

## Le tipizzazioni linfocitarie: osservazioni sulla scelta degli antigeni e sulle caratteristiche del referto nelle malattie linfoproliferative B

P. Bulian<sup>1</sup>, M. Buttarello<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Pordenone

<sup>2</sup>Dipartimento interaziendale di Medicina di Laboratorio, Padova

Nell'ambito delle tipizzazioni linfocitarie (o più generalmente dell'immunofenotipo) il tema dell'appropriatezza diagnostica può essere applicato a diversi aspetti, come avviene per ogni esame di laboratorio. Si è scelto di considerare in particolare l'appropriatezza nelle richieste, nella scelta degli antigeni da studiare, nell'espressione dei risultati e nel referto. È opportuno distinguere prima di tutto tra le applicazioni non diagnostiche e quelle propriamente diagnostiche, che sono essenzialmente due: la diagnostica emato-oncologica e la diagnostica delle immunodeficienze. Esistono molte applicazioni sperimentali che studiano l'espressione di particolari antigeni prevalentemente a fini di ricerca di base o clinica che non sono oggetto della presente rassegna. Non sarà trattata la diagnostica delle immunodeficienze e, data l'ampiezza dell'argomento, ci si limiterà a discutere la diagnostica emato-oncologica relativa alle malattie linfoproliferative croniche B. Queste ultime com'è noto sono quelle di più frequente riscontro nell'attività routinaria dell'ematologia di laboratorio.

### L'appropriatezza nelle richieste

Nell'ambito qui considerato la valutazione della appropriatezza della richiesta dipende dalle ricadute terapeutiche conseguenti alle informazioni fornite. Le informazioni possono essere di tipo diagnostico, prognostico o di malattia minima residua. L'importanza terapeutica di queste può essere diversa sia per il tipo di informazione che per le diverse forme di malattia perciò è difficile dare una risposta univoca. La diagnosi corretta è alla base delle scelte terapeutiche ed in questo ambito l'immunofenotipo trova sicuramente una importante applicazione, ma va ricordato che esso è spesso utilizzato insieme alla cito e/o istomorfologia e talvolta alla biologia molecolare e che tutto questo va sempre ad integrarsi con la valutazione clinica. In genere la diagnosi viene definita da più informazioni; porre una diagnosi

esclusivamente sulla base dell'immunofenotipo è teoricamente possibile in certi casi, ma di solito ciò non accade. In letteratura questo argomento è stato affrontato nella US-Canadian Consensus<sup>1</sup>, dalla quale si richiamano queste due particolari conclusioni:

- 1) l'utilizzo ottimale dei dati dell'immunofenotipo deve integrare i dati clinici, morfologici o di altro tipo;
- 2) l'immunofenotipo non è consigliato come test di screening per malattie linfoproliferative in assenza di linfocitosi assoluta o di popolazioni linfocitarie morfologicamente anomale o di splenomegalia.

Su queste basi è possibile affermare che l'esecuzione della tipizzazione linfocitaria è appropriata quando esistono segni/sintomi clinici e/o dati di laboratorio compatibili con il sospetto di malattia linfoproliferativa (MLP); in questo caso è giustificato verificare se esiste una malattia che coinvolge il sangue periferico o midollare o una massa (nodale, extranodale) o una cavità (versamenti). Questo può avvenire sia nella fase di prima diagnosi che nella stadiazione o nel follow-up. Per converso in assenza di una alterazione clinica e/o laboratoristica non è appropriato richiedere una tipizzazione linfocitaria. È quindi fondamentale per il medico di laboratorio disporre di informazioni sui precedenti esami emocromocitometrici; nei casi in cui la richiesta di immunofenotipo non sia accompagnata dall'esame emocromocitometrico ne è consigliabile l'esecuzione in ogni caso, completo di esame morfologico dello striscio periferico. Ciò permette di verificare l'appropriatezza della richiesta e di acquisire elementi utili alla scelta degli antigeni da studiare. Le informazioni cliniche dovrebbero essere segnalate sull'impegnativa del medico prescrittore, o in moduli predisposti dal laboratorio stesso; se mancano queste informazioni è opportuno contattare il medico di base o lo specialista prescrittore. In alternativa può essere utile la raccolta dell'anamnesi al momento del prelievo, cosa che per essere realmente efficace dovrebbe essere fatta dallo stesso medico di laboratorio che ha la responsabilità della refertazione dell'esame, il che non è sempre possibile per ovvi motivi organizzativi.

### L'appropriatezza nella scelta degli antigeni da studiare

L'approccio è differente a seconda delle finalità: per esempio se si tratta di monitorare la malattia minima residua (MMR) è importante ottenere un quadro completo del fenotipo all'esordio della malattia, ciò che è anche chiamato "fingerprinting", grazie al quale aumentare la sensibilità nella ricerca della MMR. Le alterazioni immunofenotipiche che identificano una cellula anomala nel caso più fortunato sono di tipo qualitativo specifico (presenza o assenza di un certo antigene), ma altre volte sono solamente quantitative, non specifiche (alterata intensità di espressione), e spesso possono essere apprezzate solo in combinazioni multiparametriche. Si rende necessario utilizzare pannelli molto ampi e ridondanti, ma ciò è importante solo se la rivelazione precoce di MMR ha un valore terapeutico. Nell'ambito diagnostico, per quanto riguarda le malattie linfoproliferative croniche B, si deve distinguere tra ciò che ha il consenso unanime degli esperti e le molte segnalazioni di letteratura o di singoli autori, che descrivono nuovi antigeni o l'espressione inattesa di antigeni già noti. Alcuni Gruppi o Società hanno pubblicato linee guida o "raccomandazioni" nell'ambito diagnostico qui considerato: sono state messe a confronto le indicazioni di 4 pubblicazioni: Working Group,<sup>2</sup> US-Canadian Consensus,<sup>3</sup> ISAC,<sup>4</sup> BCSH,<sup>5</sup> per individuare i punti comuni (Tabella I). Alcuni antigeni sono consigliati da tutti, per altri le opinioni sono differenti, altri ancora non sono mai citati. Sono citati almeno una volta 15 antigeni: CD5, CD10, CD11c, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD79b, CD103, FMC7, immunoglobuline di superficie (SIg) kappa, SIg lambda. Per tutti c'è consenso sull'uso di CD19, CD5, SIg kappa, SIg lambda. Sono segnalati da almeno due gruppi i marcatori

**Tabella I.** sintesi delle indicazioni comuni alle linee guida considerate (v. bibliografia). Gli antigeni da studiare in ogni caso sono contrassegnati da (+), quelli facoltativi o di seconda linea o a discrezione sono asteriscati (\*)

	(3)	(4)	(2)	(5)
CD19	+	+	+	+
SIg kappa	+	+	+	+
SIg lambda	+	+	+	+
CD5	+	+	+	+
CD20	+	+	+	
CD23	*	+	+	+
CD10	+	+	+	
CD45	+	+		
FMC7	*	*	+	+
CD22	*	*		+
CD79b		*		+
CD11c	*	*	+	*
CD103		*	+	*
CD38	*	*	+	*
CD25	*	*		*

CD20, CD23, CD10, CD45, FMC7. Sono segnalati prevalentemente come facoltativi o di seconda linea (nel senso che devono essere scelti a seconda del risultato fornito dal primo pannello) gli antigeni CD22, CD11c, CD38, CD103, CD25, CD79b. La scelta è anche influenzata dalla strategia diagnostica. Si presuppone che ad ogni richiesta di immunofenotipo, a prescindere dal sospetto di patologia linfoproliferativa, corrisponda sempre un pannello di base che, anche secondo le indicazioni NCCLS,<sup>6</sup> dovrebbe comprendere almeno i marcatori CD3, CD4, CD8, CD19, CD16 o CD56. Questo permette di orientare verso una patologia linfoproliferativa B, NK o T; è opinabile se il pannello di base possa essere omesso nel follow-up di patologie già note. Nei casi di nuova diagnosi successivamente al primo pannello e sulla base anche dell'esame morfologico si decide quali antigeni devono essere studiati. Secondo alcuni autori i marcatori necessari alla diagnosi di hairy cell leukemia (HCL), in particolare CD103 e CD25, si devono utilizzare solo in presenza di coerenti indicazioni morfologiche, ma non negli altri casi. Anche per gli altri antigeni si possono prevedere delle decisioni sequenziali basate per esempio sulla positività o negatività di CD5 o CD10. Questo tipo di approccio, che può essere riassunto in flow chart, è senza dubbio il più razionale ed economico, perché procede sempre con scelte appropriate in funzione dei dati clinici, morfologici e dei risultati (del pannello di base, o del primo pannello di approfondimento minimo o del secondo pannello integrativo, ecc.). Esiste tuttavia lo svantaggio di dover programmare più sedute analitiche per il singolo campione. Non sempre le risorse di personale e di tempo sono sufficienti: in certe condizioni può essere giustificato ricorrere a pannelli ampi, omnicomprensivi, adatti a tutte le patologie linfoproliferative croniche B ed eseguiti in unica seduta. Una volta individuati gli antigeni appropriati alla diagnosi è importante anche la scelta dei monoclonali, sia per quanto riguarda i cloni che per il tipo di coniugato fluorescente (Fitc, Pe, Pe-Cy5 ecc.). Nel guidare la scelta del clone e del coniugato si possono reperire utili informazioni in letteratura, altrimenti, prima di utilizzare nella propria attività diagnostica routinaria un nuovo reagente, è consigliabile eseguire prove in proprio su controlli positivi e negativi. Per alcuni antigeni (p.es. CD10, CD5) la reattività tra cloni e/o coniugati diversi è significativamente differente e ciò può giustificare la variabilità nelle percentuali di positività riportate in letteratura. In generale l'antigene ad espressione più debole od eterogenea dovrebbe essere analizzato con il coniugato più "brillante" (Pe). L'utilizzatore dovrebbe conoscere le caratteristiche (pattern) di espressione nelle cellule normali di un determinato antigene con un determinato coniugato (Working Group, BCSH, US-Canadian Consensus).<sup>2,5,7</sup> Per questo è importante osservare sempre con attenzione tutte le distribuzioni di fluorescenza. Oltre a creare un bagaglio di esperienza, la visualizzazione di queste ultime mediante istogrammi può facilitare il riconoscimento di ano-

malie che possono essere dovute a patologie, particolarmente in casi subdoli ove manchino alterazioni macroscopiche di altro tipo. Situazioni di questo genere accadono più frequentemente nelle malattie linfoproliferative croniche T, dove non esiste un test altrettanto efficiente e semplice come la valutazione della clonalità mediante analisi delle catene kappa/lambda. L'analisi delle distribuzioni di fluorescenza, in istogramma o anche nei consueti grafici biparametrici, è comunque importante in tutte le patologie. I fenotipi patologici infatti a volte non si differenziano da quelli fisiologici in termini di positività o negatività, ma per differenze di densità o di eterogeneità delle distribuzioni di fluorescenza, che vanno ad occupare posizioni differenti (rispetto alle cellule fisiologiche) nello "spazio" bidimensionale dei grafici.

### Appropriatezza nell'espressione dei risultati e nel referto

Un aspetto importante nell'espressione dei risultati è il criterio utilizzato per definire la positività per un dato antigene. Si deve premettere che, tra le diverse fonti citate in bibliografia, su questo non c'è accordo: alcuni liquidano la questione in maniera semplicistica e citano solo il criterio del controllo (Working Group):<sup>2</sup> si calcola la percentuale delle cellule della popolazione in esame che supera il livello di autofluorescenza e di legame aspecifico delle cellule di controllo. Altri pur riconoscendo l'assenza di un criterio standard, ricordano che è molto utilizzato il cut-off del 30% (rispetto al controllo) per dichiarare l'antigene positivo (BCSH).<sup>5</sup> A nostro giudizio in questo modo non si distingue tra la presenza di un sottoinsieme del 30% delle cellule che esprime l'antigene chiaramente (distribuzione bimodale) ed un antigene espresso debolmente da tutte le cellule (distribuzione unimodale), ma che determina uno scostamento dal controllo solamente nel 30% degli elementi. Il criterio della percentualizzazione rispetto al controllo è perciò ampiamente criticato da altri (US-Canadian Consensus, GIC):<sup>7,8</sup> è preferibile utilizzare termini qualitativi (positivo o negativo) ed evitare numeri. La quantificazione percentuale può essere utilizzata nel caso la popolazione di interesse sia chiaramente eterogenea, con distribuzione di fluorescenza bimodale, per cui solo una parte delle cellule esprime l'antigene (US-Canadian Consensus).<sup>7</sup> Essa è generalmente valida quando c'è una chiara distinzione tra elementi positivi e negativi nell'ambito della popolazione di interesse, come avviene per l'immunofenotipo di base delle cellule normali. Nella patologia si presentano spesso distribuzioni di fluorescenza molto variabili, la cui interpretazione richiede attiva partecipazione da parte di chi analizza i dati, rendendo necessari esperienza, giudizio critico e a volte arbitrarietà. Pertanto l'analisi e la refertazione dell'immunofenotipo delle malattie linfoproliferative non sono banali e dovrebbe-

ro essere eseguite da personale adeguatamente preparato ed informato.

L'importanza di segnalare anche le caratteristiche dell'intensità di espressione degli antigeni è riconosciuta ampiamente (Working Group, BCSH, US-Canadian Consensus).<sup>2,5,7</sup> Qui esiste un problema di standardizzazione: anche se è possibile calibrare le scale di misura della fluorescenza in unità standard di fluorescenza o di molecole legate, questa possibilità non viene di solito sfruttata e l'intensità è espressa in termini arbitrari. Tuttavia se questo viene fatto rapportandosi alla intensità dimostrata dalle cellule normali presenti nello stesso campione ciò è ritenuto valido (US-Canadian Consensus)<sup>7</sup> ed in effetti equivale ad una operazione di standardizzazione (interna). Questo approccio richiede esperienza e conoscenza della intensità di espressione normale dei diversi antigeni con i diversi coniugati, come già ricordato sopra. Recentemente il Gruppo Italiano di Citometria (GIC),<sup>8</sup> riferendosi tuttavia specificamente alle leucosi acute, ha proposto più semplicemente di visualizzare l'istogramma della distribuzione di fluorescenza e di definire a bassa intensità la fluorescenza che è difficilmente, ma chiaramente separabile dal controllo, a media intensità la fluorescenza separata ma contigua al controllo ed ad alta intensità la fluorescenza che ricade ad oltre due o tre decadi logaritmiche dal controllo. Quest'ultimo approccio può essere utile particolarmente quando manchi uno standard interno. Infatti non sempre le cellule normali residue sono presenti oppure non sempre gli antigeni di cui si vuole misurare l'intensità sono espressi nelle cellule normali. E' nostro parere che ove sia possibile scegliere, sia preferibile lo standard interno perché indipendente da effetti strumento dipendenti. Il metodo suggerito dal GIC ha il vantaggio di poter essere applicabile in ogni caso. Tuttavia è da notare che la definizione adottata di bassa intensità sottende un problema per il quale non sono fornite soluzioni: la discriminazione tra debole positivo e negativo. Definire una distribuzione di fluorescenza "difficilmente, ma chiaramente separabile da quella del controllo negativo" (GIC)<sup>8</sup> descrive una situazione ideale, nella realtà si verificano invece con frequenza situazioni in cui il "chiaramente separabile" non si verifica o dipende dall'esperienza e dal giudizio arbitrario che possono essere del tutto differenti tra operatori diversi. Il problema era già stato menzionato in precedenza (US-Canadian Consensus):<sup>7</sup> tra i possibili rimedi si citava il ricorso a particolari analisi matematiche delle distribuzioni, oppure l'utilizzo di amplificazione del segnale (utilizzando reagenti coniugati con fluorofori più brillanti) oppure l'uso di tecniche di blocco del segnale per dimostrarne la specificità. E' nostro parere che ove possibile sia da preferirsi l'uso di queste ultime tecniche analitiche, piuttosto che matematiche, nella conferma di un segnale di fluorescenza debole.

Un altro aspetto nell'espressione dei risultati è la identificazione e quantificazione della popolazione patologica. La quantificazione percentuale della po-

polazione patologica, se presente, dovrebbe comparire sempre nel referto (GIC, US-Canadian Consensus).<sup>8,9</sup> I risultati andrebbero riferiti a questa e dunque essa va identificata (gating) con opportune strategie la cui definizione non può essere univoca (GIC, US-Canadian Consensus).<sup>8,9</sup> L'uso dei soli parametri fisici non è sempre valido, in molti casi può essere utile predisporre le marcature in modo che un antigene B (p. es. CD19) sia presente in ogni combinazione: ciò consente di analizzare le distribuzioni di fluorescenza dei soli linfociti B così che i termini positivo/negativo siano correttamente riferiti alla popolazione di interesse.

Per quanto riguarda l'appropriatezza nella refertazione alcuni affermano che l'immunofenotipo di neoplasie ematologiche non è un esame semplice o standardizzato in grado di fornire risultati precisi, numerici, direttamente interpretabili dal clinico. La produzione del referto richiede notevole partecipazione e giudizio critico da parte del professionista di laboratorio, con integrazione di elementi clinici e di laboratorio (US-Canadian Consensus).<sup>9</sup> Questo concetto è sottolineato anche da altri (BCSH).<sup>5</sup> In particolare nella refertazione dovrebbero essere presenti alcuni elementi essenziali (US-Canadian Consensus)<sup>9</sup> e cioè: 1) la segnalazione di ogni popolazione patologica (alcuni consiglierebbero sempre la quantificazione percentuale); 2) la descrizione qualitativa dell'immunofenotipo patologico; 3) la diagnosi differenziale coerente con i dati immunofenotipici oppure una diagnosi definitiva se sono presenti elementi morfologici e clinici che la rendano possibile; 4) la proporzione delle cellule normali se non sono presenti popolazioni anomale. Il referto finale dovrebbe integrare i dati immunofenotipici con tutti gli altri dati disponibili, clinici e di laboratorio, e potrebbe eventualmente contenere elementi aggiuntivi come indicazioni ad analisi supplementari, grafici rappresentativi in casi selezionati, citazioni bibliografiche. Nelle linee guida proposte dal GIC<sup>8</sup> viene ribadito che l'immunofenotipo patologico deve essere descritto con semplici termini qualitativi, senza percentuali, sia per l'espressione degli antigeni che per la loro intensità di fluorescenza. Inoltre si raccomanda di esprimere una conclusione diagnostica in tutti i casi in cui sia possibile. Nel modello di referto proposto trova posto anche un grafico rappresentativo, anche se tra le 13 raccomandazioni presentate non vi è cenno alla necessità di includere grafici nel referto. Come già ricordato la possibilità di aggiungere grafici al referto è esplicitamente suggerita in altre linee guida (Working Group, US-Canadian Consensus).<sup>2,9</sup> Ciò può essere giustificato tenendo conto che le immagini strumentali sono molto simili a parità di marcatori indipendentemente dalla tecnologia utilizzata. Inoltre l'organizzazione lavorativa dei laboratori italiani può essere diversa da quelli americani o di altri stati europei. In questi ultimi è possibile che siano prodotti due referti: un referto di laboratorio ed un referto medico (Working Group).<sup>2</sup> Nel primo, ipotizzando che sia indirizzato al patologo clinico, dovrebbe

essere contenuti tutti i dettagli tecnici dell'analisi, compresi i grafici; nel secondo, che si suppone sia indirizzato al clinico o al medico curante, dovrebbero comparire tutti gli elementi utili raccomandati (GIC, US-Canadian Consensus)<sup>8,9</sup> ma non i grafici. Infatti in questo contesto essi nulla aggiungono per il clinico ad un referto dettagliatamente commentato. È nostra opinione che i grafici debbano essere conservati in un archivio elettronico nel laboratorio che ha eseguito la tipizzazione, consultabili a richiesta ed eventualmente confrontabili con precedenti nel contesto di database possibilmente completi di tutti gli elementi analitici, compresi esame emocromocitometrico ed eventuale morfologia.

## Bibliografia

1. Davis BH, Foucar K, Szczarkowski W, Ball E, Witzig T, Foon KA *et al.* US-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematological Neoplasia by Flow Cytometry: Medical indications. *Cytometry* 1997; 30:249-63.
2. Rothe G, Smith G, for the Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996; 10:877-95.
3. Stewart CC, Behm FG, Carey JL, Cornbleet J, Duque RE, Hydnall SD *et al.* US-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematological Neoplasia by Flow Cytometry: Selection of Antibody Combinations. *Cytometry* 1997; 30:231-35.
4. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal Number of Reagents Required To Evaluate Hematolymphoid Neoplasias: Results of an International Consensus Meeting. *Cytometry* 2001; 46:23-7.
5. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haemat* 2002; 24:1-13.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes; Approved Guideline. NCCLS document H42-A 1998.
7. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker JW, Picker L *et al.* US-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematological Neoplasia by Flow Cytometry: Data Analysis and Interpretation. *Cytometry* 1997; 30:236-44.
8. Del Vecchio L, Brando B, Lanza F, Ortolani C, Pizzolo G, Semenzato G *et al.* Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. *Haematologica* 2004; 89:83-7.
9. Braylan RC, Atwater SK, Diamond L, Hassett JM, Johnson M, Kidd P *et al.* US-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematological Neoplasia by Flow Cytometry: Data Reporting. *Cytometry* 1997; 30:245-248.