

Affidabilità dell'UBC (Urinary Bladder Cancer) antigene come marcatore tumorale vescicale nei pazienti anziani

Francesco Torelli^o, Roberto Ricciotti^o, Riccardo Grifoni*, Giovanni Battista Muraro*

^oLaboratorio di Radioimmunologia - INRCA- (Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per Anziani) IRCCS Ancona

*Divisione di Urologia INRCA (Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per Anziani) IRCCS, Ancona

RIASSUNTO

Obiettivo. Esaminare la capacità del marker tumorale Urinary Bladder Cancer (UBC) antigene nel diagnosticare precocemente le recidive di neoplasie vescicali rispetto ai metodi strumentali. **Metodi.** L'UBC antigene è stato valutato nelle urine di 273 individui: 84 soggetti apparentemente sani, 61 pazienti affetti da patologie urologiche benigni, 128 pazienti in precedenza trattati chirurgicamente per neoplasia vescicale accertata istologicamente. La determinazione dell'UBC antigene è stata eseguita con metodo radioimmunologico (IRMA). **Risultati.** L'analisi dei dati ottenuti ha fornito una sensibilità clinica del 76%, una specificità clinica dell'84%, mentre l'efficienza diagnostica è risultata essere dell'81%. **Conclusioni.** Attualmente non è ancora possibile sostituire l'esame cistoscopico con questo nuovo marcatore tumorale per diagnosticare le neoplasie vescicali o le recidive.

ABSTRACT

Validity of UBC (Urinary Bladder Cancer) antigen as bladder cancer marker in the elderly patients

Objective. To evaluate if the tumor marker Urinary Bladder Cancer (UBC) antigen is able to early recognize recurrences of bladder cancer, 25 compared to instrumental investigation. **Method.** UBC antigen was determined in 273 individuals: 84 apparently healthy subjects, 61 patients affected with benign urologic disorders, 128 patients with histologically proven bladder cancer who previously underwent surgery. UBC antigen was assayed using an immunoradiometric method (IRMA). **Results.** Data analysis showed a clinical sensitivity of 76%, a clinical specificity of 84%, while the diagnostic efficiency resulted 81%. **Conclusions.** Up to now it is not possible to substitute UBC antigen measurement in urine for cystoscopy in order to diagnose bladder cancer or its recurrences

INTRODUZIONE

L'incidenza del tumore vescicale raggiunge i più alti livelli tra la 6^a e la 7^a decade di vita; numerosi studi indicano che il numero di persone colpite è in crescente aumento (1) e circa la metà dei nuovi casi/anno colpiscono persone di 70 anni o più con una età media di diagnosi di 69 anni per gli uomini e 70 per le donne.

Negli USA ogni anno sono registrati circa 54.000 nuovi casi di carcinoma vescicale con 12.000 morti, che rappresentano rispettivamente il 5% di tutti i nuovi casi di neoplasia ed il 2,2% di tutti i decessi per tumore (2).

In Europa i più alti tassi sono stati evidenziati nei paesi del Nord e nella U.E sono registrati circa 53.000 nuovi casi all'anno con una mortalità del 5% (3); l'incidenza è circa doppia nella popolazione di razza bianca rispetto a quella nera (3).

Tra i fattori di rischio che più di altri sono certamente correlati con il tumore vescicale vi sono il tabagismo, l'inquinamento ambientale, le attività lavorative che interessano specialmente i settori dei collanti, delle vernici e dei pellami (4).

Oltre i 3/4 dei tumori della vescica (Transitional Cell Cancer -TCC-) insorgono come tumori superficiali (Superficial Bladder Cancer - SBC -) che nella maggior parte dei

casi si presentano in forma papillifera, confinati alla mucosa o infiltranti la lamina propria. Studi citogenetici e markers biologici hanno chiaramente evidenziato come le caratteristiche evolutive di queste neoplasie dipendano non solo dallo stadio e dal grado del tumore ma anche da altri aspetti biomolecolari (5). Dopo la resezione chirurgica per via endoscopica (TUR), che rappresenta ancora il gold standard terapeutico, il 50-80% dei pazienti con neoplasie vescicali allo stadio pTa-pT1 hanno delle recidive; il 20-30% di queste sono di grado maggiore e necessitano nel 50% dei casi di radioterapia o cistectomia radicale (6,7).

Le indagini cliniche per identificare precocemente quali delle neoplasie superficiali della vescica avranno un comportamento più aggressivo sono ancora troppo spesso complesse, invasive e costose. Di base esse comprendono la cistoscopia, la biopsia e la citologia urinaria nel liquido di lavaggio vescicale o sulle urine spontanee. I vari metodi e schemi terapeutici adiuvanti e neoadiuvanti proposti oltre alla TUR sino ad ora hanno avuto scarso successo nel ridurre significativamente la mortalità associata a questa malattia a meno che non siano stati combinati ad una strategia di diagnosi precoce (8,9) e di follow up che, per essere efficaci è necessario che siano condotti con strumenti accurati e metodiche codificate a livello internazionale.

Al momento attuale la cistoscopia rappresenta lo strumento diagnostico più diffusamente utilizzato per l'identificazione dei tumori della vescica anche se non risulta sempre pienamente affidabile nella visualizzazione di tumori di piccole dimensioni o che sono localizzati in posizioni difficilmente ispezionabili (10). E' per questo che negli ultimi anni sono state utilizzate nuove metodiche cistoscopiche che utilizzando sostanze fotosensibilizzanti somministrate localmente o e.v. e particolari lunghezze d'onda della sorgente luminosa hanno permesso di visualizzare e trattare anche piccole recidive in zone difficili (11). In ogni caso la cistoscopia rimane una indagine invasiva a volte mal tollerata dai pazienti e non priva di rischi quali principalmente le infezioni genito-urinarie e la macroematuria.

Per evidenziare la presenza di una neoplasia uroteliale vescicale spesso alla cistoscopia si affianca la citologia urinaria che tuttavia mostra dei limiti nella necessità di disporre di esaminatori esperti, nella scarsa sensibilità e nel fatto che il tempo di duplicazione delle cellule uroteliali è relativamente lungo e che i campioni in genere contengono un numero di cellule molto basso. Le cellule esfoliate si trovano in un ambiente non idoneo con un'elevata acidità e bassa osmolarità (12); questo ambiente determina una variazione dell'aspetto di tali elementi cellulari che può rendere difficile l'individuazione di caratteristiche diagnostiche essenziali.

Nella diagnosi dei tumori vescicali, sia primitivi che recidivanti, per ovviare ai sopracitati inconvenienti è divenuta sempre più impellente l'esigenza di disporre di metodi non invasivi e poco costosi ma altrettanto sicuri. Gli studi si sono così orientati verso la identificazione di marcatori biochimici in campioni di urina dei pazienti, come ad esempio la ricerca di antigeni solubili associati alle cellule neoplastiche. Seguendo questa tendenza sono stati identificati e introdotti nella pratica clinica biomarcatori utilizzati come strumento di diagnosi o di progressione della malattia. Gli esami attualmente disponibili ed effettuabili sulle urine, tra cui il Tissue Polypeptide Antigen (TPA), il Cyfra 21-1 (13), il Bladder Tumor Antigen (BTA), il Nuclear Matrix Protein (NMP-22) e l' Urinary Bladder Cancer Antigen (UBC-Antigen) sono di rapida esecuzione, in alcuni casi eseguibili in completa automazione e potenzialmente in grado di fornire allo specialista informazioni affidabili per una più efficace pianificazione di eventuali procedure più invasive.

Il presente studio si propone di verificare la specificità, la sensibilità e l'efficacia diagnostica della concentrazione urinaria del marcatore biochimico Urinary Bladder Cancer (UBC) Antigen, nella sorveglianza di pazienti affetti da neoplasia vescicale per la rilevazione precoce di recidive e limitare così il numero di ulteriori indagini.

MATERIALI E METODI

L'UBC antigene è stato determinato in 273 campioni di urina provenienti da individui.

Di questi, 128 erano pazienti (95 maschi e 33 femmine,

età media 71.2 ± 9.2) precedentemente operati per neoplasia vescicale, accertata istologicamente, presso la Divisione di Urologia.

Ai controlli periodici post-operatori, eseguiti con l'indagine cistoscopica ogni tre mesi per il primo anno, 91 pazienti (gruppo 1) non presentavano recidive, mentre in 37 pazienti (gruppo 2) erano presenti.

Lo stesso marcatore è stato misurato nell'urina di 61 pazienti (gruppo 3) (42 maschi e 19 femmine, età media 69.4 ± 9.4) che si erano presentati presso la Divisione di Urologia per disturbi urologici i quali all'esame cistoscopico non si sono rivelati di natura neoplastica (ipertrofia prostatica benigna, cistiti, disturbi minzionali irritativi). Infine la determinazione dell'UBC antigene è stato eseguito nell'urina di 84 individui apparentemente sani (gruppo 4) (40 maschi e 44 femmine, età media 72.7 ± 6.9) che si erano presentati presso il nostro Istituto per accertamenti di routine.

Prima dell'indagine cistoscopica a tutti i pazienti è stato prelevato un campione di urina trattato con opportuni conservanti e sottoposto, presso il laboratorio di Radioimmunologia del medesimo ospedale, a centrifugazione (1000g, 10 min), aliquotato e congelato a -20°C .

La determinazione dell'antigene UBC è stato effettuato secondo le istruzioni fornite dal produttore del kit (IDL Biotech, Sollentum-Sweden distribuito in Italia da Pantec s.r.l.).

Si tratta di un metodo immunoradiometrico (IRMA) che rivela la presenza nelle urine di frammenti di citocheratina (14,15), quali espressione della differenziazione epiteliale sia benigna che maligna e che sembrano manifestare una maggiore capacità di rilevare tumori vescicali rispetto ad altri antigeni solubili.

I campioni urinari dei pazienti e gli standards sono stati incubati con un anticorpo monoclonale anti-UBC legato ad una fase solida; l'aggiunta di un secondo anticorpo marcato con iodio 125 provoca la formazione di un immunocomplesso. Dopo una serie di lavaggi la radioattività, proporzionale alla concentrazione dell'analita, è stata misurata in un gamma counter.

Le concentrazioni dell'antigene UBC dei singoli campioni sono state riferite alla concentrazione di creatinina dei medesimi, come indicato dal procedimento.

Per valutare l'affidabilità analitica dell'esame oggetto di studio sono state eseguite verifiche delle caratteristiche di precisione e accuratezza dello stesso; la variazione percentuale, espressa come CV% intra-saggio e inter-saggio, è risultata essere rispettivamente 4.5% e 5.6%.

Il presente metodo analitico non ha mostrato reazioni crociate quando è stato testato in urine di pazienti affetti da altre neoplasie aventi valori elevati di TPA e di Cyfra21-1.

RISULTATI

La tabella 1 mostra, per ognuno dei gruppi di soggetti, la mediana dei valori di concentrazioni dell'antigene UBC nonché i valori corrispondenti al 75° ed al 95° percentile

Tabella 1

Valori mediani (50° percentile) e valori corrispondenti al 75° e 95° percentile della distribuzione di UBC nelle urine di soggetti appartenenti ai differenti gruppi. Tutti i valori sono in ng/mg di creatinina.

Statistica	Gruppo 1 (operati senza recidive) n = 91	Gruppo 2 (operati senza recidive) n = 37	Gruppo 3 (patologie non-neoplastiche) n = 61	Gruppo 4 (controlli) n = 84
mediana	2,2	14,7	4,6	1,7
75° percentile	13,3	31,8	14,4	6,5
95° percentile	24,0	283,0	59,4	13,2

della distribuzione. La tabella 2 riporta i valori della significatività statistica (p) delle differenze tra i valori mediani nel confronto di ciascun gruppo con tutti gli altri, saggiata con il test di Wilcoxon per dati non appaiati.

Sono risultate statisticamente significative:

1) la differenza tra il gruppo 1 (pazienti operati ma senza recidive) e il gruppo 2 (pazienti operati che presentano recidive);

2) la differenza tra il gruppo 2 e il gruppo 3 (pazienti con patologie urinarie non neoplastiche);

3) la differenza tra il gruppo 2 e il gruppo 4 (soggetti di controllo).

Considerando la cistoscopia come metodo di riferimento nell'accertare la presenza o meno della neoplasia vescicale e che nel gruppo 4 il nostro cut-off era di 13,2 ng/mg.cr., corrispondente al valore del 95° percentile, si doveva verificare se, con l'uso dell'esame si evidenziava la stessa prevalenza di pazienti affetti da recidiva rispetto alla cistoscopia.

Otto soggetti del gruppo 4 (9%), avevano valori di UBC al di sopra del punto di cut-off. Ventotto pazienti del gruppo 2 (75%) presentavano valori di UBC al di sopra del cut-off (pazienti veri positivi: VP); quindi 9 pazienti dello stesso gruppo (37-28 = 9) risultavano essere falsi negativi (FN).

L'esame ha rilevato 15 pazienti del gruppo 1 (16.5%) con un valore dell'antigene UBC al di sopra del punto di cut-off: essi erano falsi positivi (FP), mentre i rimanenti 76 pazienti (83.5%) erano veri negativi (VN).

In questo modo è stato possibile calcolare la sensibilità clinica (Se), la specificità clinica (Sp) e l'efficienza diagnostica (D.E.) del test.

La SENSIBILITÀ CLINICA, ossia la capacità dell'antigene UBC di riconoscere la presenza della malattia in

pazienti effettivamente malati è stata: $Se = VP/VP + FN = 28/37 = 0.76$ (76%), mentre la SPECIFICITÀ CLINICA e quindi la capacità di restare negativo nei soggetti senza la malattia è stata: $Sp = VN/VN + FP = 76/91 = 0.84$ (84%). L'EFFICACIA DIAGNOSTICA, che esprime in modo complessivo l'efficacia dell'antigene UBC è risultata essere: $D.E = VP + VN / VP + VN + FP + FN = 104/128 = 0.81$ (81%).

Da questi dati abbiamo calcolato il valore predittivo positivo e negativo del marcatore; il VALORE PREDITTIVO POSITIVO è cioè la probabilità di avere la malattia fra i soggetti positivi al test e quindi con un valore dell'antigene UBC > 13,2 ng/mg di creatinina è stato di: $VP/VP + FP = 65\%$, mentre il VALORE PREDITTIVO NEGATIVO ossia la probabilità di non avere la malattia fra i soggetti negativi al test e quindi con un valore dell'antigene UBC < 13,2 ng/mg di creatinina è risultato essere: $VN/VN + FN = 89\%$

Un altro parametro che ci è sembrato importante calcolare per valutare ulteriormente l'efficacia diagnostica di questo marcatore è il RAPPORTO DI VEROSIMIGLIANZA (Likelihood ratio) espresso dal rapporto fra i risultati veri positivi e falsi negativi; tale rapporto indica di quanto il risultato del biomarcatore modifica la probabilità che un paziente con date caratteristiche cliniche abbia la malattia e quindi la capacità di orientare la diagnosi dopo l'esame nei confronti di quella che si avrebbe senza eseguirlo.

Maggiore è il rapporto di verosimiglianza, maggiore è la probabilità che l'esame indichi la presenza di malattia.

Per l'antigene UBC tale rapporto è stato: $VP/FP = 28/15 = 1.9$

In letteratura sono stati riportati alcuni limiti arbitrari scelti su base empirica per definire il potenziale impatto

Tabella 2

Significatività delle differenze tra i valori mediani dei differenti gruppi

Test di Wilcoxon per dati non appaiati	P
Gruppo 1 vs gruppo 2	0,00091*
Gruppo 1 vs gruppo 3	0,558
Gruppo 1 vs gruppo 4	0,636
Gruppo 2 vs gruppo 3	0,013*
Gruppo 2 vs gruppo 4	0,00014*
Gruppo 3 vs gruppo 4	0,285

*Differenza statisticamente significative

Tabella 3

Rapporto di verosimiglianza	Effetto del biomarcatore sulla probabilità di malattia
>10	Cambiamenti consistente
<0,1	Impatto clinico importante
5-10	Cambiamenti moderati
0,1-0,2	Impatto clinico probabile
2-5	Cambiamenti modesti
0,5-0,2	Impatto clinico possibile
1-2	Cambiamenti trascurabili
0,5-1	Impatto clinico irrilevante

del biomarcatore nel processo decisionale basato sul rapporto di verosimiglianza (Tabella. 3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il nostro studio suggerisce che l'efficacia diagnostica dell'esame non è adeguata per diagnosticare le recidive nella sorveglianza di pazienti operati di neoplasia vescicale e che quindi non è possibile sostituirlo alla cistoscopia.

I risultati ottenuti concordano con quanto riportato da Heicappell R. e Coll. (16) relativamente all'impiego dello stesso marcatore. M. Sanchez-Carbayo e Coll. (17) concludono il loro studio affermando che l'UBC antigeno può avere un ruolo potenziale come marcatore tumorale della vescica, ma necessitano ulteriori studi per confermare la performance diagnostica.

Tutti gli strumenti diagnostici, sia endoscopici che biochimici, dovrebbero essere nel contempo sensibili e specifici e quindi non dovrebbero fornire risultati falsi negativi o falsi positivi. Tuttavia mentre il risultato cistoscopico è legato quasi esclusivamente all'abilità professionale dell'operatore, quello biochimico è influenzato da molteplici fattori (infezioni batteriche, ematuria, infiammazioni, cross-reattività aspecifiche ecc...), che condizionano la sensibilità e la specificità analitica che si riflette sulla sensibilità e specificità clinica.

Gli esami biochimici attualmente impiegati mostrano tutti una scarsa specificità e sensibilità di tipo clinico, come evidenziato dalle revisioni della letteratura scientifica specifica fatte da Sorgia M. e Coll. (10), da Burchardt M. e Coll. (18) e da Badrinath R. e Coll. (14). L'NMP22 (nuclear matrix protein) è una proteina della matrice nucleare che si pensa venga rilasciata dai nuclei delle cellule tumorali vescicali dopo la loro necrosi e si ritrovano nelle urine. Il BTA test rileva la presenza di una proteina della membrana basale, strutturalmente e funzionalmente simile al fattore H del complemento umano. Si crede che la produzione del fattore H del complemento da parte del tumore vescicale possa impedire la lisi delle cellule tumorali da parte delle cellule del sistema immunitario. L'analisi nelle urine di marcatori citocheratinici come il Cyfra 21-1 e il TPA (Tissue Polipeptide Antigen) non hanno fornito fino ad oggi risultati più incoraggianti. Pertanto l'alto rischio di risultati falsamente positivi inevitabilmente innesca ulteriori valutazioni diagnostiche, tra cui la cistoscopia, mal accettata dai pazienti, con costi considerevoli e conseguente preoccupazione di chi ha ricevuto il risultato falso positivo. Al contrario, un esame con bassa sensibilità può dare dei risultati falsi negativi determinando in medici e pazienti un erroneo senso di sicurezza, che può indurre a non rilevare i sintomi causati dalla neoplasia, ritardando così la diagnosi di cancro (19).

Nessuno dei nuovi tests biochimici correntemente utilizzati ha mostrato potenzialità tali da poter essere utilizzato in modo ampio ai fini della diagnosi precoce del carcinoma vescicale o delle sue recidive. Tuttavia per poter valutare appieno le loro reali potenziali applicazioni

sono necessari ulteriori studi condotti su vasta scala da diversi centri e su di un elevato numero di casi clinici.

BIBLIOGRAFIA

1. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1995; 45:
2. Korlowski J.: Immunotherapy of bladder cancer, *J. Urol.* 1999, 162:1581
3. Pescatore D., Armela P., Bruno P: Epidemiology and screening of bladder cancer in " New trends and treatment of bladder cancer " Eds Giuliani L., Santi L., Boccardo F.; Sympomed Munchen 1994, 3: 30-47
4. Stadler WM. Molecular events in the initiation and progression of bladder cancer. *Int J Oncol* 1993; 3: 549.
5. Muraro G.B., Melone F., Farina U., Balzi M., Becciolini A.: Adjuvant therapy with BCG in superficial bladder cancer selected by proliferative activity assesment *J. Chemother.* 1996, 8(4): 328-330.
6. Jewett HJ, Strong GH: Infiltrating carcinoma of the bladder. Relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extension and metastases. *J Urol* 1946; 55: 366.
7. Jewett HJ, Eversole SL: Carcinoma of the bladder. Characteristic modes of local invasion. *J Urol* 1960; 83: 383.
8. Kaye KW, Lange PH. Mode of presentation of invasive bladder cancer: Reassessment of the problem. *J Urol* 1982; 128: 31.
9. Hopkins SC, Ford KS, Solows MS. Invasive bladder cancer: Support for screening. *J Urol* 1983; 130: 61.
10. Sorgia M, Scarpa RM, Bruno G.: BTA e NMP22 revisione della letteratura. *Biologia Clinica* 2000; 7: 38-44.
11. Nseyo U., Shumaker E., Sutherland K.: Photodyamyc therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder. *J. Urol.* 1998, 160, 39-44.
12. Murphy W. Current status of urinary cytology in the evaluation of bladder neoplasms. *Human Pathology* 1990; 886-896.
13. Pariente JL, Bordenave L, Michel P, Latapie MJ, Ducassous D, Le Guillau M. Initial evaluation of Cyfra 21-1 diagnostic performances as a urinary marker. *J Urol* 1997; 158: 338-41.
14. Badrinath R. Konety, Robert H. Getzenberg. Urine based markers of urological malignancy. *J Urol* 2001; 165: 600-611.
15. Klein A, Zemar R, Buchumensky V, Klaper R, Nissenkorn I. Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 349-54.
16. Heicappell R., Schostak M., Muller M., Miller K. Evaluation of urinary bladder cancer antigen as a marker for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Clin Lab Invest* 2000; 60: 275-282
17. Sznchez-Carbayo M., Herrero E., mengias J., Mira A., Espana A., Chinchilla V., Soria F. Initial evaluation of the diagnostic performance of the new urinary bladder cancer antigen test as a tumor marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urology* 1999; 161: 1110-1115
18. Burchardt M., Burchardt T., Shabsigh A., De La Taille A., C. Benson C., Sawczuk I.. Current concepts in biomarker technology for bladder cancer. *Clinical Chemistry* 2000; 46:5, 595-605.
19. Morrisin AS: Early detection: Sensitivity and lead time. In: *Screening in Chronic Disease*, 2nd ed New York, Oxford University Press.1992: 43-73.