

Un test de FISH multicolor (fluorescència per hibridació *in situ*) d'orina miccional: una eina per la monitorització de les recidives dels pacients amb antecedents de carcinoma no múscul-invasiu de cèl·lules urotelials. Un estudi prospectiu

Ana B. Galván¹⁻², Marta Salido¹, Espinet Blanca¹, José Placer³, Lara Pijuán⁴,
Núria Juanpere⁴, Josep Lloreta⁴, Francesc Solé¹, Antoni Gelabert⁵

1- Laboratori de Citogenètica Molecular. Dpto. d'Anatomia Patològica. Hospital del Mar. Parc de Salut MAR, GRETNHE-IMIM (Institut de Recerca de l'Hospital del Mar), Barcelona.

2- Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

3- Servei d'Urologia. Hospital Universitari Vall d'Hebrón. Barcelona.

4- Servei d'Anatomia Patològica. Hospital del Mar, IMAS. IMIM (Institut de Recerca de l'Hospital del Mar). Barcelona. Espanya i Departament de Salut i Ciències Experimentals de la Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

5- Servei i Càtedra d'Urologia. Hospital del Mar, IMAS. Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

Resum

Antecedents: El carcinoma urotelial no múscul-invasiu de cèl·lules urotelials (NMIUCC) té una alta tendència a recidivar i els pacients afectats han de ser controlats regularment per cistoscòpia (procediment invasiu). L'objectiu d'aquest estudi va ser comparar una fluorescència multicolor d'hibridació *in situ* (FISH), assaig UV, amb el seguiment de rutina (cistoscòpia i citologia) en la vigilància dels pacients amb una història anterior NMIUCC.

Mètode: Una cohort no seleccionada de pacients sota vigilància per una història prèvia de NMIUCC es van estudiar de forma prospectiva. Es varen realitzar un total de 248 exàmens en 223 pacients. Cada exploració consistí en l'examen microscòpic citològic i FISH de mostres d'orina espontània, i cistoscòpia. Es va determinar les xifres de la sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu (VPP) i negatiu (VPN).

Resultats: La sensibilitat de FISH i cistoscòpia no van ser significativament diferents (92,9% i 82,1%, respectivament). Les especificitats del FISH i cistoscòpia van ser 92,7% i 89,7%, respectivament. El VPP i VPN del FISH van ser 53,5% i 97,2%, mentre que els de la cistoscòpia van ser de 63,4% i 98,9%. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre aquestes dues proves. En contrast, la sensibilitat i l'especificitat de la citologia van ser 14,3% i 99,5%, respectivament.

Conclusions: Donada la manca de diferències estadísticament significatives entre el FISH i els resultats de la cistoscòpia, es proposa que el FISH podria ser un instrument de seguiment útil per a la supervisió dels pacients amb un historial previ de NMIUCC.

Paraules clau: UroVysion TM, bufeta, carcinoma de cèl·lules urotelials, hibridació *in situ* fluorescent (FISH), cistoscòpia, citologia, orina.

Resumen

Antecedentes: El carcinoma urotelial no músculo-invasivo de células uroteliales (NMIUCC) tiene una alta tendencia a recidivar y los pacientes afectados deben ser controlados periódicamente por cistoscopia (procedimiento invasivo). El objetivo de este estudio fue comparar una fluorescencia multicolor de hibridación *in situ* (FISH), ensayo UV, con el seguimiento de rutina (cistoscopia y citología) en la vigilancia de los pacientes con historia anterior de NMIUCC.

Método: Una cohorte no seleccionada de pacientes bajo vigilancia por historia previa de NMIUCC se estudiaron de forma prospectiva. Se realizaron un total de 248 exámenes en 223 pacientes. Cada exploración consistió en el examen microscópico y citológico y FISH de muestras de orina espontáneas y cistoscopia. Se determinaron los valores de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN).

Resultados: La sensibilidad de FISH y cistoscopia no fueron significativamente diferentes (92,9% y 82,1%, respectivamente). Las especificidades del FISH y de la cistoscopia fueron de 92,7% y 89,7%, respectivamente. El VPP y el VPN del FISH fueron 53,5% y 97,2%, mientras que los de la cistoscopia fueron de 63,4% y 98,9%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas dos pruebas. En contraste, la sensibilidad y la especificidad de la citología fueron de 14,3% y de 99,5%, respectivamente.

Conclusiones: Dada la falta de diferencias estadísticamente significativas entre el FISH y los resultados de la cistoscopia, se propone que el FISH podría ser un instrumento de seguimiento útil para la supervisión de los pacientes con historia previa de NMIUCC.

Palabras clave: UroVysion TM, vejiga, carcinoma de células uroteliales, hibridación in situ fluorescente (FISH), cistoscopia, citología, orina

Summary

Introduction: The urotelial cell carcinoma without muscle invasion (NMIUCC) has a high recurrence rate and the patients affected have to be controlled regularly with cystoscopy (invasive procedure). The aim of this study was to compare a fluorescence multicolor in situ hybridization (FISH), UV assay, with routine follow up (cystoscopy and cytology) in patients with NMIUCC.

Methods: A cohort of randomly selected patients with a previous history of NMIUC were studied prospectively. A total of 248 examinations in 223 patients were performed. Each examination included a cytological microscopic examination and FISH from spontaneously obtained urine samples, and cystoscopy. Sensibility, specificity, predictive positive and negative values were recorded.

Results: The sensitivity for FISH and cystoscopy were not significantly different (92,9% and 82,1%, respectively). The specificities for the FISH and cystoscopy were 92,7% and 89,7%, respectively. The VPP and VPN for FISH were 53,5% and 97,2%, whereas the cystoscopy ones were 63,4% and 98,9%. We did not find statistically significant differences between these two tests. In contrast, the sensibility and specificity for the cytology examination were 14,3% i 99,5%, respectively.

Conclusions: Given the lack of statistically significant differences between the results of FISH and cystoscopy, we suggest that FISH could be useful in the follow-up of patients with history of NMIUCC.

Key Words: UroVysion TM, bladder, urothelial carcinoma, fluorescent in situ hybridization, (FISH), cystoscopy, cytology, urine.

Correspondencia

Antoni Gelabert-Mas - Servei i Càtedra d'Urologia - Hospital del Mar, IMAS, Barcelona.

Tel: 034.93.248.32.31

Fax: 034.93.248.34.33

e-mail: Agelabert@hospitaldelmar.cat

Introducció

El carcinoma de cèl·lules urotelials no múscul-invasiu (NMIUCC) s'associa amb una alta taxa de recurrència (60-85%) i progressió a lesions d'alt grau (10-30%) i per tant aquests pacients han de ser controlats regularment¹. L'estàndard per a la vigilància NMIUCC és la cistoscòpia, juntament amb la citologia urinària². La cistoscòpia amb llum blanca segueix

essent el principal mode de diagnòstic i seguiment de càncer de bufeta, però el procediment és costós, invasiu i causa ansietat i molèsties al pacient³. Aquesta tècnica té una especificitat del 90%, però, el carcinoma in situ (CIS) i les lesions planes, així com lesions de vies superiors, poden passar fàcilment desapercudes sense diagnosticar^{4,5}.

La citologia no és invasiva i ofereix una alta especificitat, però té una baixa sensibilitat en el diagnòstic dels tumors papil·lars de baix grau. La vigilància minuciosa és necessària per a la detecció precoç de la recurrència i la progressió, i per tant NMIUCC és una de les malalties més costoses per a la gestió⁶. Per totes aquestes raons, s'han desenvolupat diversos assaigs no invasius per a la detecció de les recidives NMIUCC⁷.

El test UV és un assaig de fluorescència multicolor d'hibridació in situ (FISH) per detectar aberracions cromosòmiques associades amb el càncer de bufeta: aneuploidies dels cromosomes 3, 7 i 17, i la pèrdua de 9p21. Estudis previs han demostrat que el test UV té més sensibilitat que la citologia i una especificitat similar⁸⁻¹⁴. A més, aquests paràmetres no es veuen afectats per condicions inflamatòries benignes, infecció urinària, hematúria, i la teràpia endocavitària amb bacil de Calmette-Guérin¹⁵⁻¹⁷.

L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar el valor del test FISH-UV en una cohort no seleccionada de pacients sota vigilància per NMIUCC en un entorn clínic de rutina. La qüestió principal a tractar va ser si el test FISH de les mostres d'orina havia igualat la mateixa capacitat que la cistoscòpia i la citologia juntes per a la detecció de recidives en els pacients NMIUCC.

Pacients i mètodes

Cohort de pacients

Aquest estudi prospectiu i cec es va dur a terme en els departaments d'Urologia i Anatomia Patològica, Hospital del Mar, Barcelona. Els pacients en assistència rutinària van ser sotmesos a cistoscòpia amb instrument flexible de seguiment entre novembre de 2007 i novembre de 2008 a causa d'una història de NMIUCC. El comitè d'ètica local va aprovar l'estudi i el consentiment informat escrit va ser obtingut de tots els pacients, d'acord amb la Declaració de Hèlsinki. Abans de la cistoscòpia amb llum blanca, una mostra d'orina d'emissió espontània va ser recollida en tots els pacients per efectuar el test FISH i l'anàlisi citològic.

Es van realitzar un total de 248 exàmens de seguiment en 223 pacients. La població d'estudi va comprendre 182 (81.6%) homes i 41 (18,4%) dones (edat

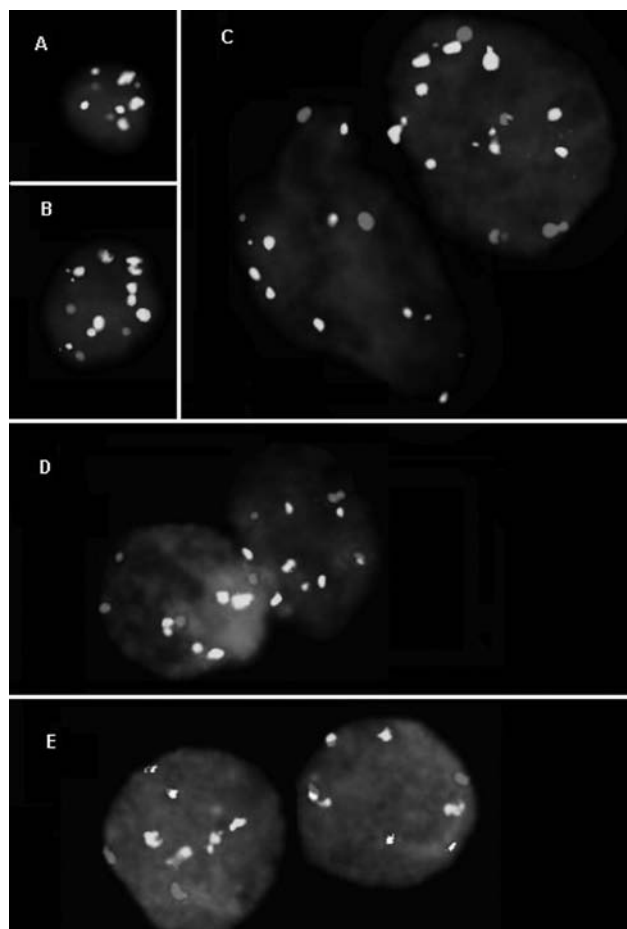


Figura 1: Imatges de FISH de cel.lules NMIUCC (1000x). (A) Cel.lules anormals mostrant tres cromosomes 3 (senyal vermella). (B) Cel.lules mostrant patró cromosòmic anormal (aneuploidia de cromosomes 3, 7, 9 i 17). (C) Cel.lules morfològicament i genètica anormals mostrant aneuploidies dels cromosomes 3, 7, 9 i 17. (D) Cel.lules morfològicament i genètica anormals mostrant ambdues alteracions: aneuploidies dels cromosomes 3, 7, i 17 i dleció homozygòtica del locus 9p21 (sense senyals groga al espectre). (E) Cel.lules normals mostrant dos cromosomes 3 (vermell al espectre), dos cromosomes 7 (verd al espectre), dos cromosomes 17 (aqua al espectre) i dos locus 9p21 (or-groc al espectre)

mitjana 72,9 anys, rang: 31 - 91). La mitjana de supervivència lliure de malaltia fins a la inclusió en l'estudi va ser de 25,6 mesos (rang: 2.5 - 60 mesos). Les característiques histopatològiques del tumor últim abans de la inclusió dels pacients en l'estudi es mostren a la Taula 1. Els pacients van ser seguits després de l'estudi realitzat segons el protocol estàndard de seguiment de rutina (cistoscòpia en combinació amb la citologia) com recomana la guia de la EAU, sense tenir en compte la inclusió en l'estudi i els resultats de FISH.

Estadi Tumoral	Grau del Tumor grade (WHO 2004)	
	N	%
Tx	9	4.0
Ta	185	83.0
T1	25	11.2
Tis	4	1.8

Grau Tumoral (WHO 1973)	Tamany Tumoral	
	N	%
G1	75	33.6
G2	93	41.7
G3	49	22.0
Gx	6	2.7

N: nombre de casos; T: estadi patològic; PUNLMP: tumor de baix potencial maligne; G: grau; CIS: carcinoma in situ.

Taula I: Aspectes histopatològics dels tumors en el moment de ser inclosos al estudi

El temps de seguiment va ser registrat des de la inclusió en l'estudi fins a la confirmació histològica d'un tumor o un control últim dels pacients. La mitjana de seguiment dels pacients va ser de vuit mesos (rang: 0-18,1 mesos).

Cistoscòpia

Els resultats de la cistoscòpia amb llum blanca va ser avaluat com negatiu si els resultats eren normals i com a positius en els casos de recurrència del tumor evident. No obstant això, si la sospita/resultats no confirmats van considerar com a positiva, es va efectuar una resecció transuretral de la bufeta (RTU).

RTU i biòpsia

Els casos amb cistoscòpia positius i / o citologia varen ser sotmesos a RTU. Es van prendre biòpsies en els casos amb lesions sospitoses. Tota la patologia va ser avaluada per un sol patòleg i classificada de conformitat amb les edicions de 1973 i 2004 de la Organització Mundial de la Salut.

Citologia

Les mostres d'orina espontània es van obtenir abans

dels procediments de cistoscòpia. Les mostres d'orina van ser preparades utilitzant una tècnica de la citologia de base líquida, ThinPrep® (Hologic Inc, MA, EUA). La citologia va ser considerada com a positiva si es trobaven cèl·lules malignes o cèl·lules amb canvis atípics que suggerien malignitat, i va ser considerada com a negativa en els casos de canvis atípics lleus a moderats. Els casos amb citologia positiva es dirigiren a RTU.

Hibridació in situ fluorescent (FISH) amb UroVysion™

Les mostres es van obtenir d'orina emesa de forma espontània abans dels procediments de cistoscòpia. Les mostres d'orina van ser preparades utilitzant ThinPrep®.

El pretractament del FISH es va realitzar d'acord a les instruccions de la Vysis-FISH dels reactius (Abad molecular, Abad Park, IL, EUA). La hibridació, rentats post-hibridació i contratació es van realitzar segons el mètode descrit per Placer et al⁹. Un tècnic de laboratori, independent, que desconeixia els resultats de cistoscòpia, citologia i biòpsia va preparar les mostres per analitzar. Les mostres van ser avaluades explorant com a mínim 100 nuclis de les cèl·lules urotelials, registrant el patró de la morfologia del nucli (normal enfront anormal). Al mateix temps, hem tractat d'analitzar com a mínim 25 cèl·lules morfològicament anormals com es va informar anteriorment^{8,10-12}. Hem adoptat els criteris de positivitat descrits per Halling et al.¹⁸ amb petites modificacions: (A) la identificació de cinc o més cèl·lules amb poliosomia (guanys de dos o més cromosomes en un nucli), (B) més de 10 nuclis de guany en un sol cromosoma, o (c) la presència de més de 50 % de nuclis amb pèrdues d'una o ambdues senyals 9p21.

Anàlisi estadística

Considerem cada cistoscòpia i el FISH corresponent i les anàlisis citològiques (tots ells realitzats en el mateix temps) com un cas independent. Els resultats de FISH (no forma part del protocol de seguiment acceptat) no va alterar el comportament clínic, per tant, només els casos amb cistoscòpia i/o la citologia positius va donar lloc a RTU i biòpsia. Els pacients van ser seguits després de l'estudi realitzat pel mètode estàndard de seguiment (cistoscòpia en combinació amb la citologia), sense tenir en compte la inclusió en l'estudi.

Es van comparar totes les tècniques (FISH, cistoscòpia, citologia) i seguiment de rutina (cistoscòpia, en relació amb la citologia) amb les característiques histològiques de la biòpsia obtinguda per cistoscòpia i/o citologia positius a la RTU. A més, es van incloure les lesions malignes detectades no més d'un any després de la inclusió en l'estudi dels tumors histològicament confirmats. Aquests tumors poden ser detectats en l'estudi de seguiment posterior (cistoscòpia i/o citologia) o després de nous símptomes de recurrència (incloent tumors que no poden ser detectats per cistoscòpia i/o citologia (falsos negatius) i/o el resultat de l'anticipació dels FISH.

Aquesta anàlisi ens ha permès determinar la sensibilitat i especificitat del FISH, cistoscòpia, citologia i seguiment de rutina d'un tumor detectat en el primer any després de la inclusió en l'estudi.

L'anàlisi de contingència es va utilitzar per calcular la sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu (VPP) i negatiu (VPN) del seguiment de rutina, cistoscòpia, citologia i FISH. Un interval de confiança del 95% (IC) es va calcular mitjançant el mètode exacte. Les diferències en la sensibilitat i l'especificitat es van calcular utilitzant la prova de McNemar.

Resultats

Un total de 248 esdeveniments del seguiment de 223 pacients van ser inclosos en l'estudi. A causa d'un nombre insuficient de cèl·lules urotelials o d'altres raons tècniques, 24/248 (9,6%) les mostres no van poder ser avaluades per FISH i dos (0,8%) per citologia. Aquests pacients van ser exclosos en l'anàlisi estadística. Per tant, 222 de 248 activitats de seguiment (89,5%) eren tècnicament adequades i s'inclouren en l'anàlisi estadística. Pel que fa als resultats de FISH, fou vàlid en totes les mostres avaluables (224/248) que podia comptar amb 100 cèl·lules urotelials (anàlisi de risc). No obstant això, quan tractem de seleccionar les cèl·lules morfològicament anormals, 92/224 (41%) de les mostres van presentar menys de 25 nuclis morfològicament sospitosos (morfològicament normal o presenta cèl·lules mínimament atípiques). Quan l'anàlisi global es va realitzar, sis de les 92 mostres no morfològicament sospitoses van ser positives. En aquests casos, les cèl·lules que presentaven un patró de cromosomes aberrants no va mostrar un patró morfològic anormal (Figura 1). Així, es van incloure en l'anàlisi estadístic dels

	Cistoscòpia			FISH			Citologia			Cistoscòpia + FISH		
	N	Valor (%)	CI	N	Valor (%)	CI	N	Valor (%)	CI	N	Valor (%)	CI
Sensibilitat	23/28	82.1	63.1-93.9	26/28	92.9	72.7-97.8	4/28	14.3*	0.4-32.7	28/28	100	87.7-100
Especificitat	174/194	89.7	84.5-93.6	179/194	92.7	87.6-95.6	193/194	99.5*	97.2-100	165/194	85.1*	79.2-89.8
PPV	23/43	53.5	37.7-68.8	26/41	63.4	46.9-77.9	4/6	80.0	28.4-99.5	28/57	49.1	35.6-62.7
NPV	174/179	97.2	93.6-99.1	179/181	98.9	96.1-99.9	193/217	88.9	84.8-93.1	165/165	100	97.8-100

N: nombre de casos; CI: interval de confiança; PPV: Valor predictiu positiu; NPV: Valor predictiu negatiu. *Paràmetres amb diferències estadísticament significatives.

Taula III: Totes les sensibilitats, especificitats i valors predictius obtinguts amb FISH i cistoscòpia.

resultats de l'anàlisi global, independentment de la morfologia cel·lular.

La prova FISH va ser positiva en 41/222 (18,5%) casos i negativa en 181/222 (81,5%).

Es va trobar polisomia en 40 mostres, mentre que la aneuploidia del cromosoma 3 es va trobar en un sol cas. La pèrdua de 9p21 no s'ha trobat com un esdeveniment únic en cap cas. Els resultats de la cistoscòpia es van definir com a positius en 43 de 222 exàmens (19,4%) i negatius en 179 (80,6%). La citologia va ser considerada positiva en cinc (2,2%).

Tenint en compte el seguiment de rutina (combinació de citologia i cistoscòpia), 46/222 (20,7%) esdeveniments es van considerar positius (41 per cistoscòpia, citologia i tres per dos en ambdues proves). Tots els pacients amb positivitat per al seguiment de rutina es van sotmetre a la RTU. Cinc lesions van ser tractades amb electrocauterització en el procés de resecció sense recuperar material de biòpsia, pel seu petit volum. En nou casos no hi va haver lesions sospitoses a la RTU i en set la lesió es va determinar com benigna. Tumors histològicament confirmats es van verificar en 25 casos (Taula 2A). El FISH s'efectuà en 23 dels 25 casos i no va poder efectuar-se en dos.

La cistoscòpia identificà tots els tumors, excepte un CIS i un pTaG2 (alt grau) que va identificar la citologia. D'altra banda, la citologia i cistoscòpia varen identificar un pTaG3 (alt grau). El test FISH identificà tots els tumors, excepte un NPUBPM i un pTaG1 (de baix grau).

Durant el seguiment dels 198 pacients amb cistoscòpia i citologia negativa, quatre casos van presentar recurrència de la malaltia en una mitjana de 6,1 mesos a partir de l'anàlisi de l'estudi (Taula 2B). Un estudi de seguiment després de l'aparició dels símptomes en un pacient va detectar un CIS.

A) Biopsia de les recidives detectades per seguiment estandard					
N	Cistoscòpia	Citologia	FISH	Patologia	Tamany
175	Positive	Positive	Positive	G2 (high-grade) Ta	>3cm
217	Positive	Positive	Positive	G3 (high-grade) Ta	>3cm
113	Positive	Negative	Negative	PUNLMP	<1cm
210	Positive	Negative	Positive	PUNLMP	1-3cm
164	Positive	Negative	Negative	G1 (low-grade) Ta	1-3cm
86	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	<1cm
87	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	1-3cm
90	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	1-3cm
135	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	<1cm
138	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	1-3cm
144	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade)Ta	Unknown
181	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	Unknown
182	Positive	Negative	Positive	G1 (low-grade) Tx	<1cm
133	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) T1	1-3cm
38	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	1-3cm
42	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	1-3cm
58	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	>3cm
83	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	<1cm
156	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	<1cm
162	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	1-3cm
219	Positive	Negative	Positive	G2 (high-grade) Ta	1-3cm
146	Positive	Negative	Positive	G3 (high-grade) T1	1-3cm
174	Positive	Negative	Positive	G3 (high-grade) Ta	<1cm
241	Negative	Positive	Positive	G2 (high-grade) Ta	1-3cm
134	Negative	Positive	Positive	CIS	Unknown

B) Biopsia de les recidives detectades durant el seguiment.					
N	Cystoscopy	Cytology	FISH	Pathology	Size
25	Negative	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	<1cm
180	Negative	Negative	Positive	G1 (low-grade) Ta	<1cm
20	Negative	Negative	Positive	CIS	<1cm

N: Nombre de pacients; PUNLMP: tumor de baix potencial maligne; CIS: Carcinoma in situ.

Taula II: Aspectes histològics de les biopsies de les recidives i resultats segons els diferents mètodes

En els tres casos restants, un tumor va ser detectat en l'anàlisi posterior de seguiment. Dos d'ells van ser classificats histològicament com pTaG1 (de baix grau) i en l'últim cas, el seguiment posterior, la cistoscòpia mostrà una recurrència invasiva. A causa de l'alt risc del procés de la biòpsia-ressecció per al pacient, el tumor va ser electrocauteritzat. El test FISH va ser positiu en aquests quatre casos. Es va fer una anàlisi estadística incloent tots els casos amb recidives durant el seguiment.

En aquesta anàlisi estadística, es va utilitzar el seguiment estàndard per detectar la presència d'un tumor en el primer any després de la inclusió en l'estudi. La sensibilitat, especificitat, VPP i VPN resultats de cada tècnica es mostra a la Taula 3. No es van trobar diferències significatives de sensibilitat i especificitat entre cistoscòpia i FISH. La sensibilitat ($P = 0,000$) de la citologia va ser significativament més baixa i l'especificitat significativament major ($p = 0,001$) quan es van comparar amb FISH. La combinació de tècniques de FISH i cistoscòpia va presentar una major sensibilitat que FISH i cistoscòpia sols. No obstant això, aquesta combinació va presentar una especificitat significativament menor ($P = 0,004$ i $P = 0,000$ per a la cistoscòpia i FISH, respectivament).

La taula 4 mostra la concordança entre FISH, cistoscòpia i recurrències comprovada per biòpsia. Tots els resultats van ser analitzats en 186/222 (83,8%) dels casos (positius i negatius = 21 = 165). Entre els pacients amb resultats discordants entre les dues proves, nou dels resultats de FISH positiu sense recurrència van ser considerats com a resultats positius falsos. Un seguiment més prolongat d'aquests pacients es va recollir (en un cas de seguiment les dades no estaven disponibles). La mitjana de seguiment va ser de 23,6 mesos (rang: 12-31,2 mesos). En cap d'aquests pacients en vigilància es varen presentar recidives. La mateixa anàlisi estadística es va realitzar tenint en compte el tumor anterior (de baix grau vs alt grau) i no es van trobar diferències significatives per cap paràmetre.

De la mateixa manera, la sensibilitat s'ha calculat tenint en compte les característiques histològiques del tumors nous detectats. No es van trobar diferències significatives per cap paràmetre, entre les proves (dades no presentades). Significativament, tres dels CIS van ser detectats pel FISH, però no per la cistoscòpia.

N=222	Recidiva		No recidiva	
	Positiu FISH	Negatiu FISH	Positiu FISH	Negatiu FISH
Cistoscòpia +	21 (9.5%)	2 (0.9%)	6 (2.7%)	14 (6.3%)
Cistoscòpia -	5 (2.3%)	0 (0%)	9 (4.1%)	165 (74.3%)

N: nombre de casos.

Taula IV: Concordància entre cistoscòpia, FISH i recidiva.

Discussió

L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar el valor clínic de la tècnica de FISH en una cohort no seleccionada de pacients sota vigilància per NMIUCC.

Un avantatge d'aquest estudi va ser el seu disseny prospectiu i la variabilitat dels pacients van correspondre a les condicions de la pràctica clínica real. En general, l'anàlisi de FISH amb l'assaig UV demostrà una alta sensibilitat i especificitat per a la detecció de tumors de la bufeta, el que indica que el FISH és una eina útil per detectar recidives en pacients amb història prèvia de NMIUCC. Les diferències en els paràmetres estudiats entre la cistoscòpia i el FISH no van ser estadísticament significatives, el que indica que el FISH té una sensibilitat semblant a la cistoscòpia per a la detecció de tumors. Els estudis anteriors^{13,19} i el valor actual net obtingut en aquest estudi suggereixen que hi ha una probabilitat molt baixa de recurrència en pacients amb un resultat de FISH negatiu.

L'avaluació del test FISH, tal com es va realitzar en el present estudi, difereix de la de les publicacions anteriors. Segons el descrit per Hajdinjak et al.²⁰ en un meta-anàlisi comparant FISH i citologia urinària, almenys cinc criteris de positivitat lleugerament diferents han evolucionat des de l'estudi de Sokolova et al.²¹.

L'avaluació del test FISH, tal com es va realitzar en el present estudi, difereix de la de les publicacions anteriors. Segons el descrit per Hajdinjak et al.²⁰ en una meta-anàlisi comparant FISH i citologia urinària, almenys cinc criteris de positivitat lleugerament diferents han evolucionat des de l'estudi de Sokolova et al.²¹. Aquest grup va informar que el recompte de 25 cèl·lules seleccionades anormals va ser més eficient i sensible que el mètode tradicional.

A diferència dels mètodes prèviament publicats, es va avaluar 100 cèl·lules epitelials en lloc de seleccionar un mínim de 25 cèl·lules morfològicament malignes. No obstant això, en 92/248 (40,4%) dels casos no es van trobar cèl·lules amb morfologia sospitosa, encara que sis d'ells van ser positius. Per tant, les cèl·lules genèticament anormals podrien ser morfològicament normals, i viceversa, el que indica que els primers canvis genètics no estan relacionats necessàriament amb els canvis observables en la morfologia. A més, la selecció morfològica de cèl·lules inclou un punt de vista subjectiu i per tant la variabilitat inter-observador és molt probable.

D'altra banda, la informació morfològica proporcionada pel contrast DAPI no és la millor tècnica de cara la selecció morfològica²². Els criteris de positivitat i l'avaluació, possiblement, es poden canviar en un futur pròxim.

La sensibilitat i especificitat de la tècnica de FISH en aquest estudi és lleugerament superior a altres publicacions. Hajdinjak et al.²⁰ van publicar una metanàlisi comparant FISH i citologia urinària i la sensibilitat agrupada i l'especificitat de UV (14 estudis) es va informar d'un 72% (69% a 75%) i 83% (82% a 85%), respectivament. No obstant això, algunes publicacions reporten que el test FISH té una sensibilitat significativament menor que la cistoscòpia. Gudjónsson et al.²⁴ investigaren 175 esdeveniments del seguiment en 156 pacients en vigilància de NMIUCC i van trobar una sensibilitat global del 93% per a la cistoscòpia en comparació amb el 30% per el FISH. La sensibilitat va ser alta en la detecció de CIS (100%), però va ser baixa en la detecció de tumors de baix grau. Aquests autors expliquen aquests resultats per l'alta proporció de tumors de baix risc. Creiem que l'avaluació de 25 nuclis no és el criteri més adequat per detectar els tumors de baix volum cel·lular a la citologia i poques aberracions morfològiques (tumors de baix grau). En el present estudi, la mitjana del nombre de cèl·lules anormals va ser baixa: sis de cada 100 nuclis anormals avaluats.

Seria interessant determinar si existeix un biaix en les característiques patològiques dels tumors detectats. L'ús d'una prova amb una tendència a no detectar tumors d'alt grau podria afectar el pronòstic del pacient. L'anàlisi estadística es va realitzar per separat en els nous (recidives) tumors de baix i d'alt grau detectats. No es van trobar diferències significatives per a cap paràmetre, però l'escàs nombre de tumors

limita la possibilitat de realitzar una anàlisi amb un poder estadístic adequat, tot i que van ser capaços d'identificar una tendència no significativa de la cistoscòpia de no detectar lesions planes d'alta qualitat (CIS), i que figura en la literatura^{5,25}.

Encara que el FISH i la cistoscòpia varen mostrar una alta correlació amb la recurrència comprovada per biòpsia, totes dues tècniques detecten els tumors correctament. Els resultats falsos negatius del FISH podrien ser explicats per l'existència d'aberracions genètiques que el FISH no pot identificar, un nombre baix de cèl·lules tumorals en l'orina a causa de la baixa excreció, i / o un volum baix d'orina. Els resultats positius de FISH sense recurrència (n = 9) es van considerar com a resultats falsos positius. Aquests nou pacients van ser seguits durant un període més llarg de temps (una mitjana de 23.6 mesos) sense recaiguda.

És de destacar que cinc d'ells van presentar només cinc cèl·lules positives. Els casos restants van presentar entre set i 14 cèl·lules alterades. Yoder et al.²⁶ determina un temps de FISH com a predicció anticipada de 29 mesos en el 65% dels pacients sense recidiva i un resultat de FISH positiu. Un seguiment més prolongat de la nostra sèrie confirmarà si aquests resultats són veritablement falsos o representen els resultats d'anticipació, no creiem que un estudi diagnòstic més agressiu es justifiqui en pacients amb citologia sospitosa, cistoscòpia negativa, i un resultat positiu FISH. Una explicació dels resultats de FISH falsos positius és que no totes les cèl·lules amb la mutació genòmica desenvoluparan un tumor. El FISH permet identificar cèl·lules anormals genèticament que potencialment (40%) es poden transformar en un tumor¹⁹. En un percentatge petit de pacients, la lesió podria no ser detectada i, en última instància, les cèl·lules anormals en l'orina podrien desaparèixer a causa de la resolució espontània del tumor.

També la interpretació errònia sobre la base de les cèl·lules en paraigües o les cèl·lules infectades per virus podria conduir a un resultat fals positiu²⁸. Encara que la cistoscòpia és considerada l'estàndard d'or per al diagnòstic, té una taxa de falsos negatius, ja sigui a causa d'un error de l'operador o petites àrees de la CIS, que poden ser difícil de detectar. En altres resultats falsos negatius, el tumor era present, però probablement no és visible a la cistoscòpia i es va fer visible en el seguiment. La inflamació, hematúria i canvis reactius associats amb el tractament podria

dificultar la visualització del uroteli i, en conseqüència, el pacient pot ser sotmès a una cistoscòpia de bell nou de manera innecessària. A més, aquestes característiques podrien induir cistoscòpies de resultats falsos positius.

En l'actualitat, un consens en l'ús de FISH per a la vigilància de NMIUCC no existeix segons els investigadors²⁸. Molts estudis s'han centrat en l'avaluació del FISH i la majoria d'ells han demostrat una millor sensibilitat per detectar el càncer de bufeta que la citologia urinària, però una menor especificitat. No obstant això, cap estudi prospectiu hi ha publicat fins ara on es compara directament el FISH i la cistoscòpia. Un estudi retrospectiu similar va ser publicat per Karnwal i cols.²⁹ amb resultats diferents. En aquest estudi, els autors van incloure només 94 esdeveniments de seguiment de 53 pacients.

En conclusió, l'anàlisi del FISH té alta sensibilitat, especificitat i valors predictius per a la detecció de les recidives en pacients amb NMIUCC, similars als de la cistoscòpia i superior que la citologia. No obstant això, la citologia té una especificitat més gran que el FISH i la cistoscòpia. Creiem que el FISH és una eina útil per al seguiment inicial en pacients amb història prèvia de NMIUCC. Un resultat negatiu del FISH indica clarament que el tumor no és present i sense necessitat d'efectuar una cistoscòpia invasiva, mentre que un resultat de FISH positiu indica clarament que un tumor està present, el que requereix cistoscòpia invasiva per detectar les característiques del tumor. Atesa la manca de diferències estadísticament significatives entre el FISH i els resultats de la cistoscòpia, es proposa que el FISH podria ser una eina útil de diagnòstic inicial en la vigilància dels pacients amb un historial previ de NMIUCC.

Aquest estudi té algunes limitacions com l'escàs nombre de recurrències, que podria limitar les conclusions, encara que la taxa de recurrència similar ha estat descrita en la literatura i es contempla com l'estàndard. Per tant, les nostres dades suggereixen que el FISH podria tenir un paper important en la vigilància de NMIUCC. Més estudis prospectius i aleatoritzats són necessaris per recomanar el FISH versus la cistoscòpia / citologia.



Agraïments

Aquest estudi va ser recolzat en part per una subvenció de la FIU de l'Associació Espanyola d'Urologia i en part per una subvenció (RD07/0020/2004) de la Xarxa Temàtica d'Investigació Cooperativa en Càncer (RTICC), Institut de Salut Carles III (ISCIII), FEDER, Ministeri Espanyol de Ciència i Innovació. Els autors agraeixen a la Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC). Són també les gràcies per a Sergi Mojal per la seva ajuda en l'anàlisi estadístic i Rocío Salgado per la seva ajuda en l'anàlisi de FISH.

Bibliografia

1. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66:4-34.
2. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2008;54:303-314.
3. Messing E, Catalona W. Urothelial tumors of the urinary tract. In Walsh P, Retic A, Vaughan E and Wein A eds, *Campbell's Urology*, 7th edn, Vol.3: Philadelphia: Saunders, 2000: 2327
4. Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinat fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2007;4:542-549.
5. Shaw GL, Bunce CJ. Fluorescence cystoscopy--how to do it. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008;5:267-270.
6. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21:1315-1330.
7. Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol*. 2009;16:23-30.
8. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol*. 2002;167:2001-2006.
9. Placer J, Espinet B, Salido M, Sole F, Gelabert-Mas A. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol*. 2002;42:547-552.
10. Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV, Crawford ED. The UroVysion fluorescence in situ hybridization

zation assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol.* 2004;22:16-19.

11. Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU Int.* 2005;96:1280-1285.

12. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, et al. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer.* 2006;119:1660-1665.

13. Daniely M, Rona R, Kaplan T, et al. Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology. *Cancer.* 2007;111:517-524.

14. Bollmann D, Bollmann M, Bankfalvi A, et al. Quantitative molecular grading of bladder tumors: a tool for objective assessment of the biological potential of urothelial neoplasias. *Oncol Rep.* 2009;21:39-47.

15. Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, et al. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J Urol.* 2005;173:401-404.

16. Mengual L, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, et al. Clinical utility of fluorescent in situ hybridization for the surveillance of bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guerin therapy. *Eur Urol.* 2007;52:752-759.

17. Savic S, Zlobec I, Thalmann GN, et al. The prognostic value of cytology and fluorescence in situ hybridization in the follow-up of nonmuscle-invasive bladder cancer after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy. *Int J Cancer.* 2009;124:2899-2904.

18. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol.* 2000;164:1768-1775.

19. 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;26:246-249.

20. Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial

cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol.* 2008;26:646-651.

21. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn.* 2000;2:116-123.

22. Daniely M, Rona R, Kaplan T, et al. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urology.* 2005;66:1354-1359.

23. Caraway NP, Khanna A, Fernandez RL, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting urothelial carcinoma: a clinicopathologic study. *Cancer Cytopathol.* 2010;118:259-268.

24. Gudjonsson S, Isfoss BL, Hansson K, et al. The value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2008;54:402-408.

25. Whitson J, Berry A, Carroll P, Konety B. A multicolour fluorescence in situ hybridization test predicts recurrence in patients with high-risk superficial bladder tumors undergoing intravesical therapy. *BJU Int.* 2009;104:336-339.

26. 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.

27. Ferra S, Denley R, Herr H, Dalbagni G, Jhanwar S, Lin O. Reflex UroVysion testing in suspicious urine cytology cases. *Cancer Cytopathol.* 2009;117:7-14.

28. Caraway NP, Katz RL. A review on the current state of urine cytology emphasizing the role of fluorescence in situ hybridization as an adjunct to diagnosis. *Cancer Cytopathol.* 2010;118:175-183.

29. Karnwal A, Venegas R, Shuch B, Bassett J, Rajfer J, Reznicek R. The role of fluorescence in situ hybridization assay for surveillance of non-muscle invasive bladder. *Can J Urol.* 2010;17