



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Pikatestit virtsarakon syövän diagnosoinnissa

LuK-tutkielma

Kemian laitos, Turun Yliopisto

Detektioteknologia

Toukokuu 2024

Anu Kultalahti

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Anu Kultalahti

Otsikko: Pikatestit virtsarakon syövän diagnosoinnissa

Ohjaaja: Harri Härmä

Sivumäärä: 16 sivua

Toukokuu 2024

Virtsa on tutkimuksissa yleisesti käytetty kehon erite, josta voidaan tunnistaa erilaisia sairauksia. Virtsapikatestit ovat non-invasiivisia eli kehoon kajoamattomia mittauksia, jotka vaativat vain muutaman pisaran näytettä. Virtsarakon syövässä rakon limakalvossa tai seinämässä oleva kasvain erittää erilaisia proteiineja virtsaan, joita voidaan käyttää diagnostisina markkereina. Pikatestit ovat vieritestauksia (engl. *point-of-care*, *POC*), jotka mittaavat näitä markkereita. Vieritestaus tehdään laboratorion ulkopuolella, joko itse tai nopeasti lääkärissä odottaessa. Immunokromatografiset määritykset ovat usein käytettyjä POC-analytiikassa.

Immunokromatografiseen menetelmään perustuvia pikatestejä virtsarakonsyövälle ovat muun muassa NMP22 BladderChek, UBC Rapid test sekä BTA stat. UBC Rapid test mittaa virtsasta sytokeratiini 8:n ja 18:n fragmentteja. NMP22 BladderChek ja BTA stat mittaavat kvalitatiivisesti tiettyjen proteiinien ennalta määraätty kynnyspitoisuudet. NMP22 BladderChek mittaa tuman matriisiproteiinia 22 ja BTA stat mittaa komplementtitekijään H liittynyttä proteiinia (CFH). Testit ovat nopeita ja antavat tulokset jopa minuuteissa, mutta niiden herkkyys ja spesifisyys vaihtelee merkittävästi.

Avainsanat: Virtsarakon syöpä, virtsapikatesti

Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	4
2. Virtsarakon syöpä ja sen diagnosointi	5
3. Immunokromatografiset pikatestit.....	6
3.1 NMP22 BladderChek	8
3.2 BTA stat.....	9
3.3 UBC Rapid -pikatesti	11
4. Testien vertailu	12
5. Yhteenveto.....	13
Lähteet	15

1. Johdanto

Virtsarakon syöpä kuuluu yleisimpien syöpien joukkoon. Siihen sairastuu vuosittain yli 550 000 ihmistä maailmanlaajuisesti ja myös kuolleisuus on todella suuri, yli 200 000 ihmistä vuosittain. Virtsarakon syövän kuolleisuuteen vaikuttavat syövän uusiutumisen suuri esiintyvyys ja heikko kyky havaita syöpä varhaisessa vaiheessa. [1]

Yleisimmät virtsarakon syövän diagnosointi menetelmät ovat virtsarakon tähystys ja irtosolututkimus. Virtsarakon tähystys on invasiivinen toimenpide, joka on kallis toimenpide ja epämukava potilaalle. Irtosolututkimus on non-invasiivinen toimenpide, mutta vaatii koulutetun henkilökunnan. Sen herkkyys havaita matala-asteisia kasvaimia on heikko.

Näin ollen tarvitaan helppoja, nopeita ja non-invasiivisia menetelmiä, joista diagnosoida virtsarakon syöpä. [2] [3]

Virtsa on yleisesti käytetty hyvä kehon erite, josta voi tunnistaa erilaisia sairauksia merkkiaineiden avulla. Virtsaan perustuvilla määrytyksillä voidaan havaita myös virtsarakon syövän esiintyminen. Virtsarakon syöpäsolut ovat jatkuvasti kosketuksissa virtsan kanssa, jolloin virtsaan erittyy syöväälle spesifisiä merkkiaineita. [4]

Virtsapikatestit ovat non-invasiivisia virtsan merkkiaineisiin perustuvia määrytyksiä, jotka voivat tarjota vaihtoehdon virtsarakon syövän havaitsemisen tavanomaiselle tavalle ja joita voidaan käyttää virtsarakon tähystyksen rinnalla. Monet virtsapikatestit ovat immunokromatografisia vieritestauksia, jotka eivät välttämättä tarvitse koulutettua henkilökuntaa ja voidaan tehdä laboratorion ulkopuolella tai nopeasti lääkärissä. Testit vaativat vain muutaman pisaran käsittelemätöntä virtsaa ja tulokset saadaan minuuteissa. Paljon tutkittuja immunokromatografisia virtsapikatestejä ovat UBC Rapid, NMP22 BladderChek sekä BTA stat. [4]

Pikatesti mittaavat erilaisten merkkiaineiden ennalta määrätyt kynnyspitoisuudet virtsasta. UBC Rapid -pikatesti mittaa virtsaan liukenevien sytokeraatiini 8:n ja 18:n fragmentteja. NMP22 BladderChek -testi mittaa virtsasta ydinmatriisiproteiinia 22. BTA stat -testi taas havaitsee ihmisen komplemetitekiijään H liittyvän proteiinin (CFH) virtsasta. [5]

Eri pikatestien herkkyys ja spesifisyys virtsarakon syövän havaitsemiseen vaihtelee ja niitä verrataan usein irtosolututkimukseen. Tutkimuksien ja menetelmäkehityksien tavoitteena on korvata esimerkiksi yhdessä irtosolututkimuksen kanssa invasiivisen virtsarakon tähystyksen tai edes merkittävästi vähentää sen tarvetta. [4]

2. Virtsarakon syöpä ja sen diagnosointi

Virtsarakon syövässä virtsarakossa esiintyy pahalaatuinen kasvain joko limakalvossa tai virtsarakon seinämässä. Virtsarakon syöpä kuuluu kymmenen yleisimmän syövän joukkoon koko maailmassa. Vuosittain maailmanlaajuisesti todetaan noin 550 000 uutta virtsarakon syöpätapausta. Suomessa todetaan joka vuosi noin 1400 uutta virtsarakon syöpätapausta. Myös kuolleisuus on suuri, sillä virtsarakon syöpään kuoli esimerkiksi vuonna 2018 noin 200 000 ihmistä maailmanlaajuisesti. [1]

Virtsarakon syöpä on heterogeeninen tauti, johon tyypillisesti sairastutaan 50–70 vuoden iässä. Se on kolme kertaa yleisempi miehillä kuin naisilla. Syöpä esiintyy non-lihasinvasiivisena eli pinnallisena noin 70 %:lla potilaista. Tällöin kasvain on kiinnittynyt virtsarakon limakalvoon. Tällaisella pinnallisella syövällä on usein taipumus uusiutua, mutta se ei yleensä ole hengenvaarallinen. Virtsarakon syöpä voi myös edetä lihasinvasiiviseksi sairaudeksi. Lihasinvasiivista syöpää esiintyy 30 %:lla kaikista sairastuneista. Tämä syöpämuoto tunkeutuu lihakseen eli tässä tapauksessa rakonseinämään. Lihasinvasiivisilla tapauksilla on suuri riski etäpesäkkeiden synnyttämiseen ja syöpäperäiseen kuolemaan. [6] Kun syöpä diagnosoidaan ensimmäisen kerran 25 % potilaista kärsii jo lihasinvasiivisesta virtsarakon syövästä ja vaatii kiireellistä hoitoa [3]. On arvioitu, että 50–80 %:lla virtsarakonsyöpäpotilaista, syöpä uusiutuu viiden vuoden kuluessa hoidon aloittamisesta ja 10–30 %:lla se etenee lihasinvasiiviseksi [7].

Virtsarakon syöpä diagnosoidaan tyypillisesti kystoskopialla eli virtsarakon tähystyksellä. Kystoskopia on tällä hetkellä tehokkain käytössä oleva menetelmä virtsarakon syövän toteamiseen [2]. Toinen paljon käytetty menetelmä on sytologia eli irtosolututkimus. Myös virtsarakon röntgenkuvaus eli urografia sekä ultraäänitutkimus ovat yleisessä käytössä. [3]

Näiden ja muiden virtsarakon syövän diagnosoinnissa käytettyjen määritysten yhteydessä käytetään usein käsitteitä spesifisyys ja herkkyys. Spesifisyydellä tarkoitetaan määrittäminen kykyä määrittää negatiiviseksi henkilö, jolla ei ole virtsarakon syöpää. Erittäin spesifinen testi tarkoittaa, että vääriä positiivisia tuloksia on vähän. Herkkyydellä taas tarkoitetaan määrittäminen kykyä määrittää virtsarakon syöpää sairastava henkilö positiiviseksi. Erittäin herkkä testi tarkoittaa, että vääriä negatiivisia tuloksia on vähän, ja näin ollen vähemmän syöpätapauksia jää huomaamatta.

Kystoskopian herkkyys vaihtelee 87 prosentista 100 prosenttiin. Spesifisyys kystoskopiolla on 64 prosentista 100 prosenttiin. [8] Sillä on vaikea havaita pinnallista eli limakalvoille rajoittunutta syöpää. Kystoskopia on myös aikaa vievä, kallis ja potilaalle epämukava invasiivinen eli virtsarakon sisälle ulottuva toimenpide. Se myös vaatii aina kokeneen urologin. [3]

Kystoskopiolla on kuitenkin suuri merkitys virtsarakon syövän diagnosoinnissa sekä uusiutumisen seuraamisessa. Useat lääkärit vaativat kystoskopian toistamista ensimmäisen diagnoosin tai virtsarakon syövän uusiutumisen jälkeen kolmen kuukauden välein seuraavan kahden vuoden ajan ja sen jälkeen puolenvuoden välein taas kahden vuoden ajan. Tämän jälkeen kystoskopia toistetaan kerran vuodessa loppu elämän ajan. [7]

Sytologia on tavanomainen non-invasiivinen testi ja se tehdään tyypillisesti kystoskopian lisäksi. Sen etuna kystoskopiaan verrattuna on, että sillä on mahdollista havaita paremmin limakalvon pinnalle rajoittuneet kasvaimet. Sytologialla voidaan tunnistaa kasvaimet hyvin spesifisesti, vaikka sen herkkyys kasvainten havaitsemiseen on kuitenkin alhainen. [3] Sen spesifisyys on 84 % ja herkkyys 55 % [9]. Sytologian herkkyyteen vaikuttaa muun muassa näytteen laatu, kuorittujen solujen määrä ja patologin asiantuntemus. Alhainen herkkyys johtuu usein sytologian kyvystä havaita heikosti varhaisessa vaiheessa oleva syöpä. [10]

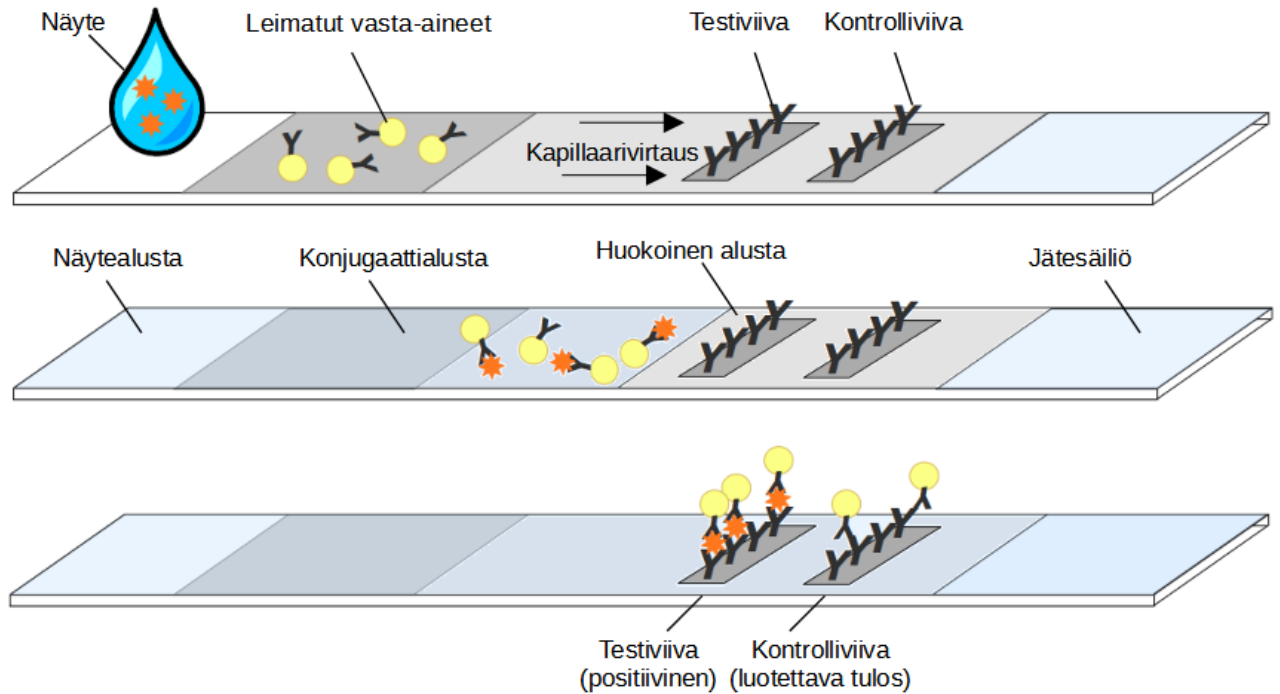
Koska sytologian herkkyys on puutteellista ja kystoskopia on potilaalle epämukava, kehitellään uusia virtsatesteihin perustuvia menetelmiä, pikatestejä. Pikatestit ovat vieritestauksia (engl. *point-of-care*, *POC*), jotka mittaavat kasvaimen virtsaan erittämiä merkkiaineita. POC-testit voidaan tehdä nopeasti laboratorion ulkopuolella, joko itse tai nopeasti lääkäriä odottaessa. [4]

Tarkoituksena on, että virtsapikatestejä käytettäisiin ensisijaisesti riskiryhmien seulontaan ja diagnosointiin sekä jo sairastaneiden seurantaan syövän uusiutumisen estämiseksi. Tavoitteena on korvata tai edes merkittävästi vähentää epämukavan ja vaativan kystoskopian tarvetta. Pikatestejä voitaisiin käyttää yksin tai yhdessä irtosolututkimuksen kanssa. [4]

3. Immunokromatografiset pikatestit

Syövän todentamiseksi on kehitetty yhä enemmän kvalitatiivisia tai puolikvantitatiivisia syövän merkkiainemääryksiä perustuen immunokromatografiseen menetelmään. Immunokromatografiset lateraalivirtaustestit ovat usein käytettyjä POC-analytiikassa. Määrytykset tehdään yksinkertaisilla määrittäsalustoilla, joissa nestemäinen näyte ajetaan

kapillaarivirtauksella huokoisen alustan läpi. [11] Nesteen kapillaarivirtaus mahdollistaa biokemiallisten reaktioiden tapahtumisen tietyssä järjestyksessä ja testin tuloksen voi nähdä nopeasti [12]. Immunokromatografisen testin toiminta on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Immunokromatografisen lateraalivirtaustestin toiminta.

Menetelmässä muutama pisara tutkittavaa näytettä asetetaan näytealustalle (engl. *sample pad*), josta se kulkeutuu kapillaarivirtauksella konjugaattialustalle (engl. *conjugate pad*). Tälle alustalle on kerrostettu tutkittavaa antigeeniä vastaava vasta-aine. Immunometrisissä menetelmissä vasta-aine on leimattu joko kolloidisella kullalla, värillisellä lateksilla tai kolloidisella hiilellä. Jos tutkittava näyte sisältää määritettävää antigeeniä, tämä reagoi partikkelin pinnalla olevan vasta-aineen kanssa konjugaattialustalla. Antigenikompleksit kulkeutuvat muun nestemäisen näytteen mukana testivyöhykkeelle. Testivyöhykkeellä kehittyvä värillinen viiva, joka vahvistaa toivotun antigeenin läsnäolon. [11]

Testissä on partikkeleita ylimäärin, jolloin ne kaikki eivät sitoudu antigeeneihin, eivätkä testivyöhykkeelle. Vapaaksi jääneet partikkelit jatkavat testivyöhykkeeltä virtsanäytteen mukana kontrollivyöhykkeelle. Kontrollivyöhykkeellä toinen vasta-aine poimii nämä vapaaksi jääneet partikkelit, muodostaen toisen värillisen viivan eli kontrolliviivan. Kontrolliviivan tarkoituksena on kertoa, että testi on toiminut oikein ja siinä käytetyt vasta-aineet ovat käyttökelpoisia. Testin tulos ei ole luotettava, jos kontrolliviivaa ei muodostu. [12]

Näytteiden kulkeutuminen testialustan läpi on nopeaa. Mittaus kestää tyypillisesti 5–30 minuuttia mahdollistaen halutun merkkiaineen nopean havaitsemisen. Testiin riittää myös pieni näytetilavuus, sillä sen suorittamiseen tarvitaan vain muutama pisara virtsaa. Itse määritysalustat ovat myös pieniä, mikä mahdollistaa testin tekemisen erilaisissa ympäristöissä eikä välttämättä vaadi laboratoriota. [12]

3.1 NMP22 BladderChek

NMP22 BladderChek –pikatesti on *in vitro* -immunomääritys, joka mittaa kvalitatiivisesti virtsasta tuman matriisiproteiini 22 (engl. *Nuclear Matrix Protein 22, NMP22*). NMP22-proteiini on osa ydinmatriisiproteiinia (engl. *Nuclear mitotic apparatus protein, NuMA*), joka toimii solussa rakenteellisesti ytimen tukikehyksenä. NuMA:ssa on useita muitakin NMP-proteiineja. NMP22-proteiinia esiintyy kuitenkin kaikkien solutyypin ydinmatriiseissa ja sillä on merkittävä rooli tuman tehtävissä. NMP22 osallistuu DNA:n replikaatiossa kromatiinin jakautumiseen tytärsoluihin, sekä RNA:n transkriptioon sekä hormonien sitoutumiseen. [10]

NMP22-proteiini toimii myös virtsarakon syövän kasvainmarkerina. Sen pitoisuus on tyypillisesti virtsarakon syöpäsoluissa jopa 80-kertainen verrattuna terveisiin virtsarakon soluihin. [5] NMP22:ta vapautuu kasvainsolujen ytimistä apoptoosiin eli ohjelmoidun solukuoleman yhteydessä, jolloin se voidaan havaita virtsasta. Virtarakon syöpää sairastavilla virtsan NMP22:n pitoisuus voi olla jopa 25-kertainen verrattuna terveen henkilön virtsaan. NMP22 BladderChek -testillä voidaan havaita NMP22:n kohonnut pitoisuus jo taudin alkuvaiheessa. Tämä tekee testistä ihanteellisen merkkiaineen varhaiseen diagnosointiin ja seurantaan yhdessä tavanomaisten diagnostisten menetelmien kanssa. [10]

NMP22-määritys on ollut paljon tutkimuksen kohteena ja osoittanut lupaavia mahdollisuuksia toimia sytologian ja kystoskopian rinnalla virtsarakon syövän havaitsemisessa [7]. NMP22-pikatestissä käytetään muovipatruunaan koteloitua sivuvirtauksen immunokromatografista liuskaa, joka määrittää esiintyykö NMP22:ta virtsassa ja antaa absoluuttisen positiivisen tai negatiivisen testituloksen samalla tavalla kuin raskaustestissä. Määritys on POC-testi, joka antaa tuloksen 30 minuutissa. [10]

NMP22 BladderChek -testin vasta-aineet ovat monoklonaalisia. Monoklonaalisella vasta-aineella tarkoitetaan vasta-ainetta, joka on spesifinen yhden antigeenin tietylle epitopille. Tämä vasta-aine tunnistaa siis spesifisesti ainoastaan sitä vastaavan merkkiaineen eli tässä

tapauksessa NMP22-proteiinin. NMP22-vasta-aineet ovat kasvatettu kohdunkaulan syöpäsolusta uutettua NuMA:ta vastaan Feyn ja Penmanin menetelmällä. Testissä on kaksi erilaista vasta-ainetta. [13]

Määrittämisessä käsittelemätön virtsa lisätään näytealustalle. Jos virtsassa on NMP22-antigeeniä, se reagoi kolloidisella kullalla konjugoitujen partikkelien kanssa muodostaen immuunikompleksin. Reaktioseos virtaa kapillaarivirtauksen mukana alustaa pitkin, jossa on vasta-aineilla kerrostettuja vyöhykkeitä. Antigeenikompleksit jäävät kiinni testivyöhykkeellä ja muodostavat näkyvän testiviivan, jos virtsan NMP22-pitoisuus on koholla. Testivyöhykkeeseen kiinnittymättömät vapaat kultapartikkelit jatkavat kontrollivyöhykkeelle. Kontrollivyöhykkeellä on huokoiseen alustaan kerrostettuna goat-anti-mouse IgG-spesifistä vasta-ainetta. Tämä vangitsee vapaat kolloidisella kullalla konjugoidut vasta-aineet. Syntyy kontrolliviiva, joka varmistaa laitteen oikeintoimimisen riippumatta NMP22:n läsnäolosta tai puuttumisesta virtsassa. [10]

Wang *et. al.* vertailevat 19 eri tutkimusta, joissa on tutkittu NMP22 BladderChek -testin spesifisyyttä ja herkkyyttä. Tutkimuksien keskiarvona NMP22-testin herkkyys on 56 % (52–59 %) ja spesifisyys 88 % (87–89 %). Tällöin NMP22:n herkkyys ja spesifisyys vastaisivat melko lähelle sytologiaa. [14] Sytologian ja NMP22-testin herkkyyksiä ja spesifisyyksiä on vertailtu taulukossa 1.

3.2 BTA stat

Toinen immunokromatografiseen määrittämiseen perustuva pikatesti on BTA stat -pikatesti. BTA stat mittaa virtsasta virtsarakon kasvaintigeeniä BTA:ta (engl. *bladder tumor antigen*). [11] Tarkemmin sanottuna testi mittaa virtsasta kasvaintigeeni BTA:n komplementtitekijää H (CFH). CFH on 150 kDa:n suuruinen glykosyloitunut plasmaproteiini ja komplementin vaihtoehdoisen reitin estäjä. Komplementilla tarkoitetaan useasta proteiinista koostuvaa immuunipuolustuksen järjestelmää, jonka tehtävänä on tuhota vieraita soluja. CFH on yksi näistä komplementin proteiineista. [15]

CFH:n merkittävin tehtävä on toimia komplementin vaihtoehdoisen reitin aktivoitumisen säätelijänä. Tämä vaihtoehtoinen reitti varmistaa, että komplementtijärjestelmä suuntautuu patogeeneihin tai muihin vaarallisiin materiaaleihin. Tällöin komplementtitekijä tuhoaa sen tehtävän mukaisesti haitallisia soluja eikä vahingossa vahingoita isäntäsoluja. CFH sitoutuu

ihmisen omiin epiteeli- ja endoteelisoluihin suojaten niiden rakennetta. Se kiinnittyy myös syöpäsolujen pinnalle suojaten niitä, minkä takia ylimääräiset syöpäsolut eivät hajoa ja saavat kasvuedun. Syöpäkasvainten soluissa esiintyy runsaasti komplementtitekijä H:tä ja sitä erittyy myös virtsaan. [15]

BTA stat -testi on patruunanmuotoinen entsyymi-immunomääritys. Määrityksessä virtsan merkkiaine reagoi kolloidisella kullalla konjugoitujen vasta-aineiden kanssa. Kolloidisella kullalla konjugoituna vasta-aineena käytetään X52.1 nimistä vasta-ainetta. Testivyohykkeellä huokoisella alustalla on kerrostettuna X13.2 nimistä vasta-ainetta, joka vangitsee antigeenikompleksin. Vasta-aineet tuotetaan immunisoimalla hiirtä virtsarakon syöpä potilaan virtsasta osittain puhdistetulla antigeenillä. X52.1 kiinnittyy CFH:n kahdeksanteentoista domeeniin ja X13.2 kolmanteen domeeniin. [15]

Määrityksessä asetetaan viisi pisaraa tuoretta käsittelemätöntä tai aiemmin pakastettua virtsanäytettä immunokromatografisen määritysalustan näytealustalle. Virtsa sekoittuu kolloidiseen kultaan konjugoituneen X52.1-vasta-aineen kanssa. Jos virtsassa on CFH:ta, X52.1-vasta-aine ja CFH muodostavat antigeenikompleksin. Muodostunut seos virtaa kapillaarivirtauksen mukana kalvon läpi testivyohykkeelle. Testivyohykkeelle kerrostettu X13.2-vasta-aine vangitsee antigeenikompleksin ja testialustalle muodostuu näkyvä testiiviä. Värillinen viiva merkitsee positiivista testitulosta. Viivaa ei muodostu, jos CFH:ta ei ole virtsassa. Tulokset luetaan viiden minuutin kuluttua virtsan sijoittamisesta näytealustalle. [16]

Leyh *et al.* osoittivat, että BTA stat -testin herkkyys on merkittävästi suurempi kuin sytologian, erityisesti syövän alkuvaiheessa. BTA stat -testin yleinen herkkyys on 65 %. Sytologian yleinen herkkyys on taas 33 %. Sytologia on yhtä herkkä sekä jo aiemmin virtsarakon syöpää sairastaneilla potilailla että uusilla syöpäpotilailla. BTA statin herkkyys on taas suurempi uusien tapauksien kohdalla kuin jo aiemmin sairastaneiden. Uusilla tapauksilla herkkyys on 73 prosenttia, kun taas uusiutuvilla syöpäpotilailla herkkyys on 58 %. [16]

Sytologian spesifisyys on 99 %, kun taas BTA stat -testin spesifisyys on 64 %. Tämä johtuu siitä, että tutkimuksessa ei suljettu pois infekti- ja munuaiskivipotilaita. BTA stat antaa virheellisen positiivisen tuloksen osalle potilaista, jotka sairastavat muita virtsa- tai sukuelinsairauksia. [16]

BTA stat on herkkä ja nopea testi virtsarakon syövän diagnosointiin. Testi vaikuttaa olevan erityisen hyödyllinen alkuvaiheessa olevan virtsarakon syövän diagnosointiin. BTA stat -testi on huomattavasti herkempi kuin sytologia virtsarakon syövän havaitsemisessa. Suuremman

herkkyyden ansiosta se voisi korvata sytologian kystoskopian rinnalla käytettynä potilaiden diagnosoinnissa ja seurannassa. Alhaisen spesifisyyden vuoksi BTA stat -testiä ei kuitenkaan pitäisi käyttää ilman, että ensin suljetaan pois mahdolliset häiriötekijät, kuten infektiot, munuaissairaudet tai virtsateiden sairaudet. [16]

3.3 UBC Rapid -pikatesti

UBC Rapid -pikatesti perustuu immunokromatografiseen periaatteeseen ja on kahta eri tyyppiä. Ensimmäinen UBC Rapid -pikatesti on kvalitatiivinen immunokromatografinen lateraalivirtaus testi, joka perustuu visuaaliseen havainnointiin. Toinen on kvantitatiivinen testi, jota käytetään yhdessä fotometrisen lukijan kanssa. [17] Sekä kvantitatiivnen, että kvalitatiivinen UBC Rapid -testi mittaa sytokeratiini 8:n ja 18:n fragmenttien pitoisuuksia virtsasta.

Sytokeratiini 8:n ja 18:n fragmentit ovat aktiivisia kasvaimen invaasiossa eli syövän leviämässä terveeseen kudokseen. Tilanteissa, joissa solujen vaihtuvuus on suurta, kuten syövässä, sytokeratiinit vapautuvat epiteelisoluista ja ne voidaan havaita virtsasta.[3] Sytokeratiini 8:n ja 18:n tasot ovat alhaisempia matala-asteisissa (engl. *low-grade*) kasvaimissa ja hyvälaatuisissa urologisissa sairauksissa verrattuna pahanlaatuisiin kasvaimiin [5].

Sytokeratiinit ovat tärkeitä rakenneproteiineja muodostaen epiteelisolun välifilamenttien sytoplasmisen verkoston [18]. Tätä välifilamenttien sytoplasmista verkostoa esiintyy enemmän kasvaimissa kuin terveessä uroteelissä, mikä mahdollistaa kasvaimen paikantamisen [4]. Sytokeratiiniproteiinien ilmeneminen riippuu myös epiteelisolutyypistä ja sen erilaistumisasteesta, jonka takia ne ovat suurelta osin spesifisiä tietyille kudoksille ja elimille. Sytokeratiini fragmenttien määrä virtsassa on koholla virtsarakon syöpää sairastavilla jo taudin alkuvaiheessa. Tämän takia sytokeratiineja voidaan hyödyntää syövän varhaiseen havaitsemiseen ja sen alkulähteen tunnistamisessa. [18]

Kvalitatiivisen UBC Rapid -visuaalisella testillä havaitaan sytokeratiinien 8:n ja 18:n fragmentit kolloidisella kullalla leimatuilla monoklonaalisilla vasta-aineilla. Tulos saadaan 10 minuutissa ja voidaan lukea visuaalisesti. Tulos on absoluuttinen positiivinen tai negatiivinen. UBC Rapid -visuaalisentestin voi tehdä kuka tahansa jopa ilman koulutusta. [17]

Kvantitatiivinen UBC Rapid -testi on tehokas lääkärin vastaanotolla tehtävä POC-immunomääritys. Testi auttaa virtsarakon syövän diagnosoinnissa ja seurannassa yhdessä tavanomaisten diagnostisten menetelmien kanssa. Kvantitatiivisen UBC Rapid -pikatestin voi suorittaa helposti hoitaja tai teknikko. Testi vaatii vain vähäisen koulutuksella. UBC Rapidia

on käytettävä kvantitatiivisessa määrittämisessä yhdessä fotometrisen POC-lukulaitteen tai Concile Ω 100:n kanssa. UBC Rapid -analyysin havaitsemisalue on 5–300 $\mu\text{g/l}$. [17]

Kvantitatiivinen testi yhdistetään UBC Rapid -visuaaliseen testiin. Ensin virtsanäyte on analysoitu UBC Rapid -visuaalisella testillä ja tulos tarkastetaan 10 minuutin inkubaation jälkeen visuaalisesti. Silmämääräisen arvioinnin jälkeen testipatruuna analysoidaan kvantitatiivista analyysiä varten fotometrisellä laitteella, jolle asetetaan haluttu raja-arvo 5–300 $\mu\text{g/l}$ väliltä. Lukulaite valaisee testikentän tietyllä valon aallonpituudella, joka vähentää häiriötä analyysissä. Osa valosta heijastuu testiviivoista takaisin. Laitteen sisäänrakennettu varukseen kytketty laite-matriisianturi ottaa valokuvan heijastuneesta valosta. Laite analysoi viivojen voimakkuudet, jotka voidaan suhteuttaa sytokeratiinin pitoisuuksiin. [19]

UBC Rapid testissä mitattavat sytokeratiinitasot kertovat kasvaimen aktiivisuudesta. Sytokeratiini 8 ja 18 erittyy kasvaimesta enemmän kasvainsolujen jakautuessa. Tämä on tärkeä tieto kasvainten uusiutumisen ja leviämisenopeuden kannalta. Mitatut sytokeratiinitasot korreloivat kasvaimen vaiheen kanssa. Tämä eroaa monista muista kasvaintenmerkkiaineisiin perustuvista testeistä, sillä ne yleensä mittaavat vain kasvainten määrää ja suuruutta. UBC testillä on siten paremmat mahdollisuudet arvioida syövän etenemistä. [11]

Ecke et. al. todistavat UBC Rapid -pikatestillä tehdyllä mittauksella, että sytokeratiini tasot ovat merkittävästi koholla virtsarakon syöpää sairastavilla verrattuna kontrolliryhmään. Terveille henkilöille fotometrisen Concile Ω 100 -lukija antaa sytokeratiini pitoisuudeksi 7,7 $\mu\text{g/l}$. Keskiarvo sytokeratiini pitoisuus virtsarakon syöpää sairastavilla on 30,9 $\mu\text{g/l}$. Ei-lihasinvasiivisessa matala-asteisen syövän tapauksessa pitoisuudeksi saadaan 95,5 $\mu\text{g/l}$ ja lihainvasiivisella korkea-asteisella taas tulos on 66,9 $\mu\text{g/l}$. [4]

Samassa tutkimuksessa mitattiin UBC Rapid -pikatestin herkkyyttä ja spesifisyyttä. Spesifisyys on tutkimuksessa mitatuissa kaikissa kasvaintyypeissä sama 93,8 %. Paras herkkyys (75 %) saavutetaan ei-lihasinvasiivisten korkea-asteisten kasvainten havaitsemisessa. Myös lihainvasiivisen korkea-asteisen kasvaimilla on hyvä herkkyys (68 %). [4]

4. Testien vertailu

Ecke et al. vertailivat sytologian ja kaikkien käsiteltyjen pikatestien (UBC Rapid test, NMP22 BladderChek, BTA stat) herkkyyttä ja spesifisyyttä. Kaikissa tutkituissa pikatesteissä havaitaan virtsarakon syöpäpotilaiden virtsassa kohonneita patologiasia

merkkiainepitoisuuksia. Kohonneita pitoisuuksia ei havaittu kontrolliryhmän eli terveiden potilaiden virtsasta. [9]

Tutkimuksen kaikissa kasvain tapauksissa BTA stat ja UBC Rapid osoittavat suuremman lasketun herkkyuden verrattuna NMP22 BladderChek:iin. BTA statin herkkyys on 77 %. UBC Rapid puolikvantitatiivisen testin herkkyys on 72 % ja kvalitatiivisen testin 42 %. Samoissa tapauksissa NMP22:n herkkyys on vain 33 %. NMP22 spesifisyys 96 % on kuitenkin korkeampi kuin BTA:n 68 % tai UBC:n 79 %. UBC Rapid -visuaalisen testin spesifisyys 94 % ylsi lähes NMP22:n tasolle. [9]

Korkean asteen ei-lihasinvasiivisten kasvainten osalta korkeimmat herkkyudet lasketaan BTA stat- (83 %) ja UBC Rapid (85 %) -pikatesteille. Testien herkkyudet ovat paljon sytologian herkkyyttä (71 %) korkeampia. UBC Rapid -testin spesifisyys (79 %) korkean asteen ei-lihasinvasiivisissa tapauksissa saavutti myös lähes sytologian (84 %) spesifisyyden. NMP22 osoitti kuitenkin taas korkeimman spesifisyyden (96 %) korkean asteen ei-lihasinvasiivisissa tapauksissa. [9] Testien herkkyys- ja spesifisyys-vertaillaan taulukossa 2.

Taulukko 2. Pikatestien ja sytologian spesifisyydet ja herkkyudet kaikissa kasvain tapauksissa sekä korkea-asteisten ei-lihasinvasiivisten kasvaimien tapauksissa.

	Kaikki kasvain tyypit		Korkea-asteiset ei-lihasinvasiiviset	
	Herkkyys (%)	Spesifisyys (%)	Herkkyys (%)	Spesifisyys (%)
BTA stat	77	68	83	68
NMP22 BladderChek	33	96	50	96
UBC Rapid	72	79	85	79
UBC Rapid visual	47	94	63	94
Sytologia	56	84	71	84

5. Yhteenveto

Virtsapikatestit mittaavat erilaisia virtsaan liuenneita merkkiaineita. Ne ovat non-invasiivisia vieritestauksia, jotka ovat nopeita tehdä laboratorion ulkopuolella, eikä niiden käyttö välttämättä vaadi koulutettua henkilöä. Pikatesteillä pyritään syrjäyttämään tai edes merkittävästi vähentää vaativan ja invasiivisen kystoskopian tarvetta.

NMP22-testin herkkyys on hyvin alhainen ja spesifisyys korkea. Tämän takia NMP22 merkkianetta ei voida suositella korvaamaan kystoskopiaa. Myöskään NMP22:n ja sytologian yhdistelmä ei riitä korvaamaan kystoskopiaa, sillä ne eivät edes yhdessä kykene havaitsemaan kaikkia virtsarakon syöpä tapauksia. NMP22 ei sovellu ainakaan vielä rutiinikäyttöön virtsarakon syövän toteamisessa tai seurannassa. Se tarjoaa kuitenkin uusia mahdollisuuksia kystoskopian täydentämiseen. [10] [9]

BTA stat -testi on herkkä ja nopea. Testi on erityisen hyödyllinen alkuvaiheessa olevan syövän diagnosoinnissa. BTA stat on UBC Rapid -pikatestit tavoin osoittautunut myös hyödylliseksi ei-lihasinvasiivisten korkea-asteisten kasvainten havaitsemisessa. Suuren herkkyytensä ansiosta se on potentiaalinen menetelmä uusiutuneen virtsarakon syövän diagnosointiin ja voi mahdollisesti korvata sytologia. BTA stat -testiä ei kuitenkaan pitäisi käyttää ilman, että ensin suljetaan pois mahdolliset häiriötekijät, kuten infektiot, munuaissairaudet tai virtsateiden sairaudet. [16] [9]

Kvantitatiivinen UBC Rapid -pikatesti toimii parhaiten ei-lihasinvasiivisten ja korkea-asteisten kasvainten havaitsemiseen. Korkea-asteisia kasvaimia on vaikea havaita kystoskopiolla. Näin ollen UBC Rapid -pikatestillä on potentiaalia olla herkempi ja spesifisempi menetelmä tunnistamaan korkea-asteisen kasvaimen omaavat potilaat kuin kystoskopiolla. UBC Rapid olisi hyödyllinen lisä virtsarakon syövän diagnosointiin, vaikka se ei vielä täysin korvaa kystoskopiaa. [4]

Pikatestien herkkyydet ovat yleensä korkeammat kuin pelkän sytologian, mutta suurimmassa osassa tapauksia niiden spesifisyys on alhaisempi. Kaikkien pikatestien suurin rajoitus spesifisyydessä on niiden suhteellisen korkea väärin positiivisten testien määrä. Virheelliset testitulokset johtuvat muiden sairauksien, kuten infektioiden, diabeteksen tai virtsakovien, aiheuttamasta häiriöstä. Sytologiaan yhdistettynä pikatestien spesifisyys lähestyy sataa prosenttia. Pikatestit eivät siis täysin korvaa sytologiaa, mutta voivat olla arvokas lisä sytologian rinnalla.

Pikatesti eivät vielä täysin korvaa nykyisiä virtsarakon syövän diagnosointi menetelmiä. Niillä on kuitenkin potentiaalia täydentää käytössä olevien menetelmiä ja helpottaa syövän seulontaa ja seuranta.

Lähteet

- [1] A. Richters, K. K. H. Aben, and L. Kiemeny, “The global burden of urinary bladder cancer: an update,” *World J Urol*, vol. 38, no. 8, pp. 1895–1904, 2020, doi: 10.1007/s00345-019-02984-4.
- [2] C. Mian, M. Lodde, A. Haitel, E. Egarter Vigl, M. Marberger, and A. Pycha, “Comparison of two qualitative assays, the UBC rapid test and the BTA stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder,” *Urology*, vol. 56, no. 2, pp. 228–231, 2000, doi: DOI: 10.1016/S0090-4295(00)00664-6.
- [3] V. Barak, D. Itzkovich, R. Einarsson, O. Gofrit, and D. Pode, “Non-invasive Detection of Bladder Cancer by UBC Rapid Test, Ultrasonography and Cytology,” *Anticancer Res*, vol. 40, no. 7, pp. 3967–3972, 2020, doi: 10.21873/anticanres.14389.
- [4] T. H. Ecke *et al.*, “UBC rapid test-A urinary point-of-care (POC) assay for diagnosis of bladder cancer with a focus on non-muscle invasive high-grade tumors: Results of a multicenter-study,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 12, 2018, doi: DOI: 10.3390/ijms19123841.
- [5] T. H. Ecke *et al.*, “Luminophore Chemistry for Detection of Urinary Bladder Cancer - Comparison to Cytology and Urinary Rapid Tests (BTA stat, NMP22 BladderChek and UBC Rapid Test),” *Anticancer Res*, vol. 42, no. 11, pp. 5249–5256, 2022, doi: DOI: 10.21873/anticanres.16031.
- [6] D. S. Kaufman, W. U. Shipley, and A. S. Feldman, “Bladder cancer,” *LANCET*, vol. 374, no. 9685, pp. 239–249, 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60491-8.
- [7] C. T. Nguyen and J. S. Jones, “Defining the role of NMP22 in bladder cancer surveillance,” *World J Urol*, vol. 26, no. 1, pp. 51–58, 2008, doi: DOI: 10.1007/s00345-007-0226-z.
- [8] W. Devlies *et al.*, “The Diagnostic Accuracy of Cystoscopy for Detecting Bladder Cancer in Adults Presenting with Haematuria: A Systematic Review from the European Association of Urology Guidelines Office,” *Eur Urol Focus*, vol. 10, no. 1, 2024, doi: 10.1016/j.euf.2023.08.002.
- [9] T. H. Ecke *et al.*, “BTA stat, NMP22 BladderChek, UBC Rapid Test, and CancerCheck UBC rapid VISUAL as urinary marker for bladder cancer: Final results of a German multicenter study,” *Urol Oncol*, vol. 41, no. 12, pp. 17-26,484, 2023, doi: DOI: 10.1016/j.urolonc.2023.06.013.
- [10] A. Kumar, R. Kumar, and N. P. Gupta, “Comparison of NMP22 BladderChek test and urine cytology for the detection of recurrent bladder cancer,” *Jpn J Clin Oncol*, vol. 36, no. 3, pp. 172–175, 2006, doi: DOI: 10.1093/jjco/hyi244.
- [11] H. H. Sunwoo and M. R. Suresh, “Cancer Markers,” *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, pp. 833–856, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-08-097037-0.00067-1.

- [12] J. Omersel, M. Gobec, and B. Božič, “Chromatography | Electrophoresis: Affinity separation techniques,” *Encyclopedia of Analytical Science*, pp. 62–70, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14118-6.
- [13] Fey and Penman, “Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, no. 1, pp. 121–125, 1988, doi: DOI: 10.1073/pnas.85.1.121.
- [14] Z. Wang *et al.*, “Evaluation of the NMP22 BladderChek test for detecting bladder cancer: A systematic review and meta-analysis,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 59, pp. 100648–100656, 2017, doi: DOI: 10.18632/oncotarget.22065.
- [15] Z.-Z. Cheng *et al.*, “Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer,” *Clin Chem*, vol. 51, no. 5, pp. 856–863, 2005, doi: DOI: 10.1373/clinchem.2004.042192.
- [16] Leyh *et al.*, “Comparison of the BTA stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer,” *Eur Urol*, vol. 35, no. 1, pp. 52–56, 1999, doi: DOI: 10.1159/000019819.
- [17] Z. Zang, N. R. Kesavan, and K. Esuvaranathan, “UBCRapid Is Sensitive in Detecting High-Grade Bladder Urothelial Carcinoma and Carcinoma in situ in Asian Population,” *Urol Int*, vol. 107, no. 1, pp. 29–34, 2023, doi: DOI: 10.1159/000526763.
- [18] Y.-R. Weng, Y. Cui, and J.-Y. Fang, “Biological functions of cytokeratin 18 in cancer,” *Molecular Cancer Research*, vol. 10, no. 4, pp. 485–493, 2012, doi: DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0222.
- [19] T. H. Ecke *et al.*, “UBC rapid test for detection of carcinoma in situ for bladder cancer,” *Tumor Biology*, vol. 39, no. 5, 2017, doi: DOI: 10.1177/1010428317701624.