sensibilidad global y VPN de 79% y 76% respectivamente. En TV de alto grado la sensibilidad fue del 80% y del 73% en TV de bajo grado⁷⁹. Reinert et al, una vez determinado el estado de metilaciones del TV inicial, controlaron la reaparición de los genes metilados. Durante el seguimiento alcanzaron sensibilidades en la detección de recidiva entre 87 y 93%. Sin embargo, no demostraron beneficio al combinar metilaciones⁸⁸. Roperch et al, también evaluaron el estatus de FGFR3 y 18 metilaciones⁸⁹. En su análisis, la mejor combinación asoció 3 metilaciones y obtuvieron una sensibilidad global para la recidiva del 90%. Zuiverloon et al, evaluaron un panel de 23 metilaciones sin determinar su estado en el TV inicial. La mejor combinación alcanzó una sensibilidad del 72%⁹⁰. Su et al, con un panel de 3 metilaciones observaron una sensibilidad y especificidad de 86% y 89% respectivamente⁹¹. En un estudio multicéntrico, van der Heijden et al, con la detección conjunta de la metilación de 3 genes observaron una sensibilidad y VPN de 89.6% y 82.86% respectivamente. También estimaron que, al ajustar

la prevalencia de recidivas a la práctica clínica habitual, su panel de metilaciones podría alcanzar un VPN del 99%, pudiéndose evitar más del 35% de las cistoscopias durante el seguimiento de los TVNMI⁹². Witjes et al, en un estudio multistitucional europeo utilizaron el Bladder EpiCheck[®], un ensayo que evalúa 15 metilaciones, en más de 350 muestras obtenidas durante el primer año de vigilancia. Observaron una sensibilidad y un VPN global del 68% y 95% respectivamente⁹³. La tabla 6 resume los ensayos urinarios de factores de transcripción; se describen los genes mutados / micro ARNs / metilaciones o microsatélites estudiados y su sensibilidad global, en alto grado y el VPN.

Tabla 6. Resumen de marcadores urinarios de factores de transcripción. Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado					
Autor, año	Biomarcadores	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Allory et al, 2014⁹⁴	TERTp + FGFR3	50	71	NE	NE
Sapre et al, 2016⁷⁸	miR16, miR200c, miR205, miR21, miR221 y miR34a	88	48	75	NE
Kavalieris et al, 2016 (CxBladder)⁸¹	CXCR2, HOXA13, MDK, IGFBP5 y CDK1	92	NE	96	95
Lotan et al, 2017 (CxBladder)⁸²	CXCR2, HOXA13, MDK, IGFBP5 y CDK1	91	NE	96	97
Pichler et al, 2017 (Xpert BC)⁸³	ABL1, CRH, IGF2, UPK1B y ANXA10	84	91	93	100
van der Aa et al, 2009⁸⁵	MS + mutación FGFR3	58	73	94	NE
Zuiverloon et al, 2010⁹⁵	mutación FGFR3	58	NE	89	NE
Kandimalla et al, 2010⁷⁹	mutación de FGFR3 + 3 metilaciones (OTX1, ONECUT2 y OSR1)	79	NE	76	73
Zuiverloon et al, 2012⁹⁰	4 metilaciones (APC_a, TERT_a, TERT_b y EDNRB)	72	55	NE	NE
Reinert et al, 2012⁸⁸	6 metilaciones (EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM y ZNF154)	87-93	28-47	55-78	NE
Zuiverloon et al, 2013⁹⁶	MS + mutación de FGFR3	82	34	NE	NE
Su et al, 2014⁹¹	3 metilaciones (SOX1, IRAK3 y L1-MET)	86	89	NE	NE
Couffignal et al, 2015⁸⁶	mutación FGFR3	73	87	94	NE
Roperch et al, 2015⁸⁹	mutación de FGFR3 + 3 metilaciones (HS3ST2, SLIT2 y SEPTIN9)	90	65	NE	NE
van der Heijden et al, 2018⁹²	3 metilaciones (CFTR, SALL3 y TWIST1)	89	30	83	91
Witjes et al, 2018⁹³	BladderEpiCheck (15 metilaciones)	68	88	95-99	89

MS: microsatélite; NE: no especificado, AG: alto grado

9.2. *Ensayos de base celular*: En este apartado incluimos dos ensayos; UroVysion FISH® (Vysis, Laboratorios Abbott, Des Plaines, EE. UU.) y el uCyt+® (Scimedx Inc., Denville, EE. UU.). UroVysion FISH® (hibridización fluorescente in situ) requiere la visualización de al menos 25 células morfológicamente anómalas; la detección de 4 o más células con exceso de 2 o más cromosomas 3, 7 o 17 en la misma célula o como mínimo 12 células con supresión en el gen p16⁹⁷. uCyt+® contiene anticuerpos fluorescentes contra glicoproteínas de mucina y antígeno carcinoembrionario. Todenhöfer et al, aplicaron UroVysion®, uCyt+® y un marcador proteico en más de 400 muestras de pacientes en vigilancia por TVNMI. Demostraron que con el uso de 2 de estos marcadores se puede obtener un VPN de 99.1% en los TV de alto grado⁹⁷. El uso de ensayos “reflejo” se refiere a la utilización de pruebas secundarias (UroVysion® o uCyt+®) cuando el resultado de la citología es dudoso. Odisho et al, utilizaron el uCyt+® como reflejo de citología en más de 300 muestras y obtuvieron sensibilidad de 72,9% y VPN de 80%⁹⁸. En la tabla 7 se resumen los resultados de ensayos celulares; sensibilidad y especificidad global, VPN y sensibilidad en alto grado.

Tabla 7. Resumen de los estudios con ensayos celulares en vigilancia. Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado

Autor, año	Técnica	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Todenhöfer et al, 2014 ⁹⁷	UroVysion + uCyt+	80-90	NE	89-91	NE
Odisho et al, 2013 ⁹⁸	uCyt+ (reflejo)	73	47	80	73

NE: no especificado, AG: alto grado

10. Ensayos con proteínas urinarias en el diagnóstico del TVNMI:

Se han estudiado gran cantidad proteínas urinarias para el diagnóstico no invasivo del TVNMI. Una revisión reciente estima que se han probado al menos 187 proteínas distintas con este propósito⁹⁹. Los resultados obtenidos hasta ahora son muy heterogéneos⁷⁴. Dada la abundancia de publicaciones, dividiremos su estudio por marcadores e incluiremos los que cuentan con más respaldo bibliográfico. Inicialmente haremos una descripción general de los ensayos, incluyendo pacientes en diagnóstico inicial y vigilancia, además de series de más de una década de antigüedad. Posteriormente nos centraremos en los marcadores que han demostrado utilidad en la vigilancia del TVNMI en la última década.

10.1. *Fibronectina* (FN): es una glicoproteína de 440kDa presente en la matriz extracelular. Se teoriza que regula la interacción de la célula con la

matriz extracelular: adhesión celular, migración y morfología celular ¹⁰⁰. Se ha descrito su presencia en el plasma y en la orina. La presencia de fragmentos en orina se ha relacionado a la degradación proteolítica por enzimas tumorales ¹⁰¹. Varios grupos han evaluado la utilidad de la detección de esta glicoproteína o sus fragmentos, mediante inmunofluorescencia, en el diagnóstico y vigilancia del TVMNI. Sánchez-Carbayo et al ¹⁰², evaluaron, retrospectivamente 402 pacientes (112 pacientes con sospecha de TV, 104 pacientes en seguimiento, 109 pacientes sometidos a instilaciones vesicales, 45 con patologías benignas y 32 controles sanos). Obtuvieron una sensibilidad y especificidad global de 80% y 74% respectivamente. Describieron además la elevación de FN antes de las recidivas y que la persistencia del marcador negativo es muy sugestiva de ausencia de recidiva, lo que podría evitar cistoscopias. Eissa et al ¹⁰³, estudiaron 215 pacientes y obtuvieron una sensibilidad y especificidad de 83% y 82% respectivamente además de mayor sensibilidad en el grupo de pacientes con TV escamoso bilharzial. Otro estudio ¹⁰⁴, con 75 casos y 55 controles obtuvo una sensibilidad y especificidad de 72% y 82% respectivamente, además de no demostrar relación con la recidiva en el seguimiento (en promedio 23 meses). Menéndez et al ¹⁰⁵, evaluaron prospectivamente 68 casos y 55 controles obteniendo sensibilidad y especificidad de 78% y 80% respectivamente, además de demostrar una relación directa con el grado, estadio y tamaño tumoral. Li et al ¹⁰⁶, demostraron la utilidad de la FN como

predictor de masa tumoral residual después de la RTU. No existen ensayos PdC de FN. La detección urinaria de FN demostró que podría ser útil en el diagnóstico y vigilancia de TV y como predictor de masa tumoral residual post-RTU. Hoy en día no es un marcador que se siga estudiando y no se han detectado publicaciones con FN en la última década. Los resultados obtenidos con FN se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los estudios que analizan Fibronectina (FN). Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado

Autor, año	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Sánchez-Carbayo et al 2000 ¹⁰⁷	80	74	75	82
Eissa et al, 2002 ¹⁰⁸	83	82	78	89
Mutlu et al, 2003 ¹⁰⁴	72	82	87	NE
Menéndez et al, 2005 ¹⁰⁵	78	80	82	82

NE: no especificado, AG: alto grado

10.2. *Citoqueratina 19 (CYFRA 21-1)*: La expresión de ciertas citoqueratinas (CK) se ha relacionado a la presencia de TVNMI¹⁰⁹. El ensayo CYFRA 21-1 (Cytokeratin Fragments) mide la presencia de fragmentos de la CK 19 en orina. Sánchez-Carbayo et al¹⁰⁹, incluyeron 237 pacientes entre sospechas de tumor vesical y pacientes en control por antecedente de TVNMI. Se detectaron 61 casos y obtuvieron una sensibilidad y especificidad

de 68% y 94% respectivamente para un punto de corte de 5,4ng/mL. El ensayo detectó los tumores de AG mejor que los de BG (88% vs 67%).

Pariente et al ¹¹⁰ incluyeron 182 pacientes, 66 con TVNMI y 116 sin TVNMI (controles sanos y pacientes con cistoscopia negativa). Con un punto de corte de 4ng/mL, obtuvieron sensibilidad y especificidad de 96% y 67% respectivamente. Nisman et al ¹¹¹ evaluaron inicialmente 325 pacientes, 119 casos y 206 controles. Con un punto de corte de 4,9ng/mL obtuvieron sensibilidad y especificidad de 79% y 88% respectivamente. En una serie posterior ¹¹² añadieron ultrasonografía abdominal y citología de orina. Con los tres parámetros obtuvieron sensibilidad y especificidad de 90% y 67%, y un valor predictivo negativo de 99%. En su investigación describieron falsos positivos en casos de hematuria e infección. Morsi et al ¹¹³, estudiaron 50 pacientes con TV, 35 con TV urotelial y 15 con TV escamoso (bilharzial). Con un punto de corte de 18,5ng/mL obtuvieron sensibilidad y especificidad de 80% y 88%. Determinaron que CYFRA 21-1 no diferencia entre TV urotelial y TV escamoso. Por otra parte, Fernández et al ¹¹⁴, estudiaron 446 pacientes en vigilancia por TVNMI. Con un valor de corte de 1,5ng/mL obtuvieron sensibilidad y especificidad de 69% y 47% respectivamente. Concluyeron que la baja sensibilidad, incluso con un valor de corte de 1,5ng/mL, descarta el CYFRA 21-1 para el control del TVNMI. Satyam et al ¹¹⁵ evaluaron el ensayo según el grado tumoral. Para el BG y con un punto de corte de 1,91ng/mL obtuvieron sensibilidad y especificidad de 100% y 98% respectivamente. Para

el AG, el punto de corte lo determinaron en 4,36 ng/mL obteniendo sensibilidad y especificidad de 94% y 98% respectivamente. En conclusión, el ensayo CYFRA 21-1 no parece aportar demasiado en la vigilancia del TVNMI. No existen ensayos PdC, la heterogeneidad de los estudios y la falta de un punto de corte estándar disminuyen su aplicabilidad. Tampoco existen publicaciones que incluyan la medición de CK19 en orina en la última década. La tabla 9 resume los estudios realizados con CYFRA 21-1.

Tabla 9. Resumen de los estudios que analizan CYFRA 21-1. Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado				
Autor, año	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Sánchez-Carbayo et al, 2000¹⁰⁹	68	94	78	57
Pariente et al, 2000¹¹⁰	96	67	77	NE
Nisman et al, 2002¹¹¹	79	88	81	NE
Nisman et al, 2009¹¹²	71	68	80	NE
Morsi et al, 2006¹¹³	80	88	80	NE
Fernández et al, 2007¹¹⁴	69	42	77	NE
NE: no especificado, AG: alto grado				

10.3. *Metaloproteinasas*: La degradación de la membrana basal y la matriz extracelular es un paso obligado para la invasión tumoral. Las metaloproteinasas (MMP) juegan un papel muy importante en la homeostasis del tejido conectivo ¹¹⁶. La sobreexpresión de las MMPs está

relacionada con la agresividad de la célula tumoral¹¹⁷. La cuantificación de las MMP en orina se puede hacer mediante la evaluación de su actividad (zymografía) o mediante su detección directa (ELISA). Sier et al ¹¹⁸, evaluaron la actividad de MMP2 y 9 en 140 pacientes (82 casos, 30 con patologías urológicas benignas y 28 controles sanos) mediante zymografía. Obtuvieron una sensibilidad y especificidad para MMP2 de 35% y 100% y para MMP9 de 42% y 93%. De igual manera, Gerhards et al ¹¹⁹, analizaron las MMP 2 y 9 en 101 pacientes (43 casos, 14 con patologías urológicas benignas y 44 controles sanos). Ambas MMPs tuvieron baja sensibilidad, 51% y 31%, respectivamente. Di Carlo et al ¹²⁰, también usaron la zymografía en 25 pacientes con TVNMI. Reportaron mayor actividad de MMP9 en TV de alto grado. Eissa et al ¹²¹, analizaron 244 pacientes por medio de zymografía, ELISA y la relación de MMPs con un inhibidor de su actividad (TIMP2). Obtuvieron una alta concordancia entre el ensayo ELISA y la zymografía. En su estudio describen sensibilidad de 78% y especificidad de 75% con ELISA de MMPs. Mohammed et al ¹²², analizaron MMP9 y MMP2 por medio de zymografía en 166 pacientes (66 casos). Obtuvieron sensibilidad de 62% y 54% respectivamente y especificidad de 100% con ambos marcadores. El-Sharkawi et al ¹²³, estudiaron la actividad de MMP 3 y 9 por medio de zymografía en 70 casos y 12 controles. En su cohorte la mitad de los casos fueron TV bilharzial. Describen una mayor concentración de MMPs en TV no bilharzial y mayor sensibilidad de MMP3 en los estadios iniciales. La

detección de MMP por zymografía es una técnica laboriosa y poco aplicable a una prueba que busca ser de uso habitual. La detección con ELISA ha sido muy poco estudiada pero sus resultados parecen, al menos, igualar a la zymografía. No existen ensayos PdC. Como se puede ver en las tablas 10 y 11, ninguna de las dos proteínas muestra alta sensibilidad en el TV de AG ni alto VPN global.

Tabla 10. Resumen de los estudios que analizan Metaloproteinasa 9 (MMP9). Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado

Autor, año	Método	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Sier et al, 2000¹¹⁸	zymografía	42	93	66	47
Gerhards et al, 2001¹¹⁹	zymografía	31	NE	65	NE
Di Carlo et al, 2006¹²⁰	zymografía	NE	NE	62	66
Eissa et al, 2007¹²¹	ELISA	78	75	69	66
Mohammed et al, 2013¹²²	zymografía	62	100	71	68
El-Sharkawi et al, 2014¹²³	ELISA	64	100	71	NE
NE: no especificado; MMP9: metaloproteinasa 9, AG alto grado					

Tabla 11. Resumen de los estudios que analizan Metaloproteinasas 2 (MMP2). Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado					
Autor, año	Método	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Sier et al, 2000¹¹⁸	zymografía	32	100	62	19
Gerhards et al, 2001¹¹⁹	zymografía	51	NE	61	NE
Di Carlo et al, 2006¹²⁰	zymografía	NE	NE	59	20
Mohammed et al, 2013¹²²	zymografía	54	100	64	65
El-Sharkawi et al, 2014¹²³	ELISA	86	92	58	NE
NE: no especificado; MMP2: metaloproteinasas 2, AG alto grado					

10.4. *Proteína de la matriz nuclear 22 (NMP22)*: La expresión de las NMP varía según el tejido, el estado fisiológico y la patología celular. Se han detectado patrones específicos de expresión en cáncer de mama, prostático y de colon ¹²⁴. La detección de NMP22 se realiza mediante dos ensayos aprobados por la Comisión Europea. El NMP22® Bladder ELISA test (un ensayo cuantitativo y realizado en laboratorio) y el NMP22 BladderChek® (ensayo PdC cualitativo). En el ensayo cuantitativo el punto de corte más utilizado es 10U/mL, aunque diversos autores lo ajustan según sus resultados. En el ensayo cualitativo el “positivo” se obtiene con 10U/mL o más. Existe gran cantidad de literatura relacionada al uso de NMP22. En cuanto a sensibilidad y especificidad, el metaanálisis más amplio (más de

10000 pacientes) obtuvo 68% y 79% respectivamente ¹²⁵. Otro metaanálisis ⁹⁹ que incluyó 4528 pacientes con TV y 7728 sin TV, estimó la sensibilidad y especificidad en 62% y 80% respectivamente. La sensibilidad de NMP22 aumenta con el grado y el estadio ¹²⁶⁻¹²⁸. En tumores de bajo grado, NMP22 es más sensible que la citología^{129,130} mientras que en TV de alto grado, la especificidad es similar a la citología. Se ha demostrado también que la edad ¹³¹, la función renal ¹³² y la inflamación local e instrumentación ¹³³ aumentan la tasa de falsos positivos. En los estudios en que se utilizó como método de cribado en poblaciones de riesgo ^{134 135}, no demostró utilidad. Algunos autores han demostrado que en un diseño de algoritmo de decisiones, el uso de BladderChek® podría disminuir el número de cistoscopias de control¹³⁶⁻¹³⁸. Los resultados publicados y el hecho de que se pueda realizar como ensayo cuantitativo PdC la sitúan como una opción interesante para incorporar en el protocolo de vigilancia. La tabla 12 resume los estudios más importantes de NMP22.

Tabla 12. Resumen de los estudios que analizan NMP22. Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado					
Autor, año	Método	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Saad et al, 2002 ¹³⁹	ELISA	81	87	88	87
Lotan et al, 2008 ¹³⁴	BladderChek®	57	85	86	64
Todenhöfer et al, 2012 ¹³²	ELISA	79	76	84	NE
Jeong et al, 2012 ¹⁴⁰	ELISA	85	83	83	NE
Huber et al, 2012 ¹³⁵	ELISA	97	28	82	NE
Hosseini et al, 2012 ¹³⁰	BladderChek®	79	70	67	64
Hatzichristodoulou et al, 2012 ¹²⁶	BladderChek®	59	93	72	NE
Al-Magherbi et al, 2012 ¹⁴¹	BladderChek®	61	96	78	67
Horstmann et al, 2013 ¹³¹	ELISA	72	34	86	NE
Dogan et al, 2013 ¹²⁸	NE	60	78	68	60
Kelly et al, 2012 ¹⁴²	ELISA	53	84	85	NE
NE: no especificado; BladderChek®: ensayo cualitativo en PdC; AG: alto grado					

10.5. *Proteína H relacionada al complemento (BTA)*: Este antígeno ha sido reconocido como la proteína H relacionada con el complemento (hCFHrp). Actúa inhibiendo la citólisis mediada por el complemento lo que resulta una ventaja para las células tumorales¹⁴³. Existe un ensayo cuantitativo (BTA TRAK®, mediante ELISA) y un ensayo cualitativo (BTA STAT®) que además es PdC. En el ensayo TRAK® el punto de corte más utilizado es 14U/mL^{144,145}. En el metaanálisis de Guo et al¹⁴⁶, que incluyó 13 estudios y más de 3000

pacientes, se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 67% y 75% respectivamente. La sensibilidad aumenta con el grado¹⁴⁷ estadio¹⁴⁸ y tamaño del tumor¹⁴⁹. En general es más sensible y menos específico que la citología para los TVNMI¹⁴⁶. La manipulación¹⁵⁰, patologías benignas¹⁵¹, instilaciones y la hematuria¹⁵² aumentan considerablemente la frecuencia de falsos positivos (que alcanzó hasta el 25% en una serie ¹⁵¹). Davies et al¹⁵³, no demostraron utilidad en tamizaje de TV en pacientes con lesión medular. El último estudio publicado con BTA es de 2012¹⁵². En general los resultados muestran bajas sensibilidades en el TV de alto grado y bajos VPN. La tabla 13 resume los estudios más importantes.

Tabla 13. Resumen de los estudios que analizan BTA. Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado

Autor, año	Método	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Casetta et al, 2000¹⁴³	ELISA	57	57	77	NE
Giannopoulos et al, 2000¹⁵⁴	STAT	71	56	76	79
Heicappell et al, 2000¹⁴⁷	STAT	63	93	78	64
Serretta et al, 2000¹⁴⁵	STAT	57	62	76	NE
Serretta et al, 2000¹⁴⁵	ELISA	62	79	78	NE
Raitanen et al, 2000¹⁴⁹	STAT	81	NE	79	90
Raitanen et al, 2001¹⁵⁰	STAT	53	75	68	65
Raitanen et al, 2001¹⁵⁰	STAT	56	76	76	NE
Gutiérrez Baños et al, 2001¹⁵⁵	STAT	72	89	72	NE
Lokeshwar et al, 2002¹⁵¹	STAT	60	74	68	NE
Mahnert, et al 2003¹⁵⁶	ELISA	17	95	NE	69
Schroeder et al, 2004¹⁵⁷	STAT	52	76	73	51
Tsui et al, 2007¹⁵⁸	ELISA	51	73	76	NE
Raitanen et al, 2008¹⁵⁹	STAT	56	86	77	63
Miyake et al, 2012¹⁵²	ELISA	72	53	68	NE
NE: no especificado; STAT: ensayo cualitativo en PdC; AG: alto grado					

10.6. *Citoqueratinas 8 y 18 (ensayo UBC)*: se puede realizar de tres maneras, cuantitativa con inmunoensayo (ELISA), cualitativa PdC, denominado UBC STAT y cuantitativa PdC (UBC Rapid[®], usando el lector espectrofotométrico, Concile Omega[©])¹⁶⁰. En el ensayo cualitativo PdC, el punto de corte determinado por el fabricante es 12,3ug/L. En los estudios cuantitativos el punto de corte varía entre 10ug/L y 15ug/L. En un estudio se estableció el corte en 1ug/L con el objetivo de ajustar la especificidad¹⁴⁸. Un metaanálisis que recoge más de 2000 pacientes, obtiene un sensibilidad y especificidad de 64% y 80%⁹⁹. Se ha demostrado relación directa con el grado, el estadio y el tamaño tumoral^{109,161}. En tumores de bajo grado es más sensible que la citología¹⁶². En TV de alto grado, su sensibilidad es similar a la citología urinaria¹⁰⁷. Ha demostrado ser más sensible en la detección del TV bilharzial¹⁰⁸. No demostró utilidad en el cribado de población asintomática¹⁶³. Los falsos positivos aumentan con la inflamación de la vía urinaria, pero no por hematuria^{109,140,148}. Según un grupo, podría disminuir hasta un 30% de las cistoscopias en control del TVNMI¹⁶⁴. Se han publicado múltiples estudios con UBC en la última década, algunos centrados en la vigilancia del TVNMI. Al igual que NMP22, es uno de los marcadores más interesantes para incluir y mejorar el actual protocolo de vigilancia en el TVNMI; puede realizarse PdC y cuenta con amplio respaldo de literatura. En la tabla 14 se resumen los resultados más importantes de UBC.

Tabla 14. Resumen de los estudios que analizan UBC. Se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y sensibilidad en tumores de alto grado

Autor, año	Método	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	VPN global (%)	Sensibilidad en AG (%)
Sánchez-Carbayo et al, 2000 ¹⁰⁹	STAT	78	97	81	81
Mian et al, 2000 ¹⁶²	ELISA	65	92	82	64
Mian et al, 2000 ¹⁶²	STAT	66	90	81	48
Sánchez-Carbayo et al, 2001 ¹⁰⁷	ELISA	69	91	79	71
Boman et al, 2002 ¹⁶⁵	ELISA	64	73	80	NE
Eissa et al, 2002 ¹⁰⁸	ELISA	67	81	77	NE
Schroeder et al, 2004 ¹⁵⁷	STAT	35	75	78	39
Hedelin et al, 2006 ¹⁶³	ELISA	43	NE	79	60
Babjuk et al, 2008 ¹⁶⁶	ELISA	12	97	83	33
Gkialas et al, 2008 ¹⁶¹	ELISA	50	80	85	50
Jeong et al, 2012 ¹⁴⁰	ELISA	77	71	74	NE
Ritter et al, 2014 ¹⁶⁰	UBC Rapid®	60	70	82	NE
Pichler et al, 2017 ¹⁶⁷	UBC Rapid®	64	82	NE	36
Styrke et al, 2017 ¹⁶⁸	UBC Rapid®	NE	NE	NE	79

NE: no especificado; STAT: cualitativa en PdC; UBC Rapid®: cuantitativa en PdC, AG: alto grado

10.7. *Marcadores urinarios y diagnóstico anticipado del TVNMI*: se define como la capacidad de un marcador de diagnosticar la enfermedad antes de que sea visible (en cistoscopia). Actualmente se ha descrito en ensayos celulares y en mutaciones de ADN^{98,169}. El estudio más extenso incluyó más de 6000 muestras de orina de pacientes en seguimiento por TVNMI. Al año se observó una tasa de diagnóstico anticipado del 75% para los sujetos con citologías positivas y del 40% para aquellos con hallazgos positivos en UroVysion FISH^{®169}. Estos resultados parecen descartar el UroVysion FISH[®] como una opción en el diagnóstico anticipado. Por otra parte, los resultados en ensayos con metilaciones son mejores; Zuiverloon et al, en una cohorte de 136 sujetos en vigilancia por TVNMI, observaron un 81% de anticipación diagnóstica evaluando la mutación de FGFR3 y microsatélites^{96,96}. Es un mejor resultado, pero el tamaño de la muestra y el hecho de que no exista validación externa le resta vigencia. Hoy en día no existen publicaciones que hayan analizado la anticipación diagnóstica con el uso de marcadores proteicos. De probarse que alguna proteína puede pre-diagnosticar se tendrían más criterios para decidir en qué sujeto intensificar la vigilancia; sería un dato más para la clasificación de riesgo de recidiva.

11. ¿Por qué no se han implementado marcadores urinarios en la vigilancia del TVNMI?

Existen tres razones principales:

- La heterogeneidad de los métodos de laboratorio utilizados en los ensayos. Se han medido gran cantidad de proteínas, genes, ARN, metilaciones, microsatélites, micro ARN, etc. Cada grupo utiliza su método de cuantificación y, dado que se avanza muy rápido en las técnicas de laboratorio, prácticamente no existe validación externa en ninguno de los métodos descritos⁷⁴.
- La falta de estudios con el objetivo de demostrar mejoría en el protocolo de vigilancia. La gran mayoría de los grupos orienta sus trabajos a demostrar la precisión diagnóstica del marcador que estudian. Esta información es fundamental para demostrar la utilidad inicial del marcador, pero, una vez demostrada, es indispensable incorporarlo a un protocolo de vigilancia y demostrar los beneficios de su utilización.
- Las poblaciones analizadas en los estudios publicados no se ajustan a la realidad. Para demostrar la exactitud diagnóstica de los ensayos, los autores utilizan poblaciones de estudio construidas artificialmente; poblaciones con alta tasa de tumores de alto o bajo grado, tumores de tamaños variables, sujetos en vigilancia y en diagnóstico inicial. Así, los

resultados obtenidos de estas poblaciones artificiales no se logran extrapolar a la práctica clínica habitual.

Todo esto lleva a que, por ahora, no se aconseje ningún marcador como sustituto de la cistoscopia en la vigilancia del TVNMI⁵. Ningún marcador ha demostrado mejorar los protocolos de vigilancia basados exclusivamente en cistoscopia y citología urinaria⁵.

12. Motivación

La cistoscopia es un método exploratorio invasivo, doloroso, caro y que tiene riesgos inherentes (infección, sangrado, entre otros). Además requiere de un personal especializado y un centro preparado para su realización⁷⁴. Un paciente diagnosticado de TVNMI será sometido a un número elevado de cistoscopias a lo largo de la historia natural de su enfermedad. En el grupo de bajo riesgo podrían, en el mejor de los casos, ser entre 7 y 12. En el de alto riesgo, dado que se recomienda el control de por vida, el número será indeterminado y mucho mayor²².

De acuerdo con las guías europeas del TVNMI, los marcadores urinarios en la vigilancia del TVNMI deberían tener dos objetivos: reducir el número de cistoscopias y anticipar la detección del TV⁵.

Nuestra motivación inicial fue identificar un marcador que cumpla estos objetivos. Para ello primero fue necesario realizar una revisión sistemática de

la literatura (Artículo de Revisión). El objetivo principal de esta revisión fue identificar marcadores que puedan mejorar la vigilancia del TVNMI reduciendo el número de cistoscopias. Una vez analizada y ordenada la literatura en este aspecto, decidimos hacer un estudio prospectivo.

Con los resultados obtenidos en nuestra revisión, dos marcadores fueron los principales candidatos para el análisis prospectivo. NMP22 ha demostrado poder reducir las cistoscopias en la vigilancia del TVNMI y puede ser realizado en el PdC¹³⁷. El UBC Rapid[®] también ha demostrado poder mejorar la vigilancia (utilizado junto a otros marcadores)¹⁶⁶, también es un ensayo PdC y, afortunadamente, contaba con un distribuidor local y con voluntad de realizar un estudio prospectivo.

Así, decidimos evaluar la utilidad de la detección de citoqueratinas 8 y 18 (mediante el ensayo UBC Rapid[®]) en la vigilancia del TVNMI. El ensayo evalúa la presencia de CK 8 y 18 en orina. Se puede realizar cuantitativamente con un ELISA (en un laboratorio central) o utilizando un casete que determina cualitativamente la presencia de citoqueratinas en orina (similar a una prueba de embarazo en orina). Los resultados cualitativos obtenidos con el casete se pueden hacer cuantitativos mediante un lector espectrofotométrico (Concile Omega 100[®]). El ensayo cuantitativo y con resultados inmediatos (UBC Rapid[®]) es el que decidimos utilizar en nuestro estudio. A pesar de ser un marcador con gran cantidad de literatura a lo

largo de muchos años no se ha utilizado, como marcador único, en estudios clínicos diseñados con el objetivo de mejorar el protocolo de vigilancia^{140,164,167,168,170}. Una de las razones primordiales para escoger este ensayo es la posibilidad de realizarlo inmediatamente y en el lugar de atención del sujeto. Los resultados son casi inmediatos e, hipotéticamente, servirían para decidir a qué paciente se somete a cistoscopia. A partir de estas premisas, se realizó el estudio clínico (Artículo original).

HIPOTESIS

La determinación de marcadores urinarios puede reducir el número de cistoscopias durante la vigilancia de los tumores vesicales no músculo-invasores (TVNMI).

OBJETIVOS

1. Realizar una revisión sistemática de la literatura de los marcadores urinarios utilizados en la vigilancia de los TVNMI.
2. Evaluar los marcadores urinarios que hayan demostrado poder reducir el número de cistoscopias durante la vigilancia de los TVNMI.
3. Elegir un marcador urinario para realizar un estudio prospectivo en nuestro centro.
4. Determinar el número de cistoscopias que se pueden evitar utilizando el UBC Rapid® en nuestra práctica clínica.
5. Determinar el rendimiento diagnóstico del UBC Rapid® (sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo) en la vigilancia de los TVNMI.
6. Determinar el rendimiento diagnóstico del UBC Rapid® (sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo) en el diagnóstico inicial del TV.
7. Determinar la relación entre el UBC Rapid® y los parámetros clínicos del TV: volumen tumoral, estadio y grado.
8. Evaluar la capacidad del UBC Rapid® para anticipar el diagnóstico de la recidiva del TVNMI.

METODOLOGIA

Esta tesis se presenta como un compendio de dos publicaciones cuya metodología se especifica a continuación:

1. Marcadores urinarios en la vigilancia del tumor vesical no músculo infiltrante. Revisión de la literatura

Se utilizó la metodología PICO (patients, intervention, comparison & outcome) para delimitar el ámbito general de la revisión¹⁷¹. Una vez delimitado el objetivo general, se realizó una búsqueda bibliográfica en MedLine, Embase y librería Cochrane, acotada a los últimos 10 años, idioma inglés o castellano, utilizando los términos MeSH: “*bladder cancer*” (cáncer vesical), “*recurrence*” (recidiva), “*detection*” (diagnóstico) y “*urine marker*” (marcador urinario). Se obtuvieron 973 registros, y siguiendo los criterios PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis), finalmente se identificaron 27 estudios que cumplían los criterios de selección¹⁷². Con los estudios seleccionados se confeccionó una tabla general de datos que incluyó la información relevante a la pregunta de investigación. Se sometió cada estudio incluido a un análisis de sesgos; en nuestro caso y dado el tipo de estudios que incluimos se utilizó la herramienta QUADAS 2¹⁷³. Los resultados de la revisión se reportaron de manera estructurada, respondiendo la pregunta por partes y usando tablas con resultados específicos.

2. Assessing the clinical benefit of UBC Rapid® in surveillance and initial diagnosis of bladder cancer

De manera prospectiva se realizó el UBC Rapid® en 336 pacientes consecutivos, en una institución (Hospital Vall d'Hebron), entre el 1 de febrero del 2016 y el 31 de enero de 2017. El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica (CEIC) con el número de referencia PR(AG)072016 (Anexo 1). Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado antes de entrar al estudio. Los hallazgos descritos en la cistoscopia (tamaño y número de tumores), los antecedentes de TVNMI, género, edad, tiempo desde la última cirugía transuretral, tratamiento previo con instilaciones de BCG y resultados de la citología urinaria (espontánea y por lavados) fueron documentados. Se utilizaron los criterios STARD para reportar la precisión de del ensayo¹⁷⁴. También se evaluó la posibilidad de diagnóstico anticipado en pacientes con resultado positivo de UBC Rapid® y cistoscopia negativa. Los 336 pacientes se dividieron en dos grupos: 297 sujetos en vigilancia por antecedentes de TVNMI y 39 con diagnóstico inicial de TV y programados para RTU. Los criterios de exclusión fueron: la manipulación uretral en los 10 días previos al ensayo o un cultivo de orina positivo. De los 336 pacientes, 310 fueron incluidos finalmente para el análisis: 26 fueron excluidos (14 por cultivo de orina positivo, 11 por no tener cultivo de orina y 1 por no tener un resultado válido del ensayo UBC Rapid®. Técnica del ensayo: de cada sujeto se recogió una muestra de orina del flujo

medio (20mL) antes de la cistoscopia. La muestra de orina fue recogida en un contenedor estéril y procesada posteriormente. La muestra de orina fue sometida a citología, cultivo de orina y el ensayo UBC Rapid®. El ensayo UBC Rapid® fue realizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; después de aplicar la muestra de orina en el casete y esperar 10 minutos de incubación, los casetes fueron analizados con el lector fotométrico (Concile Reader 100®) para obtener el valor cuantitativo. El lector da un valor entre 5 µg/L y 300 µg/L.

Análisis estadístico: conociendo que la sensibilidad y especificidad reportadas del ensayo UBC Rapid® rondan el 50 y 80% respectivamente, que la sensibilidad de la citología urinaria se aproxima al 65% y asumiendo un error alfa y beta de 5 y 85% respectivamente, calculamos como necesario una muestra de 350 pacientes. Para reportar las variables continuas y cualitativas utilizamos la mediana y el rango intercuartil respectivamente. Utilizamos pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney) para comparar las medianas de variables continuas y la prueba Chi cuadrado para relacionar variables cualitativas dada la distribución no normal de la muestra. El significado estadístico se ajustó a un valor de $p < 0,05$. El punto de mayor sensibilidad del ensayo fue determinado usando el área bajo la curva (análisis ROC). A partir de este punto de corte se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo usando

tablas de contingencia. El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS 24 (Corporación IBM, Armonk, Nueva York, EE. UU.).

RESULTADOS (publicaciones)

Publicación 1

1. Marcadores urinarios en la vigilancia del tumor vesical no músculo infiltrante. Revisión de la literatura. Agreda Castañeda F, Raventós Busquets CX, Morote Robles. Actas Urológicas Españolas. 2019 oct; 43(8):404-413. DOI: 10.1016/j.acuro.2019.03.001. Epub 2019 May 13.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Marcadores urinarios en la vigilancia del tumor vesical no músculo infiltrante. Revisión de la literatura



F. Agreda Castañeda^{a,*}, C.X. Raventós Busquets^{b,c} y J. Morote Robles^{b,c}

^a Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Barcelona, España

^b Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^c Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 16 de enero de 2019; aceptado el 4 de marzo de 2019

Disponible en Internet el 13 de mayo de 2019

PALABRAS CLAVE

Cáncer vesical;
Biomarcador;
Vigilancia;
Orina

Resumen

Contexto: La vigilancia del tumor vesical no músculo infiltrante (TVNMI) se realiza habitualmente mediante cistoscopia y citologías urinarias seriadas. Hoy, no se utiliza ningún marcador urinario, suficientemente eficaz, para reducir la morbilidad y coste de este seguimiento.

Objetivo: Describir el rendimiento de los marcadores urinarios en la vigilancia del TVNMI.

Adquisición de la evidencia: el 1 de agosto de 2018 se realizó búsqueda bibliográfica en Pubmed, Embase y librería Cochrane, acotada a los últimos 10 años, con los términos: *bladder cancer, recurrence, detection* y *urine marker*. Se obtuvieron 973 registros y siguiendo las recomendaciones PRISMA se seleccionaron 27 publicaciones.

Síntesis de la evidencia: Los valores predictivos negativos de varios ensayos permitirían reducir el número de cistoscopias en la vigilancia del TVNMI. Seis ensayos de factores de transcripción tuvieron un valor predictivo negativo superior al 90% y uno de ellos se puede realizar en el punto de control. Seis ensayos de factores de transcripción describen diagnóstico anticipado entre el 68% y 83% de sus «falsos positivos». Dos ensayos de factores de transcripción y uno de proteínas demuestran reducir entre el 23% y el 35% de las cistoscopias de vigilancia. Los ensayos celulares se restringen a pruebas reflejo ante citologías urinarias dudosas.

Conclusión: Existen pocas publicaciones que permitan analizar la mejoría del protocolo de vigilancia del TVNMI. Los ensayos de factores de transcripción tienen la mejor precisión diagnóstica y algunos permiten diagnóstico anticipado. Hoy en día no hay análisis que comparen entre protocolos alternativos de vigilancia y el convencional.

© 2019 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fernandoagredac@hotmail.com (F. Agreda Castañeda).

<https://doi.org/10.1016/j.acuro.2019.03.001>

0210-4806/© 2019 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Bladder cancer;
Biomarker;
Surveillance;
Urine

Urinary markers in the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. A literature review

Abstract

Background: The surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) is usually performed by cystoscopy and cytology. Until today, no effective urinary biomarker has been used to reduce the morbidity and cost associated with these procedures.

Objective: To describe the performance of urinary biomarkers in the surveillance of NMIBC.

Evidence acquisition: on August 1, 2018, a bibliographic search was carried out in Pubmed, Embase and Cochrane Library, limited to the last 10 years, with the terms: *bladder cancer, recurrence, detection and urine marker*. 973 registers were obtained, and 27 publications were selected following the PRISMA recommendations.

Evidence synthesis: The negative predictive values (NPV) of several assays could reduce the number of cystoscopies in NMIBC surveillance. Six transcription-factor trials had an NPV rate greater than 90%, and one of them can be performed at the control point. Six transcription-factors evaluations describe anticipated diagnosis between 68% and 83% of their "false positives". Two transcription factors and one protein assays proved reduction between 23% and 35% of surveillance cystoscopies. Nowadays, cell-based assays are restricted to reflex test after doubtful cytologies.

Conclusion: There are few studies analysing the improvement of the NMIBC surveillance protocols. Several transcription factor assays are more precise and allow anticipatory diagnosis. Currently, there are no comparative studies between alternative surveillance protocols and classic ones.

© 2019 AEU. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cáncer vesical es la neoplasia maligna más común del tracto urinario¹. Su incidencia varía según regiones y países. En Europa la mayor incidencia ajustada por edad se da en España (41,5 en hombre y 4,8 en mujeres) y la más baja en Finlandia (18,1 en hombre y 4,3 en mujeres). En España se diagnostican 12 000 nuevos casos anualmente¹. Aproximadamente el 75% de los tumores vesicales son no músculo infiltrantes (TVNMI)². El TVNMI se caracteriza por su alta tasa de recidiva y el riesgo de progresión a tumor músculo invasor y por estas razones se recomienda un seguimiento a largo plazo².

La cistoscopia es la prueba de referencia en la vigilancia de los TVNMI². También se utiliza junto a la cistoscopia la citología urinaria de micción espontánea o lavado vesical³. La citología tiene alta sensibilidad para tumores de alto grado y carcinoma in situ pero baja para los tumores de bajo grado, donde oscila entre el 4 y 31%⁴.

Se han descrito numerosos marcadores urinarios para la detección no invasiva de la recidiva del TVNMI y, aunque algunos han sido aprobados por agencias internacionales, su uso no se ha consolidado en la práctica clínica⁵. Esto se produce, básicamente, por la falta de coherencia entre los estudios y la realidad clínica. En la mayoría de los estudios las cohortes se han establecido artificialmente, se mezclan datos entre diagnóstico de tumores iniciales y recidivas, no se especifica claramente el grado de los TVNMI seguidos⁶. En muchas ocasiones, la prevalencia de casos en

estas cohortes artificiales es superior a la real. Como consecuencia, la precisión diagnóstica reportada en estas cohortes artificiales no se puede extrapolar a poblaciones reales⁷. Para poder demostrar la utilidad de un ensayo es necesario evaluarlo en poblaciones reales, con prevalencias similares a las encontradas en la práctica clínica.

El objetivo de esta revisión es analizar la eficacia de los marcadores urinarios, seleccionando estudios que utilicen exclusivamente pacientes en vigilancia de TVNMI, en comparación con el método clásicamente utilizado (cistoscopia y citología urinaria). Desde el punto de vista práctico se pretende evaluar si hoy en día podemos reducir el número de cistoscopias necesarias en el seguimiento del TVNMI.

Adquisición de la evidencia

El 1 de agosto de 2018 dos facultativos realizaron una búsqueda bibliográfica en MedLine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Embase (<http://www.embase.com>) y librería Cochrane (<http://www.cochrane.org>), acotada a los últimos 10 años, idioma inglés o castellano, utilizando los términos: *bladder cancer, recurrence, detection and urine marker*. Se obtuvieron 973 registros, y siguiendo los criterios Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA), finalmente se identificaron 27 estudios que cumplían los criterios de selección: análisis comparativo entre algún marcador urinario y cistoscopia y citología exclusivamente en la vigilancia de pacientes con TVNMI (fig. 1).

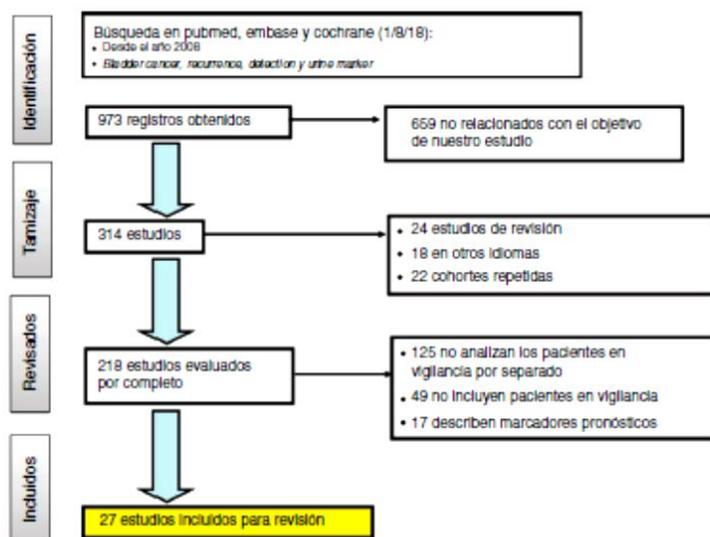


Figura 1 Diagrama de flujo de estudios identificados, revisados e incluidos según PRISMA.

Evaluación de la calidad de los estudios incluidos

El resultado de aplicar la herramienta QUADAS-2⁸ se muestra en la figura 2. El sesgo más frecuentemente registrado es no especificar la positividad del ensayo en la metodología. A pesar de esto, la mayoría de los artículos incluidos en la revisión cumplen la mayoría de los criterios QUADAS-2, lo que sugiere que la calidad es moderada-alta.

Síntesis de la evidencia

Para facilitar el análisis hemos dividido los marcadores en 3 grupos y los describimos en orden de cantidad de estudios, desde los que tienen más literatura a los que menos: ensayos de factores de transcripción, marcadores proteicos y ensayos celulares. Además, analizamos por separado el diagnóstico anticipado, un tópico evaluado en algunas de las publicaciones revisadas.

Ensayos de factores de transcripción

En este grupo se incluyen pruebas que detectan ADN o ARN (microARN, ARN mensajero) en orina acelular o en el «pellet» de células exfoliadas de la vía urinaria. Los ARN mensajeros (mARN), son cadenas dobles de ARN codificantes que se encuentran en el citoplasma⁹. Su expresión se utiliza para identificar y cuantificar genes mutados asociados al TV⁶. Las mutaciones del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR3) están asociadas al TVNM1 hasta el 70% y se asocian a recidivas de bajo grado¹⁰. Allory et al., demostraron una elevada prevalencia de mutaciones del gen promotor de TERT (telomerasa transcriptasa inversa)

en hasta el 80% de pacientes con TV. La sensibilidad frente a la recidiva fue solo del 42% aumentando hasta el 50% al combinar mARN TERT y mARN FGFR3¹¹. Kavalieris y Lotan, evaluaron el ensayo CxBladder⁸. Este ensayo detecta cuantitativamente la expresión de mARN de CXCR2, HOXA13, MDK, IGFBP5 y CDK1, además de incluir en su algoritmo si es un TV primario o recidivado y el intervalo libre hasta la recidiva. La sensibilidad fue superior al 90% y el valor predictivo negativo (VPN) superó el 95%^{12,13}. Pichler et al., evaluaron el ensayo Xpert Bladder Cancer¹⁴. Este ensayo detecta la expresión del mARN de ABL1, CRH, IGF2, UPK1B y ANXA10 y se puede realizar automatizadamente en la consulta (PdC: punto de control) obteniéndose resultados en menos de 2 h. La sensibilidad fue de 84% y el VPN de 93%. Hoy en día, no hay otras publicaciones que validen estos resultados. Los microARN (miARN) son cadenas simples de ARN, de menos de 22 nucleótidos, no codificantes, que regulan la expresión de mARN. Sapre et al., han utilizado un panel con 6 miARN: miR16, miR200c, miR205, miR21, miR221 y miR34a, y han observado una sensibilidad y especificidad de 88% y 48% respectivamente y un VPN de 75%. En la tabla 1 se exponen las características y resultados de los estudios basados en ARN.

Los microsatélites (MS) son regiones altamente polimórficas de ADN, parte integral de la progresión neoplásica, que pueden ser usados como marcadores clonales del TV. El estudio de los MS ha permitido demostrar zonas de pérdida de la heterocigocidad (LOH) que están asociadas al TV⁷. Van der Aa et al., combinaron la detección de la mutación de FGFR3 y la detección de zonas de LOH en MS de 10 cromosomas observando una sensibilidad de 58% y un VPN de 94%¹⁵. Zuiverloon et al., observaron, que en pacientes con la mutación de FGFR3, la reparación durante la vigilancia del gen mutado en células exfoliadas de la orina comportaba un riesgo de recidiva de 81%, siendo el VPN del 94%¹⁶.

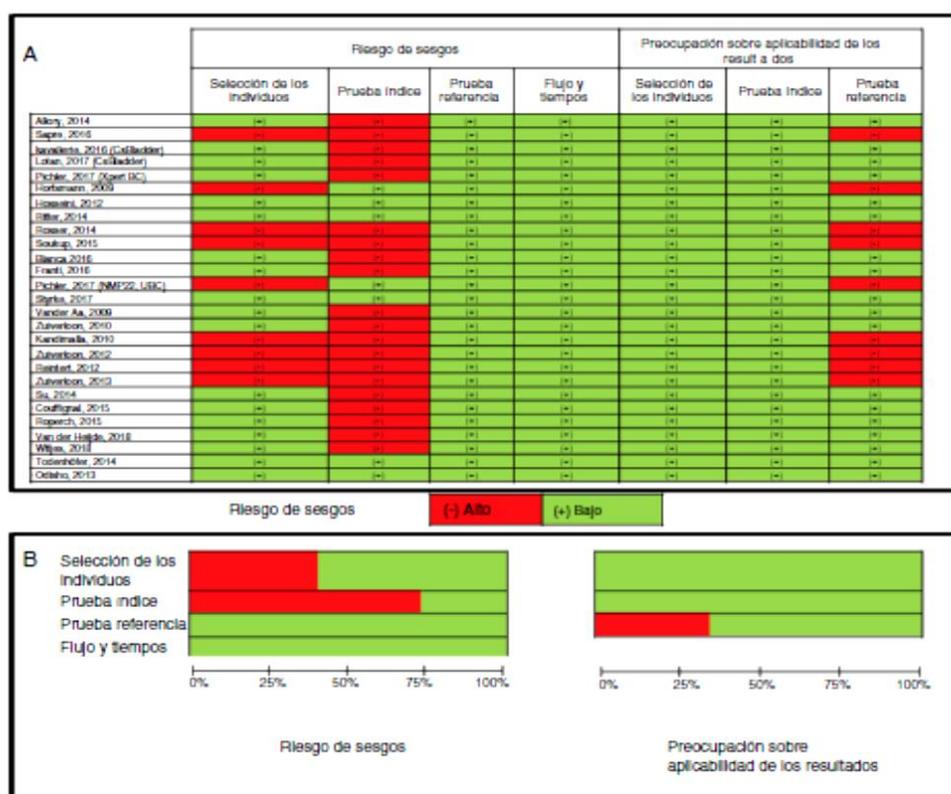


Figura 2 Evaluación de los estudios incluidos usando la herramienta QUADAS-2. A) Resumen de riesgo de sesgos: evaluación de cada tipo de sesgo en cada estudio incluido. B) Gráfico de riesgo de sesgos: resume la evaluación de cada tipo de sesgo como porcentajes del total de estudios.

Tabla 1 Resumen de los estudios con ARN. Se muestran pacientes y parámetros de precisión diagnóstica

Autor, año	Biomarcador	Pacientes con recidiva	Pacientes sin recidiva	Sensibilidad	Especificidad	VPN ^a	Sensibilidad en AG ^b
Allory et al., 2014 ¹¹	TERTp + FGFR3	109	85	50	71	NE ^c	NE
Sapre et al., 2016 ⁷	miR16, miR200c, miR205, miR21, miR221 y miR34a	25	25	88	48	75	NE
Kavalieris et al., 2016 ¹²	CXCR2, HOXA13, MDK, IGFBP5 y CDK1(CxBladder [®]) ^d	156	607	92	NE	96	95
Lotan et al., 2017 ¹³	CXCR2, HOXA13, MDK, IGFBP5 y CDK1(CxBladder [®]) ^d	151	597	91	NE	96	97
Pichler et al., 2017 ¹⁴	ABL1, CRH, IGF2, UPK1B y ANXA10(XpertBC [®]) ^d	43	97	84	91	93	100

^a Valor predictivo negativo.

^b Alto grado.

^c No especificado.

^d Validado para uso comercial.

Posteriormente, evaluaron las mutaciones (FGFR3, PIK3CA y RAS), análisis de MS y metilación de ADN en pacientes con TV de bajo grado y observaron que la evaluación conjunta de las tres mutaciones no mejora la detección de recidiva y que la mejor combinación fue FGFR3 y análisis de MS, obteniendo una sensibilidad de 82%¹⁷. Couffignal et al., detectaron la mutación de FGFR3 en el 39% de los TV primarios. La detección de la mutación durante la vigilancia tuvo una sensibilidad del 73% y un VPN del 94%¹⁸.

Las metilaciones del ADN son cambios epigenéticos, estables y que se asocian al desarrollo de neoplasias mediante la inactivación de genes supresores y/o la sobreexpresión de oncogénos¹⁹. La detección de estas metilaciones se ha estudiado extensamente como biomarcadores del TVNMI, en paneles exclusivos de metilaciones o combinados con otros ensayos. Kandimalla et al., combinaron la detección de FGFR3 y tres metilaciones (OTX1, ONECUT2 y OSR1) y sin necesidad de considerar el estado de FGFR3, observaron una sensibilidad global y VPN de 79% y 76% respectivamente. En TV de alto grado la sensibilidad fue del 80% y del 73% en TV de bajo grado⁶. Reinert et al., una vez determinado el estado de metilaciones del TV inicial, controlaron la reaparición de los genes metilados. En total analizaron el estado de 6 metilaciones (EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM y ZNF154). Durante el seguimiento alcanzaron sensibilidades en la detección de recidiva entre 87 y 93%. Sin embargo, no demostraron beneficio al combinar metilaciones²⁰. Roperch et al., también evaluaron el estatus de FGFR3 y 18 metilaciones²¹. En su análisis, la mejor combinación asoció 3 metilaciones (HS3ST2, SLIT2 y SEPTIN9) con una sensibilidad global para la recidiva del 90%. Zuiverloon et al., evaluaron un panel de 23 metilaciones sin determinar su estado en el TV inicial. La mejor combinación la obtuvieron con las metilaciones APCa, TERTa, TERTb y EDNRB, alcanzando una sensibilidad del 72%²². Su et al., con un panel de 3 metilaciones (SOX1, IRAK3 y L1-MET) observaron una sensibilidad y especificidad de 86% y 89% respectivamente²³. En un estudio multicéntrico en el que se incluyeron más de 450 muestras, van der Heijden et al., con la detección conjunta de la metilación de 3 genes (CFTR, SALL3 y TWIST1), observaron una sensibilidad y VPN de 89,6% y 82,86% respectivamente. También estimaron que, al ajustar la prevalencia de recidivas a la práctica clínica habitual, su panel de metilaciones podría alcanzar un VPN del 99%, pudiéndose evitar más del 35% de las cistoscopias durante el seguimiento de los TVNMI²⁴. Witjes et al., en un estudio multiinstitucional europeo utilizaron el Bladder EpiCheck[®], un ensayo que evalúa 15 metilaciones, en más de 350 muestras durante el primer año de vigilancia. Observaron una sensibilidad y un VPN global del 68% y 95% respectivamente. También estimaron que, si se excluyen los pTa de bajo grado, el VPN asciende a 99,3%, lo que permitiría descartar recidivas de alto grado y reducir las cistoscopias de vigilancia²⁵. En la tabla 2 se resumen los estudios con ADN.

Marcadores proteicos

La cuantificación de proteínas en orina es sencilla y habitualmente se realiza mediante inmunoensayos. Recientemente, algunos ensayos se han automatizado y permiten su deter-

minación en el punto de control (PdC)⁵. Actualmente es también posible la determinación de paneles de proteínas.

Existen dos ensayos que determinan NMP22 (proteína de la matriz nuclear 22). El NMP22 Bladder ELISA test[®], un ensayo cuantitativo y realizado en laboratorio y el NMP22 BladderChek[®], un ensayo POC cualitativo). En el ensayo cuantitativo el punto de corte más utilizado ha sido 10 U/mL, aunque algunos autores lo han ajustado en función de sus resultados. En la prueba cualitativa el «positivo» se obtiene con 10 U/mL o más. La detección de NMP22 en orina está validada por la FDA para el diagnóstico del TV². Horstmann et al., utilizando la prueba ELISA cuantitativa, obtuvieron una sensibilidad y VPN de 68% y 60% respectivamente²⁶. En TV de alto grado, la sensibilidad ascendió a 80%. Hosseini et al., utilizando el ensayo POC, obtuvieron una sensibilidad de 78,8% y un VPN de 85,3%²⁷. Utilizando el mismo ensayo, Pichler et al., observaron una sensibilidad de 12,9%²⁸. Por otra parte, un grupo propone el uso del BladderChek[®], sustituyendo la citología en la vigilancia del TVNMI, basándose en su menor costo, inmediatez y un VPN de 90,5%²⁹. Shariat et al., en un análisis de más de 2000 muestras y utilizando un algoritmo de decisión, demostró que el uso del NMP22 Bladder ELISA test[®] podría reducir un 23% de las cistoscopias durante la vigilancia de los TVNMI³⁰.

El ensayo *Urinary Bladder Cancer* (UBC[®]) evalúa la presencia de CK 8 y 18 en orina. Se puede realizar cuantitativamente con un ELISA, de forma cualitativa y PdC (UBC STAT[®]) y cuantitativa y PdC, mediante un lector espectrofotométrico, denominada UBC rapid POC^{®31}. En 3 publicaciones que utilizaron el UBC rapid POC[®] se obtuvieron sensibilidades globales entre 54% y 64%. El mejor VPN reportado fue de 70,5% y la mejor sensibilidad para detectar TV de alto grado fue 79%^{28,31,32}.

La determinación simultánea de varias proteínas tiene como objetivo aumentar la precisión diagnóstica global y se han publicado resultados con diferentes combinaciones de proteínas urinarias. Rosser et al., analizaron un panel de 10 proteínas observando una sensibilidad global de 79% y de 65% en TV de alto grado³³. Soukup et al., después de evaluar 27 proteínas urinarias, determinaron que con el uso de la citología urinaria y 2 proteínas alcanzaban una sensibilidad de 92%³⁴. Otro grupo, utilizó un panel de 5 proteínas además de otros parámetros clínicos (número de recidivas, estadio tumoral y antecedente de instilaciones con BCG)³⁵. También se han utilizado ensayos que detectan péptidos (fragmentos de proteínas como hemoglobina, colágeno, apolipoproteína A, etc.). Frantzi et al., observaron una sensibilidad de 88%, utilizando espectrometría de masas para cuantificar 106 péptidos³⁶. En la tabla 3 se resumen los estudios con proteínas urinarias.

Ensayos celulares

En este apartado incluimos dos ensayos; UroVysion FISH[®] (Vysis, Laboratorios Abbott, Des Plaines, EE. UU.) y el uCyt⁺ (Scimed Inc., Denville, EE. UU.). UroVysion FISH[®] (hibridación fluorescente in situ) contiene sondas que hibridan con las regiones centroméricas de los cromosomas 3, 7 y 17 y una sonda de secuencia única que hibrida con el gen p16 en 9p21. Para el diagnóstico se requiere la visualización de al menos 25 células morfológicamente anómalas; la

Tabla 2 Resumen de los estudios con ADN. Se muestran pacientes y parámetros de precisión diagnóstica

Autor, año	Biomarcador	Pacientes con recidiva	Pacientes sin recidiva	Sensibilidad	Especificidad	VPN ^a	Sensibilidad en AG ^b
Van der Aa et al., 2009 ¹⁵	MS ^c + mutación FGFR3	84	731	58	73	94	NE ^d
Zuiverloon et al., 2010 ¹⁶	Mutación FGFR3	45	89	58	NE	89	NE
Kandimalla et al., 2013 ⁶	Mutación de FGFR3 + 3 metilaciones (OTX1, ONECUT2 y OSR1)	95	130	79	NE	76	73
Zuiverloon et al., 2012 ²²	4 metilaciones (APCa, TERTa, TERTb y EDNRB)	65	29	72,3	55,3	NE	NE
Reinert et al., 2012 ²⁰	6 metilaciones (EQMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM y ZNF154)	101	57	87-93	28-47	55-78	NE
Zuiverloon et al., 2013 ¹⁷	MS + mutación de FGFR3	136	NE	82	34	NE	NE
Su et al., 2014 ²³	3 metilaciones (SOX1, IRAK3 y L1-MET)	34	56	86	89	NE	NE
Couffignal et al., 2015 ¹⁸	Mutación FGFR3	30	38	73	87	94	NE
Roperch et al., 2015 ²¹	Mutación de FGFR3 + 3 metilaciones (HS3ST2, SLIT2 y SEPTIN9)	86	72	90	65	NE	NE
Van der Heijden et al., 2018 ²⁴	3 metilaciones (CFTR, SALL3 y TWIST1)	173	285	89	30	83	91
Witjes et al., 2018 ²⁵	Bladder EpiCheck [®] (15 metilaciones) ^a	44	309	68,2	88	95,1-99,3	88,9

^a Valor predictivo negativo.

^b Alto grado.

^c Microsatélite.

^d No especificado.

^e Validado para uso comercial.

detección de 4 o más células con exceso de 2 o más cromosomas 3, 7 o 17 en la misma célula o como mínimo 12 células con supresión en el gen p16³⁷. Para la interpretación del ensayo se requiere personal preparado y con experiencia, además de reportarse hasta un 10% de casos no evaluables³⁸. uCyt +[®] contiene anticuerpos fluorescentes contra glicoproteínas de mucina y antígeno carcinoembrionario. Después de evaluar al menos 500 núcleos, la detección de más de una célula positiva es considerado patológico³⁸. Todenhöfer et al., aplicaron UroVysion[®], uCyt +[®] y NMP22 a más de 400 muestras de pacientes en vigilancia por TVNMI. Demostraron que con el uso de 2 de estos marcadores se puede tener un VPN de 99,1% en los TV de alto grado³⁷. El uso de ensayos «reflejo» se refiere a la utilización de pruebas secundarias (UroVysion[®] o uCyt +[®]) cuando el resultado del ensayo inicial es dudoso (citología dudosa). Odisho et al., utilizaron el uCyt +[®] como reflejo de citología en más de 300 muestras y obtuvieron sensibilidad de 72,9% y VPN de 80%³⁹. En la tabla 4 se resumen los estudios con ensayos celulares.

Diagnóstico anticipado

El diagnóstico anticipado de la recidiva del TVNMI se produce cuando un ensayo de orina es positivo previamente al diagnóstico⁵. El tiempo entre el ensayo positivo y el diagnós-

tico del TV debe ser inferior a un año, según se define en las guías europeas y americanas⁵. Cuatro grupos¹⁵⁻¹⁸, determinaron la presencia de la mutación de FGFR3 y demostraron que entre los 12 y 24 meses más del 80% de los pacientes con la mutación tendrá una recidiva. Otros dos grupos^{20,23}, evaluando la aparición de 9 metilaciones, demostraron que entre el 68% y el 80% de los pacientes recidivan a los 24 meses. La tabla 5 resume los marcadores que reportan diagnóstico anticipado.

Discusión

Sorprende, después de este análisis de la literatura, que a pesar de ser la vigilancia del TVNMI el escenario clínico de mayor interés para un biomarcador urinario, son pocos los estudios que hemos identificado y que específicamente se centran en esta cohorte de pacientes. La mayoría de las publicaciones reportan poblaciones «artificiales» que incluyen pacientes con TV en el momento de su diagnóstico, recidivas de TVNMI de alto y bajo grado, y además lo hacen en proporciones que no reflejan realidad clínica de la vigilancia de los TVNMI⁶. Para poder determinar la utilidad de un marcador, en la vigilancia del TVNMI, hemos analizado únicamente las publicaciones que describen resultados específicamente en esa población y además hemos evaluado

Tabla 3 Resumen de los estudios con marcadores proteicos. Se muestran pacientes y parámetros de precisión diagnóstica

Autor, año	Biomarcador	Pacientes con recidiva	Pacientes sin recidiva	Sensibilidad	Especificidad	VPN ^a	Sensibilidad en AG ^b
Horstmann et al., 2009 ²⁶	NMP22 ^d	113	108	68	49	60	80
Hosseini et al., 2012 ²⁷	NMP22 ^d	52	92	78,8	69,6	85,3	81,3
Ritter et al., 2014 ³¹	UBC ^d	22	29	54,6	77,4	70,5	75
Rosser et al., 2014 ³³	10 proteínas (IL8, MMP9, MMP10, SERPINA1, VEGFA, ANG, CA9, APOE, SERPINE1 y SDC1)	53	72	79	88	NE ^c	65,2
Soukup et al., 2015 ³⁴	Midkine y Synuclein G (y citología)	44	61	92,68	90,16	NE	NE
Blanca et al., 2016 ⁴¹	FGFR3 + Cyclina	102	219	73	90	86	NE
Frantzi et al., 2016 ³⁵	106 péptidos	55	156	88	51	NE	NE
Pichler et al., 2017 ²⁸	NMP22 ^d	31	44	12,9	100	NE	7,1
Styrke et al., 2017 ³²	UBC ^d	31	44	64,5	81,8	NE	35,7
	UBC ^d	43	32	NE	NE	NE	79,2

^a Valor predictivo negativo.

^b Alto grado.

^c No especificado.

^d Validado para uso comercial.

Tabla 4 Resumen de los estudios con ensayos celulares. Se muestran pacientes y parámetros de precisión diagnóstica

Autor, año	Técnica	Pacientes con recidiva	Pacientes sin recidiva	Sensibilidad	Especificidad	VPN ^a	Sensibilidad en AG ^b
Todenhöfer et al., 2014 ³⁷	UroVysion ^{®d} y uCyt + ^{a4}	128	355	80-90	NE ^c	89-99,1	NE
Odisho et al., 2013 ³⁹	uCyt + ^a (reflejo) ^d	86	306	72,9	47,1	80,2	73,5

^a Valor predictivo negativo.

^b Alto grado.

^c No especificado.

^d Validado para uso comercial.

la posibilidad de mejorar el protocolo habitual de vigilancia del TVNMI, adecuando el número y frecuencia de cistoscopias.

Entre los ensayos genéticos que evalúan ARN, hemos encontrado dos (CxBladder[®] y XpertBC[®]) que podrían mejorar la vigilancia del TVNMI. CxBladder[®] es un ensayo prometedor ya que su VPN supera el 96% y ello permitiría reducir un elevado número de cistoscopias^{12,13}. XpertBC[®] tiene la ventaja de poderse realizar en el punto de control y, en una cohorte con una tasa de recidiva del 30% su VPN fue del 93%¹⁴. A pesar de los buenos resultados observados con estos dos ensayos en la vigilancia del TVNMI, no se han diseñado estudios que comparen distintos protocolos de vigilancia.

Entre los ensayos que evalúan ADN, cinco reportan VPN que superan el 80%, lo que permitiría reducir el número de cistoscopias en la vigilancia del TVNMI (tabla 2). De estas

cinco publicaciones, dos comparan protocolos de vigilancia y estiman una reducción de cistoscopias. Van der Heijden et al., han estimado una reducción del 35% de cistoscopias²⁴. Witjes et al., con Bladder EpiCheck[®], han observado un VPN de 99,1% cuando se consideran solo recidivas de alto grado y estiman una reducción relevante de cistoscopias²⁵. En las otras tres publicaciones que evalúan ensayos de ADN, no se comparan protocolos de vigilancia.

La cuantificación de proteínas en orina mediante inmunoensayos se realiza desde hace más de 30 años¹⁶. Marcadores basados en la cuantificación de NMP22 y citoqueratinas 8 y 18 (UBC[®]) han sido ampliamente estudiados y los resultados han sido muy heterogéneos, motivo por el cual no son recomendados por las guías de práctica clínica^{27,28,31}. Con la mejoría en las técnicas de cuantificación de proteínas, la tendencia actual es analizar paneles proteicos. Entre las publicaciones revisadas, pocas reportan el VPN, lo que

Tabla 5 Resumen de los estudios que reportan marcadores con diagnóstico anticipado. Se muestran tiempo máximo de seguimiento tasa de «falsos positivos» y porcentaje que recidivan

Autor, año	Biomarcador	Tiempo de seguimiento (meses)	Tasa de «falsos positivos»	Porcentaje de falsos positivos que recidivan
Van der Aa et al., 2009 ¹⁵	MS ^a + mutación FGFR3	24	198/80 %	83%
Zuiverloon et al., 2010	Mutación FGFR3	12	NE ^b	81%
Reinert et al., 2012 ²⁰	6 metilaciones (EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM y ZNF154)	24	30 / 37 %	68%
Zuiverloon et al., 2013 ¹⁷	MS + mutación de FGFR3	12	NE	85%
Su et al., 2014 ²³	3 metilaciones (SOX1, IRAK3 y L1-MET)	NE	6 / 17 %	80 %
Couffignal et al., 2015 ¹⁸	Mutación FGFR3	24	5 / 18 %	81 %

^a Microsatélites.

^b No especificado.

impide estimar la reducción de cistoscopias durante la vigilancia del TVNMI (tabla 3). Una ventaja importante de los inmunoensayos es la posibilidad de hacerlos en el punto de control (UBC[®] y NMP22), una característica muy útil para los clínicos. Dos estudios que evaluaron proteínas sugieren poder cambiar el protocolo de vigilancia del TVNMI. Terrell et al., demostraron que con el uso de BladderChek[®] (NMP22 en el punto de control) se puede evitar la citología urinaria, estimando que la vigilancia sería más ágil y se reducirían costes²⁷. Shariat et al., sugieren que con el uso de NMP22 Bladder ELISA test[®] se podría reducir un 23% las cistoscopias en la vigilancia del TVNMI²⁰.

Los ensayos de base celular tienen la limitación de que requieren personal entrenado y tiempo, además de que en algunos casos no se pueden obtener resultados concluyentes³⁸. Estas razones han llevado a que su uso sea limitado a pruebas «reflejo» de la citología urinaria convencional (cuando la citología es dudosa)^{39,40}. Aunque las publicaciones revisadas reportan VPN superiores al 80% (tabla 4), la complejidad de su interpretación los descarta como una opción para simplificar y mejorar la vigilancia del TVNMI.

La anticipación a la recidiva del TVNMI se describió inicialmente en los ensayos celulares, aunque con resultados heterogéneos³⁹. Con la introducción de ensayos genéticos, se ha intentado cuantificar alteraciones (metilaciones, mutaciones de ADN) que precedan a la aparición de la recidiva tumoral. Algunos estudios demuestran que las mutaciones y metilaciones no dan una idea clara de cuándo aparecerá la recidiva y que en algunos casos, metilaciones y mutaciones no implican recidiva tumoral²⁰. Los estudios analizados reportan tasas de diagnósticos anticipados de hasta el 85%¹⁷. Estos resultados deben ponderarse porque en algunos estudios las recidivas se describen a los 24 meses, lo que muy probablemente no tenga relación con la alteración genética que demuestra el ensayo, si no con la historia natural de la enfermedad. De cualquier manera, determinar mutaciones y metilaciones, así como alteraciones cromosómicas celulares, permite determinar un grupo de riesgo para adecuar la vigilancia, ajustando la frecuencia de cistoscopias.

En esta revisión no hemos incorporado marcadores de los que no existen publicaciones en la última década y la limita-

ción fundamental para establecer la síntesis de la evidencia es la escasez de estudios bien diseñados específicamente en la vigilancia del TVNMI.

Conclusiones

En la última década se han estudiado gran cantidad de marcadores con el objetivo de mejorar la vigilancia del TVNMI. Se han utilizado ensayos de factores de transcripción, de proteínas y de base celular. Algunos de ellos han demostrado tener gran precisión diagnóstica, sin embargo, son pocos los que han demostrado mejorar el protocolo de vigilancia del TVNMI. En el futuro deberían realizarse estudios que además de probar la precisión diagnóstica del ensayo, demuestren poder mejorar la vigilancia del TVNMI.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Miñana B, Cózar JM, Palou J, Unda Urzatz M, Medina-Lopez RA, Subirà Rios J, et al. Bladder cancer in Spain 2011: population based study. *J Urol*. 2014;191:323–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2013.08.049>.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BWG, Compérat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol*. 2013;64:639–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2013.06.003>.
- D'Costa JJ, Goldsmith JC, Wilson JS, Bryan RT, Ward DG. A systematic review of the diagnostic and prognostic value of urinary protein biomarkers in urothelial bladder cancer. *Bladder Cancer*. 2016;2:301–17. <http://dx.doi.org/10.3233/BLC-160054>.
- Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kasouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015;33:66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.06.008>, e25–31.
- Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, et al. EAU Guidelines on non-muscle-invasive urothelial carci-

- noma of the bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017;71:447-61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.05.041>.
6. Kandimalla R, Maslus R, Beukers W, Bangma CH, Orntoft TF, Dyrskjot L, et al. A 3-Plex Methylation Assay Combined with the FGFR3 Mutation Assay Sensitive Detects Recurrent Bladder Cancer in Voided Urine. *Clin Cancer Res.* 2013;19:4760-9, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3276.
 7. Van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2005;47:736-48, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2005.03.014>.
 8. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: A Revised Tool for the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies. *Ann Intern Med.* 2011;155:529-536. doi: 10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009.
 9. Sapre N, Macintyre G, Clarkson M, Naeem H, Cmero M, Kowalczyk A, et al. A urinary microRNA signature can predict the presence of bladder urothelial carcinoma in patients undergoing surveillance. *Br J Cancer.* 2016;114:454-62, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.472>.
 10. Critelli R, Fasanelli F, Oderda M, Polidoro S, Assumma MB, Viberti C, et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up. *Oncotarget.* 2016;7, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11883>.
 11. Allory Y, Beukers W, Sagera A, Flández M, Marqués M, Márquez M, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: High frequency across stages detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol.* 2014;65:360-6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.052>.
 12. Kavalieris L, O'Sullivan P, Frampton C, Guilford P, Darling D, Jacobson E, et al. Performance characteristics of a multigene urine biomarker test for monitoring for recurrent urothelial carcinoma in a multicenter study. *J Urol.* 2017;197:1419-26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2016.12.010>.
 13. Lotan Y, O'Sullivan P, Raman JD, Shariat SF, Kavalieris L, Frampton C, et al. Clinical comparison of non-invasive urine test for ruling out recurrent urothelial carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2017;35:531, <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.03.008>, e15-531.e22.
 14. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G, Klinglmaier G, Sotelman A, Horninger W, et al. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int.* 2018;121:29-37, doi: 10.1111/bju.14019.
 15. Van der Aa MNM, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, Boogaard MW, Nijssen Y, van der Keur KA, et al. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: Feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer Trial [CEFUB]). *Eur Urol.* 2009;55:659-68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2008.05.001>.
 16. Zulvertoon TCM, van der Aa MNM, van der Kwast TH, Steyerberg EW, Lingsma HF, Bangma CH, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3011-8, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3013.
 17. Zulvertoon TCM, Beukers W, van der Keur KA, Nieuweboer AJM, Reinert T, Dyrskjot L, et al. Combinations of Urinary Biomarkers for Surveillance of Patients with Incident Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: The European FP7 URO-MOL Project. *J Urol.* 2013;189:1945-51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.11.115>.
 18. Couffignal C, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I, Roupert M, et al. The diagnostic and prognostic performance of urinary FGFR3 mutation analysis in bladder cancer surveillance: A Prospective Multicenter Study. *Urology.* 2015;86:1185-91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2015.07.036>.
 19. Feber A, Dhani P, Dong L, de Winter P, Tan WS, Martinez-Fernández M, et al. UroMark—a urinary biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Clin Epigenetics.* 2017;9, <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-016-0303-5>.
 20. Reinert T, Borre M, Christiansen A, Hermann GG, Ørntoft TF, Dyrskjot L. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1 VM, and ZNF154 Hypermethylation. *PLoS ONE.* 2012;7:e46297, doi: 10.1371/journal.pone.0046297.
 21. Roperch J-P, Grandchamp B, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I, et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2 SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer.* 2016;16, doi: 10.1186/s12885-016-2748-5.
 22. Zulvertoon TCM, Beukers W, van der Keur KA, Munoz JR, Bangma CH, Lingsma HF, et al. A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine: Methylation assay for detecting nmIBC recurrences in voided urine. *BJU Int.* 2012;109:941-8, doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10428.x.
 23. Su S-F, de Castro Abreu AL, Chihara Y, Tsal Y, Andreu-Vieyra C, Daneshmand S, et al. A panel of three markers hyper- and hypomethylated in urine sediments accurately predicts bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2014;20:1978-89, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2637.
 24. Van der Heljden AG, Mengual L, Ingelmo-Torres M, Lozano JJ, van Rijn-van de Westerlo CCM, Baixauli M, et al. Urine cell-based DNA methylation classifier for monitoring bladder cancer. *Clin Epigenetics.* 2018;10, doi: 10.1186/s13148-018-0496-x.
 25. Witjes JA, Morote J, Cornel EB, Gakis G, van Valenberg FJP, Lozano F, et al. Performance of the Bladder EpiCheck™ Methylation Test for Patients Under Surveillance for Non-muscle-Invasive Bladder Cancer: Results of a Multicenter, Prospective Blinded Clinical Trial. *Eur Urol Oncol.* 2018;1:307-13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.euo.2018.06.011>.
 26. Horstmann M, Patschan O, Hennenlotter J, Senger E, Fell G, Stenzl A. Combinations of urine-based tumour markers in bladder cancer surveillance. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43:461-6, doi: 10.3109/00365590903296837.
 27. Hosseini J, Golshan AR, Mazloomfard MM, Mehrsal A, Zargar MA, Ayati M, et al. Detection of recurrent bladder cancer: NMP22 test or urine cytology? *Urol J.* 2012;9:367-72.
 28. Pichler R, Tulchiner G, Fritz J, Schaefer G, Horninger W, Heldegger I. Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *Int J Med Sci.* 2017;14:811-9, doi: 10.7150/ijms.19929.
 29. Terrell JD, Elias KJ, Sagalowsky AI, Lotan Y. Patients with a negative cystoscopy and negative Nmp22® Bladdercheck® test are at low risk of missed transitional cell carcinoma of the bladder: a prospective evaluation. *Int Braz J Urol.* 2011;37:706-11, doi: 10.1590/S1677-55382011000600004.
 30. Shariat S, Zippe C, Ludecke G, Boman H, Sanchezcarbayo M, Casella R, et al. Nomograms including nuclear matrix protein 22 for prediction of disease recurrence and progression in patients with Ta T1 or CIS transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 2005;173:1518-25, doi: 10.1097/01.ju.0000154696.48217.75.

31. Ritter R, Hennenlotter J, Kühls U, Hofmann U, Aufderklamm S, Blutbacher P, et al. Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Invest.* 2014;32:337-44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.09.024>.
32. Styrke J, Henriksson H, Ljungberg B, Hasan M, Silfverberg I, Einarsson R, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of UBC[®] Rapid In bladder cancer: a Swedish multicentre study. *Scand J Urol.* 2017;51:293-300, doi: 10.1080/21681805.2017.1313309.
33. Rosser CJ, Chang M, Dai Y, Ross S, Mengual L, Alcaraz A, et al. Urinary protein biomarker panel for the detection of recurrent bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:1340-5, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0035.
34. Soukup V, Kalousov M, Capoun O, Sobotka R, Breyt Z, Pet M, et al. Panel of urinary diagnostic markers for non-invasive detection of primary and recurrent urothelial urinary bladder carcinoma. *Urol Int.* 2015;95:56-64, doi: 10.1159/000368166.
35. Gogalic S, Sauer U, Doppler S, Heinzl A, Perco P, Lukas A, et al. Validation of a protein panel for the noninvasive detection of recurrent non-muscle invasive bladder cancer. *Biomarkers.* 2017:1-8, <http://dx.doi.org/10.1080/1354750X.2016.1276628>.
36. Frantzi M, van Kessel KE, Zwarthoff EC, Marquez M, Rava M, Malats N, et al. Development and validation of urine-based peptide biomarker panels for detecting bladder cancer in a multi-center study. *Clin Cancer Res.* 2016;22:4077-86, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2715.
37. Todenhöfer T, Hennenlotter J, Esser M, Mohrhardt S, Aufderklamm S, Böttge J, et al. Stepwise application of urine markers to detect tumor recurrence in patients undergoing surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer. *Dis Markers.* 2014;2014:1-7, doi: 10.1155/2014/973406.
38. Schmitz-Dräger BJ, Droller M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening early diagnosis, and surveillance: The WHO/ICUD Consensus. *Urol Int.* 2015;94:1-24, doi: 10.1159/000369357.
39. Odisho AY, Berry AB, Ahmad AE, Cooperberg MR, Carroll PR, Konety BR. Reflex immunocyt testing for the diagnosis of bladder cancer in patients with atypical urine cytology. *Eur Urol.* 2013;63:936-40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.019>.
40. Kim PH, Sukhu R, Cordon BH, Sfakianos JP, Sjoberg DD, Hakimi AA, et al. Reflex fluorescence in situ hybridization assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer with negative surveillance cystoscopy: Reflex FISH assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer. *BJU Int.* 2014, n/a-n/a, doi: 10.1111/bju.12516.
41. Blanca A, Requena MJ, Alvarez J, Cheng L, Montironi R, Raspollini MR, et al. FGFR3 and Cyclin D3 as urine biomarkers of bladder cancer recurrence. *Biomark Med.* 2016;10:243-53, doi: 10.2217/bmm.15.120.

Publicación 2

2. Assessing the Clinical Benefit of UBC Rapid® in the Surveillance and Initial Diagnosis of Bladder Cancer. Agreda Castañeda F, Raventós Busquets CX, Morote Robles. Journal of Clinical Genitourinary Cancer. 2019 Dec 4. pii: S1558-7673(19)30352-0. DOI: 10.1016/j.clgc.2019.11.001. PMID:3191112

Assessing the Clinical Benefit of UBC Rapid in the Surveillance and Initial Diagnosis of Bladder Cancer

Fernando Agreda Castañeda,¹ Carles Xavier Raventós Busquets,²
Juan Morote Robles²

Abstract

We aimed to determine whether the UBC (urinary bladder cancer) Rapid test could reduce the number of required cystoscopies in the surveillance of patients with superficial bladder cancer. We found that the UBC Rapid assay failed to detect small tumors and did not improve the surveillance protocol.

Introduction: Several studies have shown that abnormal urine levels of cytokeratins 8 and 18 are associated with bladder cancer. However, the clinical benefit of the UBC (urinary bladder cancer) Rapid assay has remained unclear.

Patients and Methods: We performed the UBC Rapid assay and voided cytology in 336 patients—297 in surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer and 39 with newly diagnosed bladder cancer. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated by contingency. We also controlled for the patients with positive UBC Rapid findings but negative cystoscopy findings to prove the former's ability to provide an anticipatory diagnosis. **Results:** We diagnosed 27 recurrences (9.8%). Overall, the sensitivity of the UBC Rapid assay was better for the higher risk groups and after adding the cytology findings. The only independent predictor of a positive UBC Rapid assay was the tumor size. Of the 81 patients with positive UBC Rapid findings without positive cystoscopy findings, 8 (10%) had developed a recurrence within the first year. Avoiding cystoscopy for the patients with UBC Rapid negative results could avoid 184 cystoscopies (66%) but would result in missing 7 of 13 high-risk recurrences. **Conclusions:** The performance of the UBC Rapid assay improved with increasing tumor size. Limiting cystoscopies to patients with UBC Rapid positive results could result in a reduction in surveillance cystoscopies but could result in missing high-risk recurrences. Finally, the UBC Rapid assay was not useful for anticipatory diagnoses.

Clinical Genitourinary Cancer, Vol. ■, No. ■, ■-■ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Bladder cancer, Diagnosis, Proteomics, Surveillance, Urinary marker

Introduction

Bladder cancer (BC) is the most common malignant neoplasia of the urinary tract.¹ In the diagnosis and surveillance of non-muscle-invasive BC (NMIBC), cystoscopy has been considered the reference standard in the current guidelines, and urinary cytology has been the most used noninvasive test.² Several urinary markers test have been studied regarding their accuracy in the primary diagnosis

and follow-up of BC.³ Two limitations of these available tests are that they are expensive and require an enzyme-linked immunosorbent assay to evaluate the results.⁴ At present, various point-of-care (POC) tests are available, allowing for fast and reliable urine marker detection.

The UBC (urinary BC) antigen Rapid assay (IDL Biotech AB, Bromma, Sweden) is an immunoassay that detects fragments of cytokeratin (CK) 8 and 18 in urine samples. The disadvantage of the dichotomic results of the UBC Rapid assay can be overcome using a photometric reader (Concile Omega 100; Concile GmbH, Freiburg, Germany). The reader was adapted to provide quantitative results of the UBC Rapid assay in a POC fashion. The equivalence of the results provided by the photometric reader and the enzyme-linked immunosorbent assay has been proved.⁵

The possibility of detecting premalignant changes and anticipatory positive findings has been studied for cellular BC tests but not

¹Department of Urology, Hospital Germans Trias i Pujol

²Department of Urology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Submitted: Jun 21, 2019; Revised: Nov 1, 2019; Accepted: Nov 27, 2019

Address for correspondence: Fernando Agreda Castañeda, MD, Department of Urology, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Carretera del Canyet S/N, Badalona, Barcelona 08916, Spain
E-mail contact: fagreda.germanstrias@gencat.cat

Clinical Benefit of UBC Rapid

for protein markers.⁶ Thus, the aim of our study was to evaluate the diagnostic accuracy of the UBC Rapid assay for urine CK8 and CK18 detection as a POC quantitative system for the surveillance and initial diagnosis of BC. We also studied the incidence of false-positive results and anticipatory positive findings, the potential reduction of follow-up cystoscopies, and the relationship of the findings with tumor size, stage, and grade.

Patients and Methods

Patients

In the present prospective study, we performed the UBC Rapid quantitative POC test for 336 consecutive patients at our institution from February 2016 to February 2017. The hospital ethics board approved the present study [reference no. PR (AG)07/2016]. We used the STARD (standards for reporting of diagnostic accuracy studies) criteria (Figure 1).⁷ Data on the cystoscopy findings (ie, tumor size, number of tumors), bladder tumor antecedents, gender, age, interval since the previous transurethral resection of bladder tumor (TURB), previous treatment with bacillus Calmette-Guérin, and voided cytology findings were collected. We also controlled for an anticipatory diagnosis (ie, a positive test result before the diagnosis of BC), when the UBC Rapid test results were positive without positive findings from cystoscopy. For patients with positive cystoscopy findings, the T stage and grade were collected after TURB. The 336 patients were divided into 2 groups: 297 patients receiving follow-up after TURB for NMIBC and scheduled to undergo cystoscopy (group A) and 39 patients scheduled, for the first time, to undergo TURB because of positive findings from imaging studies or cystoscopy (group B). The exclusion criteria were any type of urethral manipulation within 10 days before urine sampling and positive urine culture. Of the 336 patients, 310 were

included in the present study and 26 were excluded (14 because of a positive urine culture before testing, 11 who did not have urine culture findings available, and 1 because of a nonvalid result using the photometric reader).

Test Procedure

Midstream urine was collected, before cystoscopy or TURB, in a sterile plastic container and processed. The urine samples were analyzed using the UBC Rapid assay (IDL Biotech AB), urine cytology, and urine culture. The UBC Rapid test was performed in accordance with the manufacturer's recommendations. After 10 minutes of incubation, the UBC Rapid test cartridges were analyzed using the photometric reader Concile Omega 100 (Concile GmbH) for quantitative analysis. The reader gives a result in a range from < 5 to > 300 µg/L. For cytology, the urine sample was processed and microscopically reviewed by a cytopathologist with experience in BC.

Statistical Analysis

Because we knew that the sensitivity and specificity of the UBC Rapid test is ~50% and 80%, respectively,⁸ that, at our institution, the sensitivity of wash urine cytology is 65%, and assuming an α and β error of 5% and 85%, respectively, we calculated a sample of 350 patients would be necessary to improve the sensitivity. The median and interquartile range and the percentages are reported for the continuous and qualitative variables, respectively. We used nonparametric tests to compare the median values of the continuous variables (Mann-Whitney *U* test) and they χ^2 test for qualitative variables because of a small or non-normal sample. The statistical significance level was set at $P < .05$. Receiver operating characteristic curve analysis was performed to establish the most sensitive

Figure 1 STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies) Diagram Showing the Flow of Participants Through the Present Study

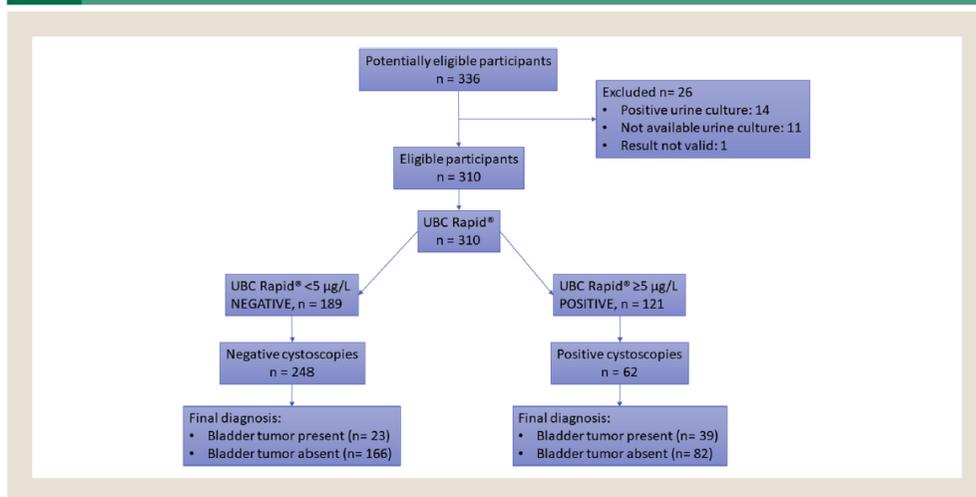


Table 1 Demographic and Clinical Characteristics of Group A (Surveillance)

Characteristic	Value
Patients	275 (100)
Gender	
Male	235 (85.5)
Female	40 (14.5)
Age, y	
Median	73
IQR	64-79
Previous BCG treatment	191 (69.5)
Interval from previous TURB, mo	
Median	40
IQR	20-74
Recurrence found by cystoscopy	27 (9.8)
T stage of recurrence	
pTa	15 (55.6)
pT1	7 (25.9)
≥pT2	3 (11.1)
CIS	2 (7.4)
Recurrence grade	
High grade	11 (40.7)
Low grade	16 (59.3)
Recurrence size, mm	
Median	5
IQR	4-10
Multiplicity of recurrence	
Single	19 (70.4)
Multiple	8 (29.6)

Data presented as n (%), unless otherwise noted. Abbreviations: CIS = carcinoma in situ; IQR = interquartile range; TURB = transurethral resection of bladder tumor.

cutoff. The sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) were calculated. Statistical analysis was performed using SPSS, version 24 (IBM Corp, Armonk, NY).

Results

Of the 310 included patients, 275 were in the surveillance group (group A) and 35 were in the initial TURB group (group B). The demographic and clinical characteristics of group A are presented in Table 1. Of the 275 patients in group A, 85% had had 1 year free of recurrence at study inclusion. In group A, 27 cases of recurrence (9.8%) were diagnosed. Of the recurrence cases, 89% were NMIBC, 60% were low grade, 70% were single tumors, and some had exceeded 10 mm in size. The UBC Rapid assay findings in group A using the most sensitive cutoff (5 µg/L) and the manufacturer's cutoff are presented in Table 2. Both cutoff values showed the same sensitivity for high-risk tumors and a very high NPV after adding the cytology findings. In group A, we detected 81 UBC Rapid results that were ≥ 5 µg/L without positive findings from cystoscopy (29% of patients). After a median follow-up of 29 months (range, 23-35 months), 13 of these 81 patients (16%) had had a diagnosis of a recurrence from cystoscopy. The median time

to recurrence was 12.9 months (range, 2.7-24.9). The results for these 13 recurrences are shown in Table 3.

The demographic and clinical characteristics of group B are presented in Table 4. The gender and age of the patients in group B were very similar to those of the patients in group A. Tumor size and multiplicity (both describing the total tumor volume) were notably greater in group B (*P* < .05). The performance of the UBC Rapid test in group B is shown in Table 5. The best results for detecting high-risk tumors were obtained with a cutoff of 5 µg/L; adding the cytology findings did not show any improvement in group B.

The differences in the UBC Rapid assay results between the 2 groups are listed in Table 6. The UBC Rapid findings were related to the tumor grade, stage, size, and multiplicity and whether the tumor was initial or recurrent on univariate analysis. After multivariate stepwise analysis, the only independent predictor for a positive UBC Rapid finding was tumor size (*P* = .004), described by the expression: [UBC Rapid = 10.086 + 1.782 (tumor size)].

Discussion

To evaluate the performance of the UBC Rapid assay in everyday clinical practice, we included 2 groups of patients in our prospective study. A large group of consecutive patients receiving surveillance (with low- and high-grade NIMBC, with and without previous bacillus Calmette-Guérin instillation) and a group of patients with a first diagnosis of BC and scheduled to undergo TURB. We evaluated the overall and specific performance of the UBC Rapid assay, the likelihood of anticipatory diagnosis (for group A), and the relationship with T stage, pathologic grade, and tumor size. To better describe the results, we analyzed the data from the patients in 2 groups of risk: high risk (high grade, ≥ pT1) and low risk (low grade, < pTa).

The current guidelines do not recommend any protein-based urine marker for the diagnosis or surveillance of NMIBC. Cytology has been suggested as an adjunct of cystoscopy to detect high-grade disease.²

Our recurrence rate was 9.8%. This low prevalence could be explained by the very long freedom from recurrence for our patients (only 15% of patients were in their first year of surveillance), because most recurrences will have developed within the first year of surveillance.² Previous reports have demonstrated a direct relationship to the tumor size,^{9,10} grade,^{5,8,11} and stage.¹² To the best of our knowledge, no previous reports have evaluated these results using multivariate analysis to search for independent predictors. Because the tumor size is related to the tumor grade and stage,² it is probable that the higher Rapid UBC levels describe only the tumor size as a continuous variable. In our cohort, the only independent predictor of a positive UBC Rapid result was the tumor size. These results highlight the significance of the quantitative consideration of the UBC Rapid assay. These results also explain the poor performance of the UBC Rapid assay in our surveillance group, because the median size of the recurrent tumors was only 5 mm. In the initial tumor group, because the tumors were larger, the overall performance of the UBC Rapid assay was better; however, the usefulness of any NMIBC urine marker will mainly be for surveillance.

Clinical Benefit of UBC Rapid

Table 2 Overall and Risk-stratified Performance of UBC Rapid in Group A (Surveillance)

Variable	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	P Value
UBC Rapid manufacturer's cutoff (12.3 µg/L)					
Overall	14.8	89.1	12.9	90.6	.540
High-risk tumor ^a	23.1	89.3	9.7	95.9	.168
Low-risk tumor ^b	7.1	88.5	3.2	94.7	.616
UBC Rapid manufacturer's cutoff (12.3 µg/L) plus voided cytology					
Overall	33.3	84.3	18.8	92.1	.022
High-risk tumor ^a	61.5	84.7	16.7	97.8	<.001
Low-risk tumor ^b	7.1	82.0	2.1	94.3	.297
UBC Rapid cutoff of 5 µg/L					
Overall	33.3	66.9	9.9	90.2	.978
High-risk tumor ^a	46.2	67.6	6.6	96.2	.305
Low-risk tumor ^b	21.4	66.3	3.3	94.0	.341
UBC Rapid cutoff of 5 µg/L plus voided cytology					
Overall	40.7	63.7	10.9	90.8	.649
High-risk tumor ^a	61.5	64.5	7.9	97.1	.057
Low-risk tumor ^b	21.4	62.5	3.0	93.7	.223

Abbreviations: NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value.

^aAny stage ≥ pT1 or high-grade tumor.

^bAny tumor not included in the high-risk category.

We used 2 cutoff levels to evaluate the UBC Rapid assay, the level recommended by the manufacturer (12.3 µg/L) and the most sensitive level (5 µg/L) to obtain the maximum detection of BC. In group A, when we used 12.3 µg/L as the cutoff, the sensitivity was very low: 14.8% overall, 23% for the high-risk group, and 7.1% for the low-risk group. Very similar results were obtained in a study with the same cutoff level.¹³ As expected, when the cutoff was 5 µg/L, the sensitivity was greater: 33% overall, 46% for the high-risk group, and 21.4% for the low-risk group. To the best of our knowledge, no previous studies have reported the results using this cutoff; most previous studies had

used the manufacturer's recommended cutoff of 12.3 µg/L.^{5,10,13,14} One study used 1 µg/L as the cutoff and obtained a sensitivity of 64%.¹⁵ After combining the UBC Rapid results with those from voided cytology, the sensitivity improved and the specificity showed a minor change. Previous investigators have shown that cytology findings can improve the results of the UBC Rapid assay.^{16,17} One study reported a combined sensitivity of 72.9% overall and 88% for high-risk disease.⁵ In our study, the UBC Rapid assay showed superior performance in group B for both risk groups, which has also been previously reported, with higher UBC levels and better diagnostic

Table 3 Follow-up Data From Patients With Positive UBC Rapid Test Results (≥ 5 µg/L) and Negative Cystoscopy Findings

UBC Rapid Assay Result (µg/L)	Latency to Recurrence, mo	Tumor Stage	Tumor Grade
8.1	2.8	pT2	High grade
28.2	3.3	pT1	High grade
6.1	7	pTa + CIS	High grade
7.1	7.8	pT1	High grade
12.6	11.2	pT1	High grade
9.2	12	pT1	High grade
16.1	12	CIS	High grade
13.2	12.2	pT1	High grade
8.5	16.7	PUNLMP	Low grade
24.9	17.3	pT1	High grade
6.9	19	PUNLMP	Low grade
15.9	22.4	pTa	High grade
6.4	24.9	pTx	Low grade

Abbreviations: CIS = carcinoma in situ; PUNLMP = papillary urothelial neoplasm of low malignant potential.

Table 4 Demographic and Clinical Characteristics of Group B (Initial Diagnosis)

Characteristic	Value
Patients	35 (100)
Gender	
Male	33 (94.3)
Female	2 (5.7)
Age, y	
Median	72
IQR	66-78
T stage	
pT _a	11 (31.4)
pT ₁	17 (48.6)
≥pT ₂	7 (20)
Grade	
High grade	23 (65.7)
Low grade	12 (34.3)
Tumor size, mm	
Median	20
IQR	15-40
Tumor multiplicity	
Single	21 (60)
Multiple	14 (40)

Data presented as n (%), unless otherwise noted. Abbreviation: IQR = interquartile range.

performance for initial tumors,⁸ most certainly owing to the greater tumor size.

Setting the cutoff at 5 µg/L, we obtained a very high NPV. If cystoscopies were omitted for every patient with negative UBC

Rapid findings, 184 cystoscopies could have been avoided (67% of the surveillance patients). However, 7 of the 13 high-risk recurrence cases would have been missed. Adding the findings from voided cytology, 174 cystoscopies could have been avoided (63.3% of total cystoscopies). However, 5 of the 13 high-risk recurrence cases would still have been missed. One group, using the NMP22 test, estimated that if a risk of 15% of missed recurrence cases were accepted, ~23% of cystoscopies could be avoided during surveillance.¹⁸ To the best of our knowledge, no other studies have evaluated the reduction in the number of cystoscopies using protein-based urine markers.

Anticipatory BC diagnosis has been defined as a positive urine test result before the diagnosis of BC.¹⁹ The American and European guidelines¹³ have reported that the interval between the urine test and the BC diagnosis should be < 1 year. Several studies have reported the results from using cytology^{19,20} and cellular-based tests.^{6,21,22} In our cohort, 13 of 81 patients (16%) with UBC Rapid assay results that were ≥ 5 µg/L without positive cystoscopy findings developed BC at some point during our study period. If the 1-year definition and the UBC Rapid assay cutoff of 5 µg/L were used, 8 cases would have been diagnosed. Thus, 10% of our patients with a UBC Rapid test result > 5 µg/L and without positive cystoscopy findings would have developed BC within the first year. A recent report estimated this percentage at 75% for wash cytology and 40% for UroVysion fluorescence in situ hybridization (a cell-based genetic immune test).¹⁹ It is fundamental to understand that the 1-year risk of developing recurrence in our cohort was greater (15%; data not shown). Thus, we most certainly had not been prediagnosing BC.

Our study had some limitations. One was that we included patients from a single institution. Another was that we could not complete the sample size of 350 patients.

Table 5 Overall and Risk Stratified UBC Rapid Performance in Group B (Initial Diagnosis)

Variable	Sensitivity (%)	P Value
UBC Rapid manufacturer's cutoff (12.3 µg/L)		
Overall	51.4	
High-risk tumor ^a	66.7	.008
Low-risk tumor ^b	18.2	
UBC rapid manufacturer's cutoff (12.3 µg/L) plus voided cytology		
Overall	62.9	
High-risk tumor ^a	79.2	.003
Low-risk tumor ^b	27.3	
UBC Rapid cutoff of 5 µg/L		
Overall	85.7	
High-risk tumor ^a	91.7	.137
Low-risk tumor ^b	72.7	
UBC rapid cut-off 5 µg/L + voided cytology		
Overall	85.7	
High-risk tumor ^a	91.7	.137
Low-risk tumor ^b	72.7	

^aAny stage ≥ pT₁ or high-grade tumor.

^bAny tumor not included in the high-risk category.

Clinical Benefit of UBC Rapid

Table 6 UBC Rapid Results for Overall Confirmed Tumors Stratified by Group and Grade, Stage, and Risk

Variable	UBC Rapid Results, µg/L		P Value
	Group A (n = 27)	Group B (n = 35)	
Overall	<5 (<5-7.8)	12.9 (5.8-106)	<.001
Grade			
High grade	<5 (<5-15.7)	36.7 (9.9-129)	.003
Low grade	<5 (<5-5.12)	5.6 (4.25-10.25)	.018
T stage			
pTa	<5 (<5)	5.4 (<5-10.4)	.017
pT1	<5 (<5-5.5)	22.6 (9.4-90.85)	.017
≥pT2	<5 (<5)	129 (6.4-241)	.084
Risk group			
High risk	<5 (<5-12.85)	36.25 (9.15-127.75)	.001
Low risk	<5 (<5-5.52)	5.4 (4-10.4)	.024

Data presented as median (interquartile range).

Conclusions

In our cohort, the sensitivity obtained using the UBC Rapid assay was low. Even using the lowest cutoff level admitted by the test, the sensitivity for high-risk tumors remained low. The UBC Rapid assay did not show ability for providing an anticipatory diagnosis. Limiting cystoscopies to patients with positive UBC Rapid results could reduce the number of surveillance cystoscopies but at the cost of missing cases of high-risk recurrence.

Clinical Practice Points

- Surveillance of NMIBC has been performed using routine cystoscopies for several years.
- A major clinical need exists to identify noninvasive urine biomarkers to reduce the number and frequency of cystoscopies.
- The levels of urinary CK8 and CK18 (UBC Rapid assay) seem to be related to the bladder tumor size.
- The UBC Rapid assay had low sensitivity in the detection of BC recurrence, because most of these tumors will be small.
- The UBC Rapid assay also did not show the capability of anticipatory diagnosis in BC surveillance.
- Finally, the UBC Rapid assay was not useful for reducing the number of surveillance cystoscopies.

Disclosure

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136:E359-86.
2. Babjuk M, Böhle A, Burger M, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *Eur Urol* 2017; 71:447-61.
3. Schmitz-Dräger BJ, Droller M, Lokeshwar VB, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urol Int* 2015; 94:1-24.
4. Bergman J, Reznicek RC, Rajfer J. Surveillance of patients with bladder carcinoma using fluorescent in-situ hybridization on bladder washings. *BJU Int* 2008; 101:26-9.

5. Ritter R, Hennenlotter J, Kühs U, et al. Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer. *Urol Oncol* 2014; 32:337-44.
6. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, et al. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:295-301.
7. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 2015; 351:h5527.
8. Stryke J, Henriksson H, Ljungberg B, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of UBC® Rapid in bladder cancer: a Swedish multicentre study. *Scand J Urol* 2017; 51:293-300.
9. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Hernandez-Cerceno ML, González de BJ, Navajo JA. [Cytokeratins (UBC and CYFRA 21-1) and nuclear matrix proteins (NMP22) as urine tumor markers in the diagnosis of bladder cancer]. *Med Clin* 2000; 114:361-6.
10. Gkialas I, Papadopoulos G, Iordanidou L, et al. Evaluation of urine tumor-associated trypsin inhibitor, CYFRA 21-1, and urinary bladder cancer antigen for detection of high-grade bladder carcinoma. *Urology* 2008; 72:1159-63.
11. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G, et al. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int* 2018; 121:29-37.
12. Gleichenhagen J, Arndt C, Casjens S, et al. Evaluation of a new survivin ELISA and UBC® Rapid for the detection of bladder cancer in urine. *Int J Mol Sci* 2018; 19:226.
13. Babjuk M, Soukup V, Pešl M, et al. Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pT1pT1 bladder urothelial carcinoma. *Urology* 2008; 71:718-22.
14. Mian C, Lodde M, Hättel A, et al. Comparison of the monoclonal UBC-ELISA test and the NMP22 ELISA test for the detection of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2000; 55:223-6.
15. Boman H, Hedelin H, Jacobsson S, Holmång S. Newly diagnosed bladder cancer: the relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status. *J Urol* 2002; 168:1955-9.
16. Hakenberg OW, Fuessel S, Richter K, et al. Qualitative and quantitative assessment of urinary cytokeratin 8 and 18 fragments compared with voided urine cytology in diagnosis of bladder carcinoma. *Urology* 2004; 64:1121-6.
17. May M, Hakenberg OW, Gunia S, et al. Comparative diagnostic value of urine cytology, UBC-ELISA, and fluorescence in situ hybridization for detection of transitional cell carcinoma of urinary bladder in routine clinical practice. *Urology* 2007; 70:449-53.
18. Shariat S, Zippe C, Ludecke G, et al. Nomograms including nuclear matrix protein 22 for prediction of disease recurrence and progression in patients with Ta, T1 or CIS transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2005; 173:1518-25.
19. Gopalakrishna A, Fantony JJ, Longo TA, et al. Anticipatory positive urine tests for bladder cancer. *Ann Surg Oncol* 2017; 24:1747-53.
20. Horstmann M, Patschan O, Hennenlotter J, et al. Combinations of urine-based tumour markers in bladder cancer surveillance. *Scand J Urol Nephrol* 2009; 43: 461-6.
21. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003; 169:2101-5.
22. Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, et al. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol* 2008; 26:246-9.

DISCUSSION

En los últimos años se han evaluado gran cantidad de marcadores urinarios en la vigilancia del TVNMI. Muchos de ellos han demostrado tener gran precisión diagnóstica. Ensayos de transcripción (mutaciones de ADN, ARN, metilaciones, microsatélites) y de detección de proteínas son los más comúnmente estudiados. A pesar de resultados relativamente buenos y mucha producción científica, ninguno está recomendado por las guías de práctica clínica para la vigilancia del TVNMI⁵.

Algunas de las limitaciones en la evidencia reportada hasta ahora y que podrían explicar porque no se han incorporado marcadores al algoritmo de vigilancia incluyen:

- Heterogeneidad de técnicas diagnósticas y falta de validación externa.
- Utilizar poblaciones con una composición artificial en las que la prevalencia de recidiva del TVNMI no es real.
- Combinar, en la población de estudio, TVNMI de bajo y alto grado y en proporciones que no reflejan la práctica⁷⁹.
- Un diseño inadecuado de los estudios. La gran mayoría de los diseños buscan evaluar la precisión diagnóstica del marcador. Muy pocos buscan demostrar la superioridad de un protocolo de vigilancia que incluya su marcador.

Demostrar la precisión de un marcador es fundamental pero no suficiente. Es imprescindible probar que puede mejorar el protocolo de vigilancia vigente, basado en cistoscopias y citologías urinarias. La principal manera de mejorar la vigilancia del TVNMI sería reducir el número de cistoscopias y tan solo seis autores han publicado ensayos en esta dirección:

- Babjuk et al, incluyeron prospectivamente 88 pacientes con el primer diagnóstico de TVNMI y los siguieron con cistoscopias, citología urinaria UBC y BTA. Excluyeron de su estudio los pacientes de alto riesgo, lo que limita la aplicabilidad de sus resultados. Estimaron que podrían reducir hasta el 30% de las cistoscopias si se asume una pérdida en el diagnóstico del 10% de los TVNMI de bajo riesgo¹⁶⁴.
- Terrell et al, evaluaron prospectivamente 434 sujetos entre los que se incluían 203 en vigilancia por TVNMI. Aunque en sus resultados no diferencian el grupo de sospecha de TV y el grupo de vigilancia, estiman que con el uso de BladderChek® (NMP22 en el punto de control) se podría evitar la citología urinaria y se reducirían costes¹³⁶.
- Shariat et al, utilizando un modelo estadístico de “árbol de decisiones”, estiman que con el uso de NMP22 Bladder ELISA test® se podrían reducir un 23% las cistoscopias en la vigilancia del TVNMI. Los autores asumieron un riesgo de perder un 8% de recidivas y un 1% de progresiones¹⁷⁵.

- Kavalieris et al, incluyeron prospectivamente 763 pacientes en vigilancia. Utilizando el CxBladder® (expresión de 5 genes + datos clínicos) obtuvieron una sensibilidad entre 94 y 100% en pacientes que puntuaban ≤ 1 en la puntuación EORTC (ver sección 5.1). No estimaron una reducción de cistoscopias pero propusieron que con los resultados del ensayo se podría ajustar la intensidad de la vigilancia⁸¹.

- van der Heijden et al, incluyeron pacientes de 4 centros a nivel internacional, 3 europeos y uno americano. Evaluaron un ensayo que incluye 3 metilaciones. Entre los sujetos incluyeron 458 pacientes en vigilancia por TVNMI. Su población estaba sobre representada en recidivas, 25% de la población en vigilancia presentaba recidiva (cuando estimaron que la tasa real es del 10%). Estimaron un VPN del 99%. Con estos resultados, calcularon poder reducir el 36% de las cistoscopias, si se restringen a los pacientes con el ensayo positivo. Con esta reducción de cistoscopias estimaron una pérdida del 4% de las recidivas, todas de bajo grado⁹².

- Witjes et al, evaluaron prospectivamente 353 pacientes en vigilancia por TVNMI. Describen una tasa real de recidiva del 12%. Utilizando Bladder EpiCheck®, han demostrado un VPN de 99.1% cuando se consideran sólo recidivas de alto grado y estimaron una reducción relevante de cistoscopias en este grupo de riesgo. Con un VPN tan alto, la probabilidad de perder un TV de alto grado es muy baja. Por el contrario, la baja sensibilidad (40%) en

los TVNMI de bajo grado cuestiona el ensayo para su uso en todos los pacientes⁹³.

Con el objetivo de reducir el número de cistoscopias en nuestro centro, diseñamos un estudio utilizando el UBC Rapid[®]. Incluimos dos tipos de pacientes: sujetos en vigilancia por TVNMI y pacientes con el primer diagnóstico de TV. A pesar de que nuestra población de estudio principal son los sujetos en vigilancia por TVNMI, la población de primer diagnóstico de TV nos fue útil para evaluar rendimiento diagnóstico general y establecer la relación del UBC Rapid[®] con parámetros clínicos como el grado, volumen tumoral y estadio. De esta manera, en los pacientes con diagnóstico inicial analizamos el rendimiento general de UBC Rapid[®] (sensibilidad, especificidad, VPN y VPP), relación con volumen tumoral, estadio y grado histológico. En el grupo de vigilancia, además, dividimos la población en grupos de alto riesgo (alto grado o $\geq pT1$) y bajo riesgo (bajo grado y $\leq pTa$) con el objetivo de estratificar el análisis.

Observamos una tasa de recidiva del 9,8%. Utilizamos dos puntos de corte para evaluar el UBC Rapid[®]; el recomendado por el fabricante (12,3 $\mu\text{g/L}$) y el más sensible (obtenido en nuestro análisis ROC, 5 $\mu\text{g/L}$). En el grupo de vigilancia, al utilizar el punto de corte del fabricante, la sensibilidad fue baja; 14,8% en general, 23% en el grupo de alto riesgo y 7,1% en el de bajo riesgo. Resultados muy similares han sido publicados previamente¹⁶⁴. Al reducir el

punto de corte a 5 µg/L, la sensibilidad mejoró; 33% en general, 46% en el grupo de alto riesgo y 21,4% en el de bajo riesgo. No hay estudios previos que utilicen este punto de corte. Esto probablemente se debe a que pocos estudios previos han utilizado el lector fotométrico^{160-162,164}. Tan solo un reporte utilizó un punto de corte inferior, 1 µg/L, obteniendo 64% de sensibilidad general¹⁴⁸.

En el grupo de diagnóstico inicial, UBC Rapid® demostró un mejor rendimiento, probablemente debido al mayor tamaño tumoral en este grupo (media de 20 mm). Estudios previos han relacionado los valores de UBC Rapid® con el tamaño tumoral, estadio y grado^{83,107,160,161,168,176}. Ninguno ha realizado un análisis multivariante para descartar factores de confusión. En nuestro análisis, la única variable predictora independiente del UBC Rapid® fue el tamaño tumoral. Como el tamaño tumoral está relacionado al estadio y el grado, el valor de UBC Rapid® probablemente sólo describa el tamaño tumoral⁵. De acuerdo con nuestros resultados, el UBC Rapid® probablemente detecte mejor un tumor voluminoso de bajo riesgo que uno pequeño de alto riesgo. Estos resultados podrían explicar el pobre rendimiento de UBC Rapid® en la cohorte de vigilancia; en este grupo el tamaño medio del tumor diagnosticado fue 5 mm.

Al establecer el punto de corte en 5 µg/L, con el objetivo de potenciar la detección, en el grupo de vigilancia se obtuvieron VPN muy altos. Asumiendo

este punto de corte, si no realizamos la cistoscopia en cada paciente “negativo”, se podrían haber ahorrado 184 cistoscopias (67% del total de sujetos en vigilancia), sin embargo, se habrían perdido 7 de los 13 tumores de alto riesgo. Si se añade la citología urinaria se habrían evitado 174 cistoscopias (63,3% del total de sujetos en vigilancia) pero aún se habrían dejado de diagnosticar 5 de los 13 tumores de alto riesgo.

El diagnóstico anticipado se ha evaluado en ensayos celulares y genéticos. Algunos estudios han demostrado que las mutaciones y metilaciones no dan una idea clara de cuándo aparecerá la recidiva y que en algunos casos, metilaciones y mutaciones no implican recidiva tumoral⁸⁸. Los estudios analizados reportan tasas de diagnósticos anticipados de hasta 85%⁹⁶. Estos resultados deben ponderarse porque, en algunos estudios, las recidivas se describieron a los 24 meses, lo que muy probablemente no tenga relación con la alteración genética que demuestra el ensayo, si no con la historia natural de la enfermedad. En nuestra cohorte, 13 de los 81 sujetos con UBC Rapid[®] superior a 5 µg/L y sin hallazgos en la cistoscopia, desarrollaron algún tipo de TV en el tiempo de observación (media de 24 meses). Limitando estos hallazgos al primer año posterior al ensayo (según lo recomiendan las guías europeas y americanas), tan solo se incluirían 8 casos. Esto significaría que el 10% (8 de 81) de los “falsos positivos” realmente corresponden a un diagnóstico anticipado. Estudios recientes establecen esta tasa en 75% para la citología urinaria y 40% para ensayos celulares¹⁶⁹.

- Limitaciones del estudio: Encontramos algunas limitaciones en nuestra investigación. La revisión bibliográfica se centró en los últimos 10 años. Las publicaciones en el campo del diagnóstico no invasivo del TVNMI son muy numerosas, con muchos tipos de marcadores, técnicas de ensayos y metodologías. Probablemente realizar el análisis de tanta literatura solo sea posible dividiéndola en parcelas abarcables. A pesar de esto el factor que más limita nuestra revisión es la metodología empleada en los estudios revisados; pocos tienen un diseño adecuado. Por otra parte, nuestro estudio original fue realizado en un solo centro y no logramos alcanzar la muestra estimada. A pesar de todo esto, nuestros resultados son muy relevantes; la población incluida era real y el marco de nuestro estudio fue el de la práctica clínica habitual.

- Nuevas líneas de investigación: La vigilancia del TVNMI tiene mucho por mejorar. Para poder hacerlo, los marcadores a estudiar deben realizarse en el contexto de estudios que planteen una alternativa a la vigilancia convencional. La determinación de una proteína o una mutación única parece ser una opción poco válida. Creemos que la vía debería ser mediante ensayos genéticos, mediante la determinación simultánea de un panel de mutaciones o metilaciones. De esta manera y utilizando una metodología aplicable a la práctica clínica, se podría utilizar un panel de metilaciones / mutaciones para reducir el número de cistoscopias mediante la selección de pacientes de muy bajo riesgo, sujetos que se podrían ahorrar la cistoscopia.

CONCLUSIONES

1. Se han estudiado gran cantidad de marcadores urinarios con el objetivo de mejorar la vigilancia de los TVNMI. Fundamentalmente se han utilizado: ensayos de transcripción, de proteínas y de base celular. Algunos han evidenciado una buena precisión diagnóstica; sin embargo, muy pocos han demostrado mejorar el protocolo habitual de vigilancia del TVNMI.

2. Ensayos basados en la detección de metilaciones de ADN y ensayos proteicos con NMP22 y citoqueratinas parecen eficaces en la reducción del número de cistoscopias durante la vigilancia del TVNMI.

3. UBC Rapid® es un ensayo, basado en la cuantificación de las citoqueratinas 8 y 18, que ha demostrado su validez en el diagnóstico del TV, se puede realizar en el punto de control y permite obtener resultados cuantitativos. Otros ensayos, basados en la determinación cualitativa de las mismas citoqueratinas, han demostrado previamente su potencial durante la vigilancia de los TVNMI; sin embargo, no se ha determinado eficacia para reducir el número de cistoscopias.

4. Nuestros resultados nos indican que si realizáramos cistoscopias sólo a los pacientes con UBC Rapid® positivo, reduciríamos un 67% el número global de cistoscopias durante la vigilancia del TVNMI, pero dejando de diagnosticar hasta el 50% de las recidivas de alto riesgo.

5. El rendimiento diagnóstico del UBC Rapid® en la vigilancia del TVNMI es subóptimo ya que tuvo una sensibilidad global del 33% y del 46% en el grupo pacientes con recidiva tumoral de alto riesgo.

6. En el diagnóstico inicial del TV, UBC Rapid® tuvo una sensibilidad global de 86% y del 91% en los TVNMI de alto riesgo.
7. Los niveles urinarios de UBC Rapid® parecen asociarse al tamaño tumoral. En cambio, no se evidenció una asociación con el estadio ni grado tumoral. Esto explicaría el mejor rendimiento observado en el grupo de pacientes con TV inicial, cuyo tamaño es muy superior (20 mm) al de las recidivas tumorales del TVNMI (5 mm).
8. El UBC Rapid® no fue eficaz para anticipar el diagnóstico durante la vigilancia del TVNMI. Tan solo el 10% de los “falsos positivos” desarrollaron una recidiva tumoral en el primer año de seguimiento. Este porcentaje podría atribuirse a la tasa habitual de recidiva de los TVNMI, lo que implicaría que su positividad no sería un diagnóstico anticipado.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-386, doi: 10.1002/ijc.29210.
2. Miñana B., Cózar JM., Palou J., Unda Urzaiz M., Medina-Lopez RA., Subirá Ríos J., et al. Bladder cancer in Spain 2011: population based study. *J Urol*. 2014;191(2):323-8, doi: 10.1016/j.juro.2013.08.049.
3. Freedman ND. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA*. 2011;306(7):737, doi: 10.1001/jama.2011.1142.
4. Brennan P., Bogillot O., Cordier S., Greiser E., Schill W., Vineis P., et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. 2000;86(2):289-94, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<289::aid-ijc21>3.0.co;2-m.
5. Babjuk M., Böhle A., Burger M., Capoun O., Cohen D., Compérat EM., et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2017;71(3):447-61, doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.041.
6. Pashos CL., Botteman MF., Laskin BL., Redaelli A. Bladder Cancer. *Epidemiology, Diagnosis, and Management. Cancer Pract*. 2002;10(6):311-22, doi: 10.1046/j.1523-5394.2002.106011.x.

7. Weistenhöfer W., Blaszkewicz M., Bolt HM., Golka K. *N*-Acetyltransferase-2 and Medical History in Bladder Cancer Cases with a Suspected Occupational Disease (BK 1301) in Germany. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(13-14):906-10, doi: 10.1080/15287390801988681.
8. Chrouser K., Leibovich B., Bergstralh E., Zincke H., Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol*. 2005;174(1):107-10, doi: 10.1097/01.ju.0000163459.57305.a1.
9. Zamora-Ros R., Sacerdote C., Ricceri F., Weiderpass E., Roswall N., Buckland G., et al. Flavonoid and lignan intake in relation to bladder cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Cancer*. 2014;111(9):1870-80, doi: 10.1038/bjc.2014.459.
10. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1994;61:1-241.
11. Salem HK., Mahfouz S. Changing Patterns (Age, Incidence, and Pathologic Types) of *Schistosoma*-associated Bladder Cancer in Egypt in the Past Decade. *Urology*. 2012;79(2):379-83, doi: 10.1016/j.urology.2011.08.072.

12. Pelucchi C., Bosetti C., Negri E., Malvezzi M., La Vecchia C. Mechanisms of Disease: the epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2006;3(6):327-40, doi: 10.1038/ncpuro0510.
13. Liu S., Yang T., Na R., Hu M., Zhang L., Fu Y., et al. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol*. 2015;47(6):951-8, doi: 10.1007/s11255-015-0980-6.
14. Waldhoer T., Berger I., Haidinger G., Zielonke N., Madersbacher S. Sex Differences of \geq pT1 Bladder Cancer Survival in Austria: A Descriptive, Long-Term, Nation-Wide Analysis Based on 27,773 Patients. *Urol Int*. 2015;94(4):383-9, doi: 10.1159/000368418.
15. Patafio FM., Siemens DR., Wei X., Booth CM. Is there a gender effect in bladder cancer? A population-based study of practice and outcomes. *Can Urol Assoc J*. 2015;9(7-8):269, doi: 10.5489/cuaj.2927.
16. Cohn JA., Vekhter B., Lyttle C., Steinberg GD., Large MC. Sex disparities in diagnosis of bladder cancer after initial presentation with hematuria: A nationwide claims-based investigation: Delay in Bladder Cancer Diagnosis. *Cancer*. 2014;120(4):555-61, doi: 10.1002/cncr.28416.
17. Martin C., Leiser CL., O'Neil B., Gupta S., Lowrance WT., Kohlmann W., et al. Familial Cancer Clustering in Urothelial Cancer: A Population-Based Case–Control Study. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2018;110(5):527-33, doi: 10.1093/jnci/djx237.

18. Figueroa JD., Ye Y., Siddiq A., Garcia-Closas M., Chatterjee N., Prokunina-Olsson L., et al. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2014;23(5):1387-98, doi: 10.1093/hmg/ddt519.
19. Choi W., Porten S., Kim S., Willis D., Plimack ER., Hoffman-Censits J., et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell.* 2014;25(2):152-65, doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.009.
20. Brierley J., Gospodarowicz MK., Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
21. Babjuk M., Burger M., Zigeuner R., Shariat SF., van Rhijn BWG., Compérat E., et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2013;64(4):639-53, doi: 10.1016/j.eururo.2013.06.003.
22. Sylvester RJ., van der Meijden APM., Oosterlinck W., Witjes JA., Bouffouix C., Denis L., et al. 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.* 2006;49(3):466-465; discussion 475-477, doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.031.

23. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am.* 1992;19(3):499-508.
24. Humphrey PA., Moch H., Cubilla AL., Ulbright TM., Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):106-19, doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028.
25. Trinh TW., Glazer DI., Sadow CA., Sahni VA., Geller NL., Silverman SG. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol.* 2018;43(3):663-71, doi: 10.1007/s00261-017-1249-6.
26. Palou J., Rodríguez-Rubio F., Huguet J., Segarra J., Ribal MJ., Alcaraz A., et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor. *J Urol.* 2005;174(3):859-61, doi: 10.1097/01.ju.0000169424.79702.6d.
27. Hilton S., Jones LP. Recent Advances in Imaging Cancer of the Kidney and Urinary Tract. *Surg Oncol Clin N Am.* 2014;23(4):863-910, doi: 10.1016/j.soc.2014.06.001.
28. Panebianco V., Narumi Y., Altun E., Bochner BH., Efstathiou JA., Hafeez S., et al. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System). *Eur Urol.* 2018;74(3):294-306, doi: 10.1016/j.eururo.2018.04.029.

29. Yafi FA., Brimo F., Steinberg J., Aprikian AG., Tanguay S., Kassouf W.
Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol.* 2015;33(2):66.e25-31, doi: 10.1016/j.urolonc.2014.06.008.
30. Raitanen M-P., Aine R., Rintala E., Kallio J., Rajala P., Juusela H., et al.
Differences Between Local and Review Urinary Cytology in Diagnosis of Bladder Cancer. An Interobserver Multicenter Analysis. *Eur Urol.* 2002;41(3):284-9, doi: 10.1016/S0302-2838(02)00006-4.
31. Krajewski W., Kościelska-Kasprzak K., Rymaszewska J., Zdrojowy R. How different cystoscopy methods influence patient sexual satisfaction, anxiety, and depression levels: a randomized prospective trial. *Qual Life Res.* 2017;26(3):625-34, doi: 10.1007/s11136-016-1493-1.
32. Kausch I., Sommerauer M., Montorsi F., Stenzl A., Jacqmin D., Jichlinski P., et al. Photodynamic Diagnosis in Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Cumulative Analysis of Prospective Studies. *Eur Urol.* 2010;57(4):595-606, doi: 10.1016/j.eururo.2009.11.041.
33. Chou R., Selph S., Buckley DI., Fu R., Griffin JC., Grusing S., et al.
Comparative Effectiveness of Fluorescent Versus White Light Cystoscopy for Initial Diagnosis or Surveillance of Bladder Cancer on Clinical Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol.* 2017;197(3 Part 1):548-58, doi: 10.1016/j.juro.2016.10.061.

34. Ye Z., Hu J., Song X., Li F., Zhao X., Chen S., et al. A comparison of NBI and WLI cystoscopy in detecting non-muscle-invasive bladder cancer: A prospective, randomized and multi-center study. *Sci Rep.* 2015;5(1):10905, doi: 10.1038/srep10905.
35. Drejer D., Béji S., Munk Nielsen A., Høyer S., Wrist Lam G., Jensen JB. Clinical relevance of narrow-band imaging in flexible cystoscopy: the DaBlaCa-7 study. *Scand J Urol.* 2017;51(2):120-3, doi: 10.1080/21681805.2017.1295101.
36. Zheng C., Lv Y., Zhong Q., Wang R., Jiang Q. Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer: systematic review and meta-analysis: Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110(11b):E680-7, doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11500.x.
37. Fernandez-Gomez J., Madero R., Solsona E., Unda M., Martinez-Piñeiro L., Gonzalez M., et al. Predicting Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Recurrence and Progression in Patients Treated with Bacillus Calmette-Guérin: The CUETO Scoring Model. *J Urol.* 2009;182(5):2195-203, doi: 10.1016/j.juro.2009.07.016.
38. Anderson C., Weber R., Patel D., Lowrance W., Mellis A., Cookson M., et al. A 10-Item Checklist Improves Reporting of Critical Procedural Elements during Transurethral Resection of Bladder Tumor. *J Urol.* 2016;196(4):1014-20, doi: 10.1016/j.juro.2016.03.151.

39. Richterstetter M., Wullich B., Amann K., Haeberle L., Engehausen DG., Goebell PJ., et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer: value of extended TURBT for treating bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110(2b):E76-9, doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10904.x.
40. Kramer MW., Rassweiler JJ., Klein J., Martov A., Baykov N., Lusuardi L., et al. En bloc resection of urothelium carcinoma of the bladder (EBRUC): a European multicenter study to compare safety, efficacy, and outcome of laser and electrical en bloc transurethral resection of bladder tumor. *World J Urol.* 2015;33(12):1937-43, doi: 10.1007/s00345-015-1568-6.
41. Migliari R., Buffardi A., Ghabin H. Thulium Laser Endoscopic En Bloc Enucleation of Nonmuscle-Invasive Bladder Cancer. *J Endourol.* 2015;29(11):1258-62, doi: 10.1089/end.2015.0336.
42. Zhang X-R., Feng C., Zhu W-D., Si J-M., Gu B-J., Guo H., et al. Two Micrometer Continuous-Wave Thulium Laser Treating Primary Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Is It Feasible? A Randomized Prospective Study. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(10):517-23, doi: 10.1089/pho.2015.3913.
43. Mariappan P., Zachou A., Grigor KM. Detrusor Muscle in the First, Apparently Complete Transurethral Resection of Bladder Tumour Specimen Is a Surrogate Marker of Resection Quality, Predicts Risk of

- Early Recurrence, and Is Dependent on Operator Experience. *Eur Urol.* 2010;57(5):843-9, doi: 10.1016/j.eururo.2009.05.047.
44. van der Meijden A., Oosterlinck W., Brausi M., Kurth K-H., Sylvester R., deBalincoourt C., et al. Significance of Bladder Biopsies in Ta,T1 Bladder Tumors: A Report from the EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group. *Eur Urol.* 1999;35(4):267-71, doi: 10.1159/000019859.
45. Hara T., Takahashi M., Gondo T., Nagao K., Ohmi C., Sakano S., et al. Risk of concomitant carcinoma in situ determining biopsy candidates among primary non-muscle-invasive bladder cancer patients: Retrospective analysis of 173 Japanese cases: Risk of CIS in bladder cancer patients. *Int J Urol.* 2009;16(3):293-8, doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02241.x.
46. Palou J., Sylvester RJ., Faba OR., Parada R., Peña JA., Algaba F., et al. Female Gender and Carcinoma In Situ in the Prostatic Urethra Are Prognostic Factors for Recurrence, Progression, and Disease-Specific Mortality in T1G3 Bladder Cancer Patients Treated With Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2012;62(1):118-25, doi: 10.1016/j.eururo.2011.10.029.
47. Mungan M., Canda A., Tuzel E., Yorukoglu K., Kirkali Z. Risk Factors for Mucosal Prostatic Urethral Involvement in Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol.* 2005;48(5):760-3, doi: 10.1016/j.eururo.2005.05.021.

48. Brausi M., Collette L., Kurth K., van der Meijden AP., Oosterlinck W., Witjes JA., et al. Variability in the Recurrence Rate at First Follow-up Cystoscopy after TUR in Stage Ta T1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: A Combined Analysis of Seven EORTC Studies. *Eur Urol.* 2002;41(5):523-31, doi: 10.1016/S0302-2838(02)00068-4.
49. Cumberbatch MGK., Foerster B., Catto JWF., Kamat AM., Kassouf W., Jubber I., et al. Repeat Transurethral Resection in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2018;73(6):925-33, doi: 10.1016/j.eururo.2018.02.014.
50. Bishr M., Lattouf J-B., Latour M., Saad F. Tumour stage on re-staging transurethral resection predicts recurrence and progression-free survival of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Can Urol Assoc J.* 2014;8(5-6):306, doi: 10.5489/cuaj.1514.
51. Palou J., Pisano F., Sylvester R., Joniau S., Serretta V., Larré S., et al. Recurrence, progression and cancer-specific mortality according to stage at re-TUR in T1G3 bladder cancer patients treated with BCG: not as bad as previously thought. *World J Urol.* 2018;36(10):1621-7, doi: 10.1007/s00345-018-2299-2.
52. Grimm M-O., Steinhoff C., Simon X., Spiegelhalder P., Ackermann R., Vögeli TA. Effect of Routine Repeat Transurethral Resection for Superficial Bladder Cancer: A Long-term Observational Study. *J Urol.* 2003;170(2):433-7, doi: 10.1097/01.ju.0000070437.14275.e0.

-
53. Baltacı S., Bozlu M., Yıldırım A., Gökçe Mİ., Tinay İ., Aslan G., et al. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 2015;116(5):721-6, doi: 10.1111/bju.13102.
54. Pan JS., Slocum HK., Rustum YM., Greco WR., Gaeta JF., Huben RP. Inhibition of Implantation of Murine Bladder Tumor by Thiotepa in Cauterized Bladder. *J Urol.* 1989;142(6):1589-93, doi: 10.1016/S0022-5347(17)39174-7.
55. Brocks CP., Büttner H., Böhle A. Inhibition of tumor implantation by intravesical gemcitabine in a murine model of superficial bladder cancer. *J Urol.* 2005;174(3):1115-8, doi: 10.1097/01.ju.0000168657.51551.49.
56. Sylvester RJ., Oosterlinck W., Holmang S., Sydes MR., Birtle A., Gudjonsson S., et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa–pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol.* 2016;69(2):231-44, doi: 10.1016/j.eururo.2015.05.050.
57. Oddens JR., van der Meijden APM., Sylvester R. One Immediate Postoperative Instillation of Chemotherapy in Low Risk Ta, T1 Bladder

-
- Cancer Patients. Is it Always Safe? *Eur Urol.* 2004;46(3):336-8, doi: 10.1016/j.eururo.2004.05.003.
58. Huncharek M., McGarry R., Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res.* 2001;21(1B):765-9.
59. Böhle A., Bock PR. Intravesical bacille calmette-guérin versus mitomycin c in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology.* 2004;63(4):682-6, doi: 10.1016/j.urology.2003.11.049.
60. Bosschieter J., Nieuwenhuijzen JA., van Ginkel T., Vis AN., Witte B., Newling D., et al. Value of an Immediate Intravesical Instillation of Mitomycin C in Patients with Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Prospective Multicentre Randomised Study in 2243 patients. *Eur Urol.* 2018;73(2):226-32, doi: 10.1016/j.eururo.2017.06.038.
61. Arends TJH., Nativ O., Maffezzini M., de Cobelli O., Canepa G., Verweij F., et al. Results of a Randomised Controlled Trial Comparing Intravesical Chemohyperthermia with Mitomycin C Versus Bacillus Calmette-Guérin for Adjuvant Treatment of Patients with Intermediate- and High-risk Non-Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2016;69(6):1046-52, doi: 10.1016/j.eururo.2016.01.006.

62. Di Stasi SM., Giannantoni A., Giurioli A., Valenti M., Zampa G., Storti L., et al. Sequential BCG and electromotive mitomycin versus BCG alone for high-risk superficial bladder cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(1):43-51, doi: 10.1016/S1470-2045(05)70472-1.
63. Han RF., Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology.* 2006;67(6):1216-23, doi: 10.1016/j.urology.2005.12.014.
64. Shelley MD., Wilt TJ., Court J., Coles B., Kynaston H., Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int.* 2004;93(4):485-90, doi: 10.1111/j.1464-410X.2003.04655.x.
65. Malmström P-U., Sylvester RJ., Crawford DE., Friedrich M., Krege S., Rintala E., et al. An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2009;56(2):247-56, doi: 10.1016/j.eururo.2009.04.038.
66. Böhle A., Jocham D., Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-

- analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*. 2003;169(1):90-5, doi: 10.1097/01.ju.0000039680.90768.b3.
67. Shelley MD., Kynaston H., Court J., Wilt TJ., Coles B., Burgon K., et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer: intravesical BCG plus TUR vs TUR alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int*. 2001;88(3):209-16, doi: 10.1046/j.1464-410x.2001.02306.x.
68. Sylvester RJ., van der Meijden MR., Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guérin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2002;168(5):1964-70, doi: 10.1097/01.ju.0000034450.80198.1c.
69. van der Meijden APM., Sylvester RJ., Oosterlinck W., Hoeltl W., Bono AV. Maintenance Bacillus Calmette-Guérin for Ta T1 Bladder Tumors Is Not Associated with Increased Toxicity: Results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol*. 2003;44(4):429-34, doi: 10.1016/S0302-2838(03)00357-9.
70. Morales A., Eidinger D., Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *J Urol*. 1976;116(2):180-2, doi: 10.1016/S0022-5347(17)58737-6.

71. Martínez-Piñeiro L., Portillo JA., Fernández JM., Zabala JA., Cadierno I., Moyano JL., et al. Maintenance Therapy with 3-monthly Bacillus Calmette-Guérin for 3 Years is Not Superior to Standard Induction Therapy in High-risk Non–muscle-invasive Urothelial Bladder Carcinoma: Final Results of Randomised CUETO Study 98013. *Eur Urol.* 2015;68(2):256-62, doi: 10.1016/j.eururo.2015.02.040.
72. Gofrit ON., Pode D., Lazar A., Katz R., Shapiro A. Watchful Waiting Policy in Recurrent Ta G1 Bladder Tumors. *Eur Urol.* 2006;49(2):303-7, doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.029.
73. Soukup V., Babjuk M., Bellmunt J., Dalbagni G., Giannarini G., Hakenberg OW., et al. Follow-up After Surgical Treatment of Bladder Cancer: A Critical Analysis of the Literature. *Eur Urol.* 2012;62(2):290-302, doi: 10.1016/j.eururo.2012.05.008.
74. Schmitz-Dräger BJ., Droller M., Lokeshwar VB., Lotan Y., Hudson MA., van Rhijn BW., et al. Molecular Markers for Bladder Cancer Screening, Early Diagnosis, and Surveillance: The WHO/ICUD Consensus. *Urol Int.* 2015;94(1):1-24, doi: 10.1159/000369357.
75. Roobol MJ., Bangma CH., el Bouazzaoui S., Franken-Raab CG., Zwarthoff EC. Feasibility study of screening for bladder cancer with urinary molecular markers (the BLU-P project). *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2010;28(6):686-90, doi: 10.1016/j.urolonc.2009.12.002.

-
76. Starke N., Singla N., Haddad A., Lotan Y. Long-term outcomes in a high-risk bladder cancer screening cohort. *BJU Int.* 2016;117(4):611-7, doi: 10.1111/bju.13154.
 77. Eissa S., Swellam M., Amin A., Balbaa ME., Yacout GA., El-Zayat TM. The clinical relevance of urine-based markers for diagnosis of bladder cancer. *Med Oncol.* 2011;28(2):513-8, doi: 10.1007/s12032-010-9422-6.
 78. Sapre N., Macintyre G., Clarkson M., Naeem H., Cmero M., Kowalczyk A., et al. A urinary microRNA signature can predict the presence of bladder urothelial carcinoma in patients undergoing surveillance. *Br J Cancer.* 2016;114(4):454-62, doi: 10.1038/bjc.2015.472.
 79. Kandimalla R., Masius R., Beukers W., Bangma CH., Orntoft TF., Dyrskjot L., et al. A 3-Plex Methylation Assay Combined with the FGFR3 Mutation Assay Sensitive Detects Recurrent Bladder Cancer in Voided Urine. *Clin Cancer Res.* 2013;19(17):4760-9, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3276.
 80. Critelli R., Fasanelli F., Oderda M., Polidoro S., Assumma MB., Viberti C., et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up. *Oncotarget.* 2016;7(41), doi: 10.18632/oncotarget.11883.
 81. Kavalieris L., O'Sullivan P., Frampton C., Guilford P., Darling D., Jacobson E., et al. Performance Characteristics of a Multigene Urine Biomarker Test for Monitoring for Recurrent Urothelial Carcinoma in a Multicenter Study. *J Urol.* 2017;197(6):1419-26, doi: 10.1016/j.juro.2016.12.010.

82. Lotan Y., O'Sullivan P., Raman JD., Shariat SF., Kavalieris L., Frampton C., et al. Clinical comparison of noninvasive urine tests for ruling out recurrent urothelial carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2017;35(8):531.e15-531.e22, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.03.008.
83. Pichler R., Fritz J., Tulchiner G., Klinglmair G., Soleiman A., Horninger W., et al. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int.* 2018;121(1):29-37, doi: 10.1111/bju.14019.
84. van Rhijn BWG., van der Poel HG., van der Kwast TH. Urine Markers for Bladder Cancer Surveillance: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2005;47(6):736-48, doi: 10.1016/j.eururo.2005.03.014.
85. van der Aa MNM., Zwarthoff EC., Steyerberg EW., Boogaard MW., Nijssen Y., van der Keur KA., et al. Microsatellite Analysis of Voided-Urine Samples for Surveillance of Low-Grade Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma: Feasibility and Clinical Utility in a Prospective Multicenter Study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer Trial [CEFUB]). *Eur Urol.* 2009;55(3):659-68, doi: 10.1016/j.eururo.2008.05.001.
86. Couffignal C., Desgrandchamps F., Mongiat-Artus P., Ravery V., Ouzaid I., Roupret M., et al. The Diagnostic and Prognostic Performance of Urinary FGFR3 Mutation Analysis in Bladder Cancer Surveillance: A Prospective Multicenter Study. *Urology.* 2015;86(6):1185-91, doi: 10.1016/j.urology.2015.07.036.

87. Feber A., Dhami P., Dong L., de Winter P., Tan WS., Martínez-Fernández M., et al. UroMark—a urinary biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1), doi: 10.1186/s13148-016-0303-5.
88. Reinert T., Borre M., Christiansen A., Hermann GG., Ørntoft TF., Dyrskjøt L. Diagnosis of Bladder Cancer Recurrence Based on Urinary Levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 Hypermethylation. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e46297, doi: 10.1371/journal.pone.0046297.
89. Roperch J-P., Grandchamp B., Desgrandchamps F., Mongiat-Artus P., Ravery V., Ouzaid I., et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer*. 2016;16(1), doi: 10.1186/s12885-016-2748-5.
90. Zuiverloon TCM., Beukers W., van der Keur KA., Munoz JR., Bangma CH., Lingsma HF., et al. A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine: methylation assay for detecting NMIBC recurrences in voided urine. *BJU Int*. 2012;109(6):941-8, doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10428.x.
91. Su S-F., de Castro Abreu AL., Chihara Y., Tsai Y., Andreu-Vieyra C., Daneshmand S., et al. A Panel of Three Markers Hyper- and Hypomethylated in Urine Sediments Accurately Predicts Bladder Cancer

- Recurrence. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1978-89, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2637.
92. van der Heijden AG., Mengual L., Ingelmo-Torres M., Lozano JJ., van Rijt-van de Westerlo CCM., Baixauli M., et al. Urine cell-based DNA methylation classifier for monitoring bladder cancer. *Clin Epigenetics.* 2018;10(1), doi: 10.1186/s13148-018-0496-x.
93. Witjes JA., Morote J., Cornel EB., Gakis G., van Valenberg FJP., Lozano F., et al. Performance of the Bladder EpiCheck™ Methylation Test for Patients Under Surveillance for Non–muscle-invasive Bladder Cancer: Results of a Multicenter, Prospective, Blinded Clinical Trial. *Eur Urol Oncol.* 2018;1(4):307-13, doi: 10.1016/j.euo.2018.06.011.
94. Allory Y., Beukers W., Sagraera A., Flández M., Marqués M., Márquez M., et al. Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Bladder Cancer: High Frequency Across Stages, Detection in Urine, and Lack of Association with Outcome. *Eur Urol.* 2014;65(2):360-6, doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.052.
95. Zuiverloon TCM., van der Aa MNM., van der Kwast TH., Steyerberg EW., Lingsma HF., Bangma CH., et al. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutation Analysis on Voided Urine for Surveillance of Patients with Low-Grade Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):3011-8, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3013.

-
96. Zuiverloon TCM., Beukers W., van der Keur KA., Nieuweboer AJM., Reinert T., Dyrskjot L., et al. Combinations of Urinary Biomarkers for Surveillance of Patients with Incident Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: The European FP7 UROMOL Project. *J Urol.* 2013;189(5):1945-51, doi: 10.1016/j.juro.2012.11.115.
 97. Todenhöfer T., Hennenlotter J., Esser M., Mohrhardt S., Aufderklamm S., Böttge J., et al. Stepwise Application of Urine Markers to Detect Tumor Recurrence in Patients Undergoing Surveillance for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Dis Markers.* 2014;2014:1-7, doi: 10.1155/2014/973406.
 98. Odisho AY., Berry AB., Ahmad AE., Cooperberg MR., Carroll PR., Konety BR. Reflex ImmunoCyt Testing for the Diagnosis of Bladder Cancer in Patients with Atypical Urine Cytology. *Eur Urol.* 2013;63(5):936-40, doi: 10.1016/j.eururo.2012.04.019.
 99. D'Costa JJ., Goldsmith JC., Wilson JS., Bryan RT., Ward DG. A Systematic Review of the Diagnostic and Prognostic Value of Urinary Protein Biomarkers in Urothelial Bladder Cancer. *Bladder Cancer.* 2016;2(3):301-17, doi: 10.3233/BLC-160054.
 100. Akiyama SK., Yamada KM., Hayashi M. The structure of fibronectin and its role in cellular adhesion. *J Supramol Struct Cell Biochem.* 1981;16(4):345-8, doi: 10.1002/jsscb.1981.380160405.

-
101. Parsons RG., Todd HD., Kowal R. Isolation and identification of a human serum fibronectin-like protein elevated during malignant disease. *Cancer Res.* 1979;39(11):4341-5.
102. Sánchez-Carbayo M., Urrutia M., de Buitrago JMG., Navajo JA. Evaluation of two new urinary tumor markers: bladder tumor fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(9):3585–3594.
103. Eissa S., Swellam M., Sadek M., Sherif Mourad M., Ahmady OEL., Khalifa A. Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibronectin, urinary bladder cancer antigen and voided urine cytology in the detection of bladder tumors. *J Urol.* 2002;168(2):465–469.
104. Mutlu N., Turkeri L., Emerk K. Analytical and clinical evaluation of a new urinary tumor marker: bladder tumor fibronectin in diagnosis and follow-up of bladder cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(8):1069–1074.
105. Menéndez V., Fernández-Suárez A., Galán JA., Pérez M., García-López F. Diagnosis of bladder cancer by analysis of urinary fibronectin. *Urology.* 2005;65(2):284-9, doi: 10.1016/j.urology.2004.09.028.
106. Li L-Y., Yang M., Zhang H-B., Su X-K., Xu W-F., Chen Y., et al. Urinary fibronectin as a predictor of a residual tumour load after transurethral resection of bladder transitional cell carcinoma. *BJU Int.* 2008;102(5):566-71, doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07637.x.

107. Sanchez-Carbayo M., Urrutia M., Silva JM., Romani R., de Buitrago JG., Navajo JA. Comparative predictive values of urinary cytology, urinary bladder cancer antigen, CYFRA 21-1 and NMP22 for evaluating symptomatic patients at risk for bladder cancer. *J Urol.* 2001;165(5):1462–1467.
108. Eissa S., Swellam M., Sadek M., Sherif Mourad M., Ahmady OEL., Khalifa A. Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibronectin, urinary bladder cancer antigen and voided urine cytology in the detection of bladder tumors. *J Urol.* 2002;168(2):465–469.
109. Sanchez-Carbayo M., Urrutia M., Hernandez-Cerceno ML., González et BJ., Navajo JA. [Cytokeratins (UBC and CYFRA 21-1) and nuclear matrix proteins (NMP22) as urine tumor markers in the diagnosis of bladder cancer]. *Med Clínica.* 2000;114(10):361–366.
110. Pariente JL., Bordenave L., Jacob F., Gobinet A., Leger F., Ferriere JM., et al. Analytical and prospective evaluation of urinary cytokeratin 19 fragment in bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(4):1116–1119.
111. Nisman B., Barak V., Shapiro A., Golijanin D., Peretz T., Pode D. Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma. *Cancer.* 2002;94(11):2914-22, doi: 10.1002/cncr.10565.
112. Nisman B., Yutkin V., Peretz T., Shapiro A., Barak V., Pode D. The follow-up of patients with non-muscle-invasive bladder cancer by urine

- cytology, abdominal ultrasound and urine CYFRA 21-1: a pilot study. *Anticancer Res.* 2009;29(10):4281–4285.
113. Morsi MI., Youssef AI., Hassouna ME., El-Sedafi AS., Ghazal AA., Zaher ER. Telomerase activity, cytokeratin 20 and cytokeratin 19 in urine cells of bladder cancer patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006;18(1):82–93.
114. Fernandez-Gomez J., Rodríguez-Martínez JJ., Barmadah SE., García Rodríguez J., Allende DraM., Jalon A., et al. Urinary CYFRA 21.1 Is Not a Useful Marker for the Detection of Recurrences in the Follow-Up of Superficial Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2007;51(5):1267-74, doi: 10.1016/j.eururo.2006.12.019.
115. Satyam A., Singh P., Sharma M., Seth A., Sharma A. CYFRA 21-1: A potential molecular marker for noninvasive differential diagnosis of urothelial carcinoma of bladder. *Biomarkers.* 2011;16(5):413-21, doi: 10.3109/1354750X.2011.582152.
116. Nelson AR., Fingleton B., Rothenberg ML., Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2000;18(5):1135-49.
117. Sounni NE., Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie.* 2005;87(3-4):329-42, doi: 10.1016/j.biochi.2004.07.012.
118. Sier CF., Casetta G., Verheijen JH., Tizzani A., Agape V., Kos J., et al. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and

- 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2333–2340.
119. Gerhards S., Jung K., Koenig F., Daniltchenko D., Hauptmann S., Schnorr D., et al. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology.* 2001;57(4):675–679.
120. Di Carlo A., Terracciano D., Mariano A., Macchia V. Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep.* 2006;15(5):1321–1326.
121. Eissa S., Ali-Labib R., Swellam M., Bassiony M., Tash F., El-Zayat TM. Noninvasive Diagnosis of Bladder Cancer by Detection of Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and Their Inhibitor (TIMP-2) in Urine. *Eur Urol.* 2007;52(5):1388-97, doi: 10.1016/j.eururo.2007.04.006.
122. Mohammed MA., Seleim MF., Abdalla MS., Sharada HM., Wahab AHAA. Urinary high molecular weight matrix metalloproteinases as non-invasive biomarker for detection of bladder cancer. *BMC Urol.* 2013;13(1):1.
123. El-Sharkawi F., El Sabah M., Hassan Z., Khaled H. The biochemical value of urinary metalloproteinases 3 and 9 in diagnosis and prognosis of bladder cancer in Egypt. *J Biomed Sci.* 2014;21(1):1.
124. Konety BR., Nguyen T-ST., Dhir R., Day RS., Becich MJ., Stadler WM., et al. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res.* 2000;6(7):2618–2625.

125. Mowatt G., Zhu S., Kilonzo M., Boachie C., Fraser C., Griffiths T., et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess.* 2010;14(4), doi: 10.3310/hta14040.
126. Hatzichristodoulou G., Kuebler H., Schwaibold H., Wagenpfeil S., Eibauer C., Hofer C., et al. Nuclear Matrix Protein 22 for Bladder Cancer Detection: Comparative Analysis of the BladderChek® and ELISA. *Anticancer Res.* 2012;32(11):5093–5097.
127. Hwang EC., Choi HS., Jung SI., Kwon DD., Park K., Ryu SB. Use of the NMP22 BladderChek Test in the Diagnosis and Follow-Up of Urothelial Cancer: A Cross-sectional Study. *Urology.* 2011;77(1):154-9, doi: 10.1016/j.urology.2010.04.059.
128. Dogan C., Pelit ES., Yildirim A., Ebru Zemheri I., Canakci C., Kaan Başok E., et al. The value of the NMP22 test for superficial bladder cancer diagnosis and follow-up. *Türk Ürol Dergisi/Turkish J Urol.* 2014;39(3):137-42, doi: 10.5152/tud.2013.029.
129. Choi HS., Lee SI., Kim DJ., Jeong TY. Usefulness of the NMP22BladderChek Test for Screening and Follow-up of Bladder Cancer. *Korean J Urol.* 2010;51(2):88, doi: 10.4111/kju.2010.51.2.88.

130. Hosseini J., Golshan AR., Mazloomfard MM., Mehraei A., Zargar MA., Ayati M., et al. Detection of recurrent bladder cancer: NMP22 test or urine cytology? *Urol J.* 2012;9(1):367–372.
131. Horstmann M., Todenhöfer T., Hennenlotter J., Aufderklamm S., Mischinger J., Kuehs U., et al. Influence of age on false positive rates of urine-based tumor markers. *World J Urol.* 2013;31(4):935-40, doi: 10.1007/s00345-012-0906-1.
132. Todenhöfer T., Hennenlotter J., Witstruk M., Gakis G., Aufderklamm S., Kuehs U., et al. Influence of Renal Excretory Function on the Performance of Urine Based Markers to Detect Bladder Cancer. *J Urol.* 2012;187(1):68-73, doi: 10.1016/j.juro.2011.09.023.
133. Todenhöfer T., Hennenlotter J., Kühs U., Tews V., Gakis G., Aufderklamm S., et al. Influence of Urinary Tract Instrumentation and Inflammation on the Performance of Urine Markers for the Detection of Bladder Cancer. *Urology.* 2012;79(3):620-5, doi: 10.1016/j.urology.2011.10.067.
134. Lotan Y., Shariat SF., the NMP22 Study Group¹ Impact of risk factors on the performance of the nuclear matrix protein 22 point-of-care test for bladder cancer detection. *BJU Int.* 2008;101(11):1362-7, doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07473.x.
135. Huber S., Schwentner C., Taeger D., Pesch B., Nasterlack M., Leng G., et al. Nuclear matrix protein-22: a prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer. Results from the UroScreen study: NMP22 in a

- population at risk for bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110(5):699-708, doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10883.x.
136. Terrell JD., Elias KJ., Sagalowsky AI., Lotan Y. Patients with a negative cystoscopy and negative Nmp22® Bladderchek® test are at low risk of missed transitional cell carcinoma of the bladder: a prospective evaluation. *Int Braz J Urol.* 2011;37(6):706-11, doi: 10.1590/S1677-55382011000600004.
137. Shariat SF., Meryn S., Lee R., Marberger MJ., Scherr DS., Savage C., et al. Assessing the Clinical Benefit of NMP22 in the Surveillance of Patients with Non-muscle-invasive Bladder Cancer and Negative Cytology: A Decision-curve Analysis: ISMH World Congress 2010 Abstract 191. *J Mens Health.* 2010;7(3):341-341, doi: 10.1016/j.jomh.2010.09.192.
138. Barbieri CE., Cha EK., Chromecki TF., Dunning A., Lotan Y., Svatek RS., et al. Decision curve analysis assessing the clinical benefit of NMP22 in the detection of bladder cancer: secondary analysis of a prospective trial. *BJU Int.* 2012;109(5):685–690.
139. Saad A., Hanbury DC., McNicholas TA., Boustead GB., Morgan S., Woodman AC. A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine. *BJU Int.* 2002;89(4):369–373.
140. Jeong S., Park Y., Cho Y., Kim YR., Kim H-S. Diagnostic values of urine CYFRA21-1, NMP22, UBC, and FDP for the detection of bladder cancer. *Clin Chim Acta.* 2012;414:93-100, doi: 10.1016/j.cca.2012.08.018.

141. Al-Maghrebi M., Kehinde EO., Kapila K., Anim JT. Urinary Survivin mRNA Expression and Urinary Nuclear Matrix Protein 22 BladderChek® and Urine Cytology in the Detection of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Med Princ Pract.* 2012;21(3):295-7, doi: 10.1159/000334811.
142. Kelly JD., Dudderidge TJ., Wollenschlaeger A., Okoturo O., Burling K., Tulloch F., et al. Bladder Cancer Diagnosis and Identification of Clinically Significant Disease by Combined Urinary Detection of Mcm5 and Nuclear Matrix Protein 22. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e40305, doi: 10.1371/journal.pone.0040305.
143. Casetta G., Gontero P., Zitella A., Pelucelli G., Formiconi A., Priolo G., et al. BTA quantitative assay and NMP22 testing compared with urine cytology in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int.* 2000;65(2):100–105.
144. ÖGE Ö., Kozaci D., Gemalmaz H. The BTA stat test is nonspecific for hematuria: an experimental hematuria model. *J Urol.* 2002;167(3):1318–1320.
145. Serretta V., Pomara G., Rizzo I., Esposito E. Urinary BTA–Stat, BTA–Trak and NMP22 in Surveillance after TUR of Recurrent Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol.* 2000;38(4):419–425.
146. Guo A., Wang X., Shi J., Sun C., Wan Z. Bladder tumour antigen (BTA stat) test compared to the urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: A

meta-analysis. *Can Urol Assoc J.* 2014;8(5-6):347, doi:
10.5489/cuaj.1668.

147. Heicappell R diger., Müller M., Fimmers R., Miller K. Qualitative determination of urinary human complement factor H-related protein (hcfHrp) in patients with bladder cancer, healthy controls, and patients with benign urologic disease. *Urol Int.* 2000;65(4):181–184.
148. Boman H., Hedelin H., Jacobsson S., Holmäng S. Newly diagnosed bladder cancer: the relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status. *J Urol.* 2002;168(5):1955–1959.
149. Raitanen M-P., Marttila T., Kaasinen E., Rintala E., Aine R., Tammela TL., et al. Sensitivity of human complement factor H related protein (BTA stat) test and voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(6):1689–1692.
150. Raitanen MP., Marttila T., Nurmi M., Ala-Opas M., Nieminen P., Aine R., et al. Human complement factor H related protein test for monitoring bladder cancer. *J Urol.* 2001;165(2):374–377.
151. Lokeshwar VB., Schroeder GL., Selzer MG., Hautmann SH., Posey JT., Duncan RC., et al. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer.* 2002;95(1):61-72, doi: 10.1002/cncr.10652.

152. Miyake M., Goodison S., Rizwani W., Ross S., Bart Grossman H., Rosser CJ. Urinary BTA: indicator of bladder cancer or of hematuria. *World J Urol.* 2012;30(6):869-73, doi: 10.1007/s00345-012-0935-9.
153. Davies B., Chen JJ., McMurry T., Landsittel D., Lewis N., Brenes G., et al. Efficacy of BTA stat, cytology, and survivin in bladder cancer surveillance over 5 years in patients with spinal cord injury. *Urology.* 2005;66(4):908-11, doi: 10.1016/j.urology.2005.05.022.
154. Giannopoulos A., Manousakas T., Mitropoulos D., Botsoli-Stergiou E., Constantinides C., Giannopoulou M., et al. Comparative evaluation of the BTAstat test, NMP22, and voided urine cytology in the detection of primary and recurrent bladder tumors. *Urology.* 2000;55(6):871–875.
155. Gutierrez Banos JL., Rebollo Rodrigo MH., Antolin Juarez FM., Martin Garcia B. NMP 22, BTA stat test and cytology in the diagnosis of bladder cancer: a comparative study. *Urol Int.* 2001;66(4):185–190.
156. Mahnert B., Tauber S., Kriegmair M., Nagel D., Holdenrieder S., Hofmann K., et al. Measurements of Complement Factor H-Related Protein (BTA-TRAK™ Assay) and Nuclear Matrix Protein (NMP22 Assay) – Useful Diagnostic Tools in the Diagnosis of Urinary Bladder Cancer? *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(1), doi: 10.1515/CCLM.2003.018.
157. Schroeder GL., Lorenzo-Gomez M-F., Hautmann SH., Friedrich MG., Ekici S., Huland H., et al. A side by side comparison of cytology and

- biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol*. 2004;172(3):1123-6, doi: 10.1097/01.ju.0000134347.14643.ab.
158. Tsui K-H., Chen S-M., Wang T-M., Juang H-H., Chen C-L., Sun G-H., et al. Comparisons of voided urine cytology, nuclear matrix protein-22 and bladder tumor associated antigen tests for bladder cancer of geriatric male patients in Taiwan, China. *Asian J Androl*. 2007;9(5):711-5, doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00218.x.
159. Raitanen M-P., The FinnBladder Group The role of BTA stat Test in follow-up of patients with bladder cancer: results from FinnBladder studies. *World J Urol*. 2008;26(1):45-50, doi: 10.1007/s00345-007-0230-3.
160. Ritter R., Hennenlotter J., Kühs U., Hofmann U., Aufderklamm S., Blutbacher P., et al. Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014;32(3):337-44, doi: 10.1016/j.urolonc.2013.09.024.
161. Gkialas I., Papadopoulos G., Iordanidou L., Stathouros G., Tzavara C., Gregorakis A., et al. Evaluation of Urine Tumor-Associated Trypsin Inhibitor, CYFRA 21-1, and Urinary Bladder Cancer Antigen for Detection of High-Grade Bladder Carcinoma. *Urology*. 2008;72(5):1159-63, doi: 10.1016/j.urology.2008.04.009.
162. Mian C., Lodde M., Haitel A., Vigl EE., Marberger M., Pycha A. Comparison of the monoclonal UBC-ELISA test and the NMP22 ELISA test

- for the detection of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2000;55(2):223–226.
- 163 Hedelin H., Jonsson K., Salomonsson K., Boman H. Screening for bladder tumours in men aged 60–70 years with a bladder tumour marker (UBC) and dipstick-detected haematuria using both white-light and fluorescence cystoscopy. *Scand J Urol Nephrol*. 2006;40(1):26-30, doi: 10.1080/00365590500368807.
164. Babjuk M., Soukup V., Pešl M., Košťířová M., Drncová E., Smolová H., et al. Urinary Cytology and Quantitative BTA and UBC Tests in Surveillance of Patients with pTapT1 Bladder Urothelial Carcinoma. *Urology*. 2008;71(4):718-22, doi: 10.1016/j.urology.2007.12.021.
165. Boman H., Hedelin H., Jacobsson S., Holmäng S. Newly diagnosed bladder cancer: the relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status. *J Urol*. 2002;168(5):1955–1959.
166. Babjuk M., Soukup V., Pešl M., Košťířová M., Drncová E., Smolová H., et al. Urinary Cytology and Quantitative BTA and UBC Tests in Surveillance of Patients with pTapT1 Bladder Urothelial Carcinoma. *Urology*. 2008;71(4):718-22, doi: 10.1016/j.urology.2007.12.021.
167. Pichler R., Tulchiner G., Fritz J., Schaefer G., Horninger W., Heidegger I. Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in

- Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *Int J Med Sci.* 2017;14(9):811-9, doi: 10.7150/ijms.19929.
168. Styrke J., Henriksson H., Ljungberg B., Hasan M., Silfverberg I., Einarsson R., et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of UBC[®] Rapid in bladder cancer: a Swedish multicentre study. *Scand J Urol.* 2017;51(4):293-300, doi: 10.1080/21681805.2017.1313309.
169. Gopalakrishna A., Fantony JJ., Longo TA., Owusu R., Foo W-C., Dash R., et al. Anticipatory Positive Urine Tests for Bladder Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(6):1747-53, doi: 10.1245/s10434-016-5763-5.
170. Ecke TH., Weiß S., Stephan C., Hallmann S., Barski D., Otto T., et al. UBC[®] *Rapid* Test for detection of carcinoma in situ for bladder cancer. *Tumor Biol.* 2017;39(5):101042831770162, doi: 10.1177/1010428317701624.
171. Schardt C., Adams MB., Owens T., Keitz S., Fontelo P. Utilization of the PICO framework to improve searching PubMed for clinical questions. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2007;7(1):16, doi: 10.1186/1472-6947-7-16.
172. Liberati A., Altman DG., Tetzlaff J., Mulrow C., Gotzsche PC., Ioannidis JPA., et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ.* 2009;339(jul21 1):b2700-b2700, doi: 10.1136/bmj.b2700.

-
173. Ciapponi A. QUADAS-2: instrumento para la evaluación de la calidad de estudios de precisión diagnóstica. 2015:5.
174. Bossuyt PM., Reitsma JB., Bruns DE., Gatsonis CA., Glasziou PP., Irwig L., et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *The BMJ*. 2015;351, doi: 10.1136/bmj.h5527.
175. Shariat S., Zippe C., Ludecke G., Boman H., Sanchez Carbayo M., Casella R., et al. Nomograms including nuclear matrix protein 22 for prediction of disease recurrence and progression in patients with Ta, T1 or CIS transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2005;173(5):1518-25, doi: 10.1097/01.ju.0000154696.48217.75.
176. Gleichenhagen J., Arndt C., Casjens S., Meinig C., Gerullis H., Raiko I., et al. Evaluation of a New Survivin ELISA and UBC® Rapid for the Detection of Bladder Cancer in Urine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):226, doi: 10.3390/ijms19010226.

ANEXO

Informe aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (Hospital Vall d'Hebron)



Vall d'Hebron
Hospital

Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 489 38 91
Fax 93 489 41 80
ceio@vhbr.org

ID-RETF080

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Doña Mireia Navarro, Secretaria del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 239 el pasado 29 de enero de 2016 y evaluó el proyecto de investigación PR(AG)07/2016 presentado con fecha 01/01/2016, titulado "*Evaluación de una prueba rápida de citoqueratinas 8 y 18 en orina para la detección del carcinoma urotelial vesical*" que tiene como investigador principal al Dr. Carles Raventós Busquets del Servicio de Urología de nuestro Centro.

Y que tras emitir un informe aprobado condicionado en dicha reunión y evaluar la documentación recibida posteriormente en respuesta a este informe

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

DICTAMEN FAVORABLE

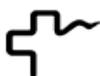
El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:

Presidenta: Gallego Melcón, Soledad. Médico
Vicepresidente: Segarra Sarries, Joan. Abogado
Secretaria: Navarro Sebastián, Mireia. Química



Institut Català
de la Salut

Hospital Universitari Vall d'Hebron
Universitat Autònoma de Barcelona



Vocales: Armadans Gil, Lluís. Médico
Azpiroz Vidaur, Fernando. Médico
Balasso, Valentina. Médico
Cucurull Folguera, Esther. Médico Farmacóloga
Latorre Arteché, Francisco. Médico
De Torres Ramírez, Inés M. Médico
Fernández Liz, Eliadio. Farmacéutico de Atención Primaria
Ferreira González, Ignacio. Médico
Fuentelsaz Gallego, Carmen. Diplomada Enfermería
Fuentes Camps, Inmaculada. Médico Farmacóloga
Guardia Massó, Jaume. Médico
Joshi Jubert, Nayana. Médico
Hortal Ibarra, Juan Carlos. Profesor de Universidad de Derecho
Montoro Ronsano, J. Bruno. Farmacéutico Hospital
Rodríguez Gallego, Alexis. Médico Farmacólogo
Sánchez Raya, Judith. Médico
Solé Orsola, Marta. Diplomada Enfermería
Suñé Martín, Pilar. Farmacéutica Hospital
Vargas Blasco, Víctor. Médico

En dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Lo que firmo en Barcelona a 15 de marzo de 2016

**MIREIA NAVARRO
SEBASTIAN**

Firmado digitalmente por MIREIA NAVARRO SEBASTIAN
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, ou=3/legua https://
www.caib.cat/ca/veure/AT/10331, ou=Servicio Público de
Certificación CPSCSA-2, cn=MIREIA NAVARRO SEBASTIAN,
givenName=MIREIA, serialNumber=381212262, cn=MIREIA
NAVARRO SEBASTIAN
Fecha: 2016.03.16 09:33:28 +0100'

Sra. Mireia Navarro
Secretaria CEIm

