

La scelta di differenti cloni e fluorocromi influenza la sensibilità diagnostica? Analisi di dati VEQ di UKNEQAS

C. Feruglio^a, P. Bulian^b

^aSOC Analisi di Elezione, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario, Udine

^bOnco-Ematologia Clinico-Sperimentale, IRCCS CRO, Aviano (PN)

Riassunto

Lo specialista di laboratorio che utilizza la citofluorimetria nella diagnosi emato-oncologica trova oggi un'offerta sempre crescente di reagenti, con una vasta e non sempre agevole possibilità di scelta tra cloni e soprattutto tra fluorocromi differenti. Negli ultimi anni la complessità delle analisi multiparametriche è costantemente aumentata, da un lato per il progresso tecnologico nella produzione di laser a stato solido a basso costo, dall'altro per la diffusione di nuovi fluorocromi. Gli attuali citofluorimetri offrono la possibilità di rilevare contemporaneamente numerose emissioni di fluorescenza con lunghezza d'onda diversa, e questo ha fatto sì che oggi un anticorpo monoclonale di un determinato clone possa essere coniugato con un'ampia gamma di fluorocromi differenti. Oltre a ciò, relativamente ad un determinato CD ditte diverse producono cloni differenti che possono esibire comportamenti dissimili in vitro. Una conseguenza positiva dell'ampia scelta di cloni e traccianti fluorescenti è la possibilità di poter misurare ed analizzare con grande precisione numerosi antigeni contemporaneamente, rendendo possibili esperimenti ed analisi complesse come la valutazione di sottopopolazioni cellulari scarsamente rappresentate. Una conseguenza negativa è l'aumento della va-

riabilità analitica, nel senso che utilizzando cloni e fluorocromi diversi è possibile non ottenere gli stessi risultati, facendo sì che l'espressione di un determinato antigene sulla stessa cellula possa variare nell'ambito dello stesso laboratorio o in laboratori diversi in funzione della scelta del reagente. La possibilità che un simile problema si presenti nella pratica quotidiana è in genere sottovalutata. Grazie alla collaborazione e disponibilità di UKNEQAS, in particolare nella persona di Liam Withby, sono stati analizzati in dettaglio i dati relativi ad alcuni antigeni estratti da 12 esercizi di EQA del programma Leukemia Immunophenotyping, per un totale di 22 determinanti antigenici, 14 differenti e 8 replicati in esercizi diversi.

E' stata calcolata la percentuale di laboratori che hanno riportato un valore sopra la soglia decisionale (definito al 20% per le leucosi acute ed al 30% per le leucosi croniche, in accordo alle linee guida britanniche BCSH), per ciascuna combinazione di fluorocromo/produttore.

Si può concludere che a dispetto dell'uniformità di designazione in CD i reagenti non sono tutti uguali, ed un utilizzo che non tenga conto dell'esistenza ed entità di queste differenze può contribuire a conclusioni diagnostiche fuorvianti.

Summary

Does a different choice of clones and fluorochromes affect diagnostic sensitivity? An analysis of EQA data from UKNEQAS

Pathologists utilizing FACS for diagnostic purposes in hematooncology find a wide selection of reagents which make sometimes difficult to choose between different clones and fluorochromes. In the last few years complex

multiparameter analyses were made possible due to technological advancements such as the production of cheaper solid state laser sources and a wider panel of fluorochromes. Modern cytometers are able to detect at the same time many different wavelengths of fluorescent emission, and a monoclonal antibody of a given clone could be conjugated with several diverse fluorochromes. Moreover, for a given CD manufacturers usually produce distin-

ct clones that may behave in different way in vitro. This broad offer of clones and fluorochromes make possible to test with great precision several antigens at the same time, giving the chance to perform complex analysis such as the characterization of tiny cellular population in the peripheral blood and in the bone marrow. On the other hand diverse results for the same antigen analyzed in different laboratories or in the same laboratory at different times may be conditioned by the choice of the reagent. This pitfall is usually underestimated in everyday practice. With the precious collaboration of Liam Whitby from UKNEQAS we have been able to analyze data concerning 12 EQA exercises from the Leukemia Immunophenotypic Programme. In particular we examined 22 antigens, 14 diverse and 8 replicated in different EQA exercises. We calculated the percentage of laboratories reporting a positive result for a given antigen according to the British Committee for Standards in Haematology (BCSH) guidelines which set a threshold of positivity at 20 % of

the cells for acute leukemias and at 30 % of the cells for chronic leukemias. With regard to fluorochromes we found a better performance of the PE conjugate for eight antigens (CD1a, CD4, CD7, CD10, CD22, CD23, CD23, CD34 and CD79B) and of the FITC conjugate for the TdT, while no differences between FITC and PE reagents were noticed for CD13, CD20, CD33 and MPO. Concerning the clones we found out that for a given CD diverse reagents show a different behaviour. In particular TdT Dako, CD20 Becton Dickinson (BD), CD1a Dako, CD4 BD, CD22 BD and CD79b Beckman Coulter (BC) showed a better performance compared to the same products from other manufacturers. These data show that reagents do not behave in the same way despite a common CD clusterization and that their use without taking into account these differences may bring to misleading diagnosis.

Key-words: flow cytometry, fluorochrome, clone, external quality assessment, EQA.

Lo specialista di laboratorio che utilizza la citofluorimetria nella diagnosi emato-oncologica trova oggi un'offerta sempre crescente di reagenti, con una vasta e non sempre agevole possibilità di scelta tra cloni e soprattutto tra fluorocromi differenti. Negli ultimi anni la complessità delle analisi multiparametriche è costantemente aumentata, da un lato per il progresso tecnologico nella produzione di laser a stato solido a basso costo, dall'altro per la diffusione di nuovi fluorocromi. Gli attuali citofluorimetri offrono la possibilità di rilevare contemporaneamente numerose emissioni di fluorescenza con lunghezza d'onda diversa, e questo ha fatto sì che oggi un anticorpo monoclonale di un determinato clone possa essere coniugato con un'ampia gamma di fluorocromi differenti. Oltre a ciò, relativamente ad un determinato CD ditte diverse producono cloni differenti che possono esibire comportamenti dissimili in vitro. Una conseguenza positiva dell'ampia scelta di cloni e traccianti fluorescenti è la possibilità di poter misurare ed analizzare con grande precisione numerosi antigeni contemporaneamente, rendendo possibili esperimenti ed analisi complesse come la valutazione di sottopopolazioni cellulari scarsamente rappresentate. Una conseguenza negativa è l'aumento della variabilità analitica, nel senso che utilizzando cloni e fluorocromi diversi è possibile non ottenere gli stessi risultati, facendo sì che l'espressione di un determinato antigene sulla stessa cellula possa variare nell'ambito dello stesso laboratorio o in laboratori diversi in funzione della scelta del reagente. La possibilità che un simile problema si presenti nella pratica quotidiana è in genere sottovalutata.

Grazie alla collaborazione e disponibilità di UKNEQAS, in particolare nella persona di Liam Withby, sono stati analizzati in dettaglio i dati relativi a 22 antigeni, 14 differenti e 8 replicati in esercizi diversi. Sono stati scelti gli antigeni con la massima variabilità interlaboratorio, valutata dall'ampiezza dell'intervallo interquartile (Tab. I), riportato nel rapporto dei risultati di ogni esercizio (annate 2008 e 2009). Nelle Tabelle e nelle analisi globali sono stati usati tutti i

valori disponibili; per le analisi statistiche più complesse ci si è limitati ai fluorocromi FITC e PE, e al confronto tra i cloni delle ditte Becton Dickinson (BD, San Jose', CA, USA), Beckman Coulter (BC, Fullerton, CA, USA) e Dako (Glostrup, DK) per avere maggiore attendibilità e rilevanza statistica. Ove vi era sufficiente rappresentazione numerica è stato tenuto conto anche dei risultati di altri cloni o fluorocromi. Sono state ricercate differenze nell'espressione percentuale di ogni singolo antigene in due direzioni: a) in sottogruppi distinti per la scelta del fluorocromo; b) per la scelta della coppia clone-produttore. Sono state confrontate sia la percentuale di espressione media dell'antigene (analisi della varianza a due vie con confronti multipli, previa trasformazione in arcoseno), sia la percentuale dei laboratori che riportavano un valore di espressione sopra la soglia decisionale di positività, definita al 20% per le leucosi acute ed al 30% per le leucosi croniche in accordo alle linee guida britanniche BCSH. In quest'ultimo caso è stato usato il test di Fisher per analisi univariate e un modello lineare generale di tipo binomiale analogo alla analisi della varianza a due vie. In tutti i casi sono stati ricercati effetti di interazione tra fluorocromo e clone.

In un'analisi generale tra coniugati FITC e PE nell'81% dei casi è risultata una differenza significativa confrontando globalmente gli antigeni e nel 35% dei casi confrontando i cloni. Il fluorocromo PE è risultato il più utilizzato come si può osservare nella Tabella I. In generale, su un totale di 4746 marcature 45% sono PE, 40% FITC, 7% APC e 3% PE-Cy5, tutte le altre sono pari o inferiori ad 1%. Dei 14 antigeni oggetto di questo studio, 9 (CD1a, CD4, CD10, CD13, CD22, CD23, CD33, CD34, CD79b) sono utilizzati prevalentemente coniugati con PE, 5 (CD7, CD20, FMC7, MPO e TdT) prevalentemente coniugati con FITC. La scelta del produttore dell'anticorpo vede al primo posto la Becton Dickinson (49%), seguita da Beckman Coulter (22%), Dako (16%), Immunotech (Fullerton, CA, USA) (7%), Caltag (Carlsbad, CA, USA) (3%) Pharmingen (San Jose', CA, USA) (2%), altri (1%). La scelta del

Tabella I. Caratteristiche generali degli antigeni, reagenti e patologie.

Antigene	patologia*	coniugato FITC % (n)	coniugato PE % (n)	mediana#	IQR#	n
CD1a	T-ALL	31 (45)	59 (84)	60	42-72	143
CD4	T-ALL	31 (63)	40 (81)	26	3-46	202
CD7	AML	58 (125)	28 (60)	90	36-95	217
CD7	AML	60 (117)	34 (66)	76	49-88	193
CD7	AML con MDS	56 (111)	38 (76)	83	76-87	199
CD10	T-ALL	29 (59)	51 (104)	84	7-93	204
CD13	AML	11 (22)	84 (171)	41	17-80	203
CD20	LLC	42 (86)	25 (50)	60	21-93	204
CD20	LLC	39 (80)	25 (51)	74	30-90	206
CD22	LLC	35 (63)	50 (91)	68	6-94	183
CD22	LLC	34 (59)	51 (88)	41	2-90	173
CD22	LLC	30 (56)	52 (97)	81	30-93	187
CD22	MCL	32 (17)	51 (27)	87	37-95	53
CD23	MCL	17 (35)	72 (144)	29	14-42	201
CD33	AML M0	8 (15)	71 (139)	71	46-91	196
CD34	AML M0	14 (28)	57 (112)	72	46-89	195
CD79b	LLC	27 (60)	40 (88)	2	0-29	219
CD79b	LLC	42 (67)	54 (86)	4	0-81	160
CD79b	MCL	35 (59)	54 (93)	14	2-43	171
FMC7	B-PLL	98 (171)	2 (3)	2	0-31	174
MPO	AML M0	72 (130)	28 (50)	93	79-97	181
TdT	T-ALL	93 (163)	5 (9)	48	1-83	176

*diagnosi finale dell'esercizio (per consenso).

#percentuale di espressione dell'antigene IQR: range interquartile (primo-terzo quartile).

FITC è risultata preponderante per gli antigeni intracitoplasmatici MPO e TdT, rispettivamente usati con tale fluorocromo dal 72% e dal 95% dei laboratori. In questo caso la scelta del coniugato FITC può essere giustificata dalla nozione che la minor dimensione della fluorescina la rende teoricamente in grado di attraversare più facilmente le membrane cellulari permeabilizzate rispetto alla ficoeritrina.

Per quanto riguarda la MPO nell'esercizio 0804, un'AML con differenziazione minima, il 72% dei laboratori utilizza il coniugato FITC ottenendo un risultato positivo sopra la soglia decisionale nel 93% dei casi, mentre il 28% dei laboratori che utilizza il coniugato PE ottiene un risultato positivo nel 98% dei casi (Tab. I e II), valore addirittura superiore, anche se non significativamente. In questo caso dunque non sembrerebbero esserci differenze tra coniugati FITC e PE. In contrasto con la tendenza generale, la scelta prevalente è per il clone Dako (64% dei laboratori), seguito da BD (35%) e da BC (23%); il clone MPO7 della Dako determina la percentuale più alta di casi positivi, sia per il coniugato FITC che per il PE, tuttavia con differenze non statisticamente significative rispetto agli altri produttori.

Anche per la TdT (esercizio 09051, T-ALL) la scelta del clone rispetta lo stesso ordine visto per la MPO, con prevalenza di Dako (47%), seguita da BD (29%) e da BC (24%). In questo caso, diversamente che per la MPO, la percentuale di positività ottenuta globalmente con i coniugati FITC (65%) è nettamente superiore a quella dei coniugati PE (11%). Disaggregando i dati per produttore emerge una netta differenza (statisticamente significativa in tutte le

modalità di analisi) in favore del clone HT6 Dako FITC (81% di positività), molto superiore sia a BD FITC (44%) che a BC FITC (56%). I risultati relativi a questi due antigeni intracitoplasmatici mostrano che le differenze tra FITC e PE in un caso sono minime e nell'altro rilevante, inoltre tra i coniugati FITC di TdT c'è differenza tra i cloni, essendo il prodotto Dako senza dubbio il più efficiente, vuoi per una migliore affinità del clone che per una migliore coniugazione. Non è possibile distinguere tra i due effetti mancando un confronto attendibile con la versione PE essendo quest'ultima poco utilizzata. Infine non si può escludere che i migliori risultati ottenuti con la TdT FITC rispetto al PE possano anche essere influenzati dal fatto che questo antigene è intranucleare e pertanto l'anticorpo deve attraversare due membrane.

Il CD7 è stato analizzato negli esercizi 0801, 0804 e 0904, i primi due relativi a due AML con minima differenziazione, il terzo a un'AML con mielodisplasia. In tutti e tre i casi l'espressione del CD7 era evidente, con mediane rispettivamente del 90%, 76% e 83%. La scelta del fluorocromo è attorno al 60% per FITC e attorno al 30%-40% per PE. Il PE risulta significativamente più efficiente, con percentuali di positività media nei tre esercizi rispettivamente del 96%, contro 76% per FITC (Tab. II). La scelta del produttore segue la tendenza generale e non risultano differenze rilevanti tra i cloni.

Il CD20 è stato analizzato negli esercizi 0803 e 0901, relativi entrambi a LLC. Per questo antigene è massima la variabilità di scelta del fluorocromo, nel primo esercizio è stato utilizzato il CD20 FITC nel 47% dei casi ed a seguire

Tabella II. Cloni impiegati e confronto tra coniugati FITC e PE.

Antigene	clone			% di casi positivi*	
	Becton Dickinson	Beckman Coulter	Dako	FITC	PE
CD1a	SK9	T6	NA1/34	76	96
CD4	SK3	T4	MT310	25	70
CD7	MT701	3AE1E-12H7	CBC37 o DK24	76	97
CD10	HI10a	J5	SS2/36	24	91
CD13	L138	MY7	WM-47	64	72
CD20	L27	B1	B-Ly1	63	78
CD22	SHCL1	B3	4KB128	38	83
CD23	EBVC5-5	B6	MHM6	26	49
CD33	P67.6	MY9	WM-54	93	96
CD34	8G12	581# o QBEND10#	BIRMA-K3	68	94
CD79b	SN8	CB3-1	SN8	8	51
FMC7	FMC7	FMC7	FMC7	25	nd
MPO	5B8	CLB-MPO1	MPO7	93	98
TdT	E17-1519	HT1-4-8-9	HT6	65	11

*percentuale dei casi con espressione dell'antigene oltre il valore decisionale (20% per leucosi acute, 30% per leucosi croniche).

Immunotech.

PE 27%, APC 9%, PE-Cy5 8%, PerCP-Cy5 5%, PerCP 4%, ai quali corrispondono positività rispettivamente del 62%, 76%, 82%, 86%, 70%, 57%. Nel secondo esercizio i risultati sono sovrapponibili. Disaggregando i dati per clone si conferma che le differenze tra FITC e PE non sono significative. Al contrario si dimostrano significative le differenze tra produttori, con i risultati migliori per il clone BD L27 indipendentemente da fluorocromo FITC o PE, pertanto avvalorando l'ipotesi che la qualità del reagente sia dovuta proprio ad una maggiore affinità del clone.

Dato che l'antigene FMC7 è stato scelto come coniugato FITC dalla grande maggioranza dei laboratori (97%), si sono confrontati solamente i produttori. Visto che tutti utilizzano il clone FMC7, il confronto era interessante per rivelare eventuali differenze dovute esclusivamente al processo di coniugazione. Le percentuali di casi positivi sono rispettivamente del 25% (BD), 32% (BC), 17% (Dako) con differenze non significative. E' possibile che la debolissima espressione di FMC7 nel caso di LLC oggetto dell'esercizio 0805 (mediana globale 2%) abbia smussato le possibili differenze che sembravano essere presenti data la discreta dispersione dei risultati (range interquartile 0%-31%). Non si può escludere che tale variabilità possa essere imputabile più al posizionamento arbitrario della soglia di positività che a reali differenze tra i produttori.

I restanti 9 antigeni sono stati impiegati prevalentemente coniugati PE (Tab. I). Di questi CD1a, CD4 e CD10 sono stati analizzati nell'esercizio 09051, una T-ALL. CD1a PE ottiene in generale una positività nel 96% dei casi, mentre CD1a FITC nel 73%. Il clone NA1/34 (Dako) appare significativamente migliore del clone SK9 (BD), soprattutto coniugato FITC (rispettivamente 87% vs 57% di positività). Per CD4 la prevalenza di utilizzo del PE è minima (Tab. I), tuttavia con CD4 PE si ottiene una positività del 70% significativamente superiore al 25% ottenuto con CD4 FITC. Da segnalare la buona percentuale di positività dei coniugati APC (67%). L'analisi della varianza mostra la presenza di interazione significativa tra l'effetto del fluorocromo e del clone. Per i cloni BD e BC il coniugato PE è

nettamente più efficace del FITC (positività rispettivamente di 87% e 62% contro 14% e 28%), invece per Dako FITC (62%) e PE (50%) si equivalgono. Questo è un caso dove un clone apparentemente migliore di altri quando coniugato FITC, non guadagna sensibilità analitica quando coniugato PE. Il dato tuttavia è riferito ad un campione poco numeroso e andrebbe confermato su una casistica più ampia.

Anche per il CD10 la performance è nettamente migliore per il coniugato PE rispetto al FITC, con positività rispettivamente del 91% e 24%. Da segnalare il 95% di positività ottenuto con il CD10 APC (dati relativi a 19 laboratori). Inoltre non si evidenziano differenze significative tra cloni. CD13, CD33 e CD34 sono stati analizzati nell'esercizio 0804 (AML con differenziazione minima). Con CD13 e CD33 si raggiunge il massimo delle preferenze per il coniugato PE, rispettivamente dell'84% e 71% dei laboratori, mentre per CD34 si arriva al 57%. La preponderanza del PE per i due antigeni mieloidi è probabilmente influenzata dalle segnalazioni che in passato hanno mostrato una più elevata percentuale di casi di AML positive utilizzando questo fluorocromo. Sorprendentemente i dati di questo esercizio mostrano una differenza non significativa a livello globale, con 64% e 93% di casi positivi per CD13FITC e CD33 FITC e 72% e 96% per i corrispettivi PE (Tab. II). Particolarmente rilevante il caso del CD13 in cui l'antigene era espresso relativamente poco, con una mediana globale del 41%: una situazione che dovrebbe favorire l'evidenziazione delle differenze. Solamente disaggregando i dati e confrontando direttamente le espressioni percentuali si evidenzia una mediana significativamente superiore con il clone My7 PE di CD13 BC. Per CD34 risulta significativamente migliore il coniugato PE (94% di positività, rispetto a 68% del coniugato FITC), altrettanto efficiente il coniugato APC (97% di positività). Non emergono differenze significative tra i cloni. Il CD23 è stato analizzato nell'esercizio 0906, un linfoma mantellare. Netta la preferenza per il coniugato PE (72%), confermata dai risultati che vedono una percentuale di positività del 49%

del PE contro il 26% del FITC, mentre non emergono differenze tra i cloni. La mediana generale per l'esercizio era 29% tipica di un antigene espresso a bassa densità ed in modo eterogeneo. Pertanto al CD23 è stato assegnato un valore per consenso negativo, che probabilmente ha contribuito a orientare la valutazione diagnostica della maggioranza dei laboratori (53%) per un linfoma mantellare. Tuttavia il rapporto finale della classificazione diagnostica dell'esercizio 0906 riferisce che un'indagine su biopsia ossea eseguita successivamente definiva il caso una LLC. Questo caso testimonia come l'utilizzo del fluorocromo meno brillante per un antigene importante ai fini dell'identificazione della patologia, potrebbe aver contribuito a diminuire la sensibilità diagnostica: utilizzando il CD23PE la media per consenso sarebbe stata certamente positiva (>30%), favorendo una diagnosi corretta.

Il CD22 e il CD79b sono stati analizzati in 4 esercizi (3 LLC ed un linfoma mantellare). La scelta del fluorocromo PE è prevalente: attorno al 50%-52% per entrambi. Mediando tra i 4 esercizi si ottiene un 83% di casi positivi

con il CD22 PE contro un 38% con il CD22 FITC, in tutti i casi il clone SHCL1 PE BD determina le percentuali più alte con differenza statisticamente significativa in due esercizi, mentre il clone B3 PE BC risulta costantemente meno efficiente. Il CD22 APC BD ha un'efficienza pari al corrispettivo PE. Anche per il CD79b PE la differenza rispetto al CD79b FITC è netta e significativa (mediando nei 4 esercizi si ha 51% di casi positivi con PE e 8% con FITC). Il clone CB3-1 della BC ottiene sempre le percentuali più alte rispetto al clone SN8 di BD e Dako, in due esercizi con significatività statistica.

Si può concludere che a dispetto dell'uniformità di designazione in CD i reagenti non sono tutti uguali, ed un utilizzo che non tenga conto dell'esistenza e dell'entità di queste differenze può contribuire a conclusioni diagnostiche fuorvianti. Alternativamente è possibile tenersi al riparo da eventuali errori utilizzando una ridondanza di marcature per lo stesso antigene con fluorocromi e prodotti diversi nel contesto di un'analisi multiparametrica, strategia piuttosto costosa ed applicabile solamente in alcuni laboratori.