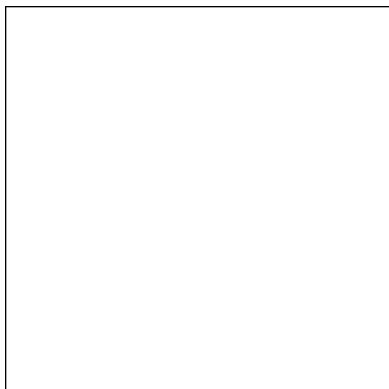


ISSN 0394 3291

# Caleidoscopio

*Italiano*



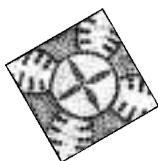
**Carla Valtriani**

**Carlo Hurle**

*in collaborazione con*

**Susanna Balagi**

**Alessandra Manzin**



## **Citofluorimetria a flusso:** **aspetti generali con riferimento particolare** **allo studio di alcune malattie ematologiche**



Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**



# 113

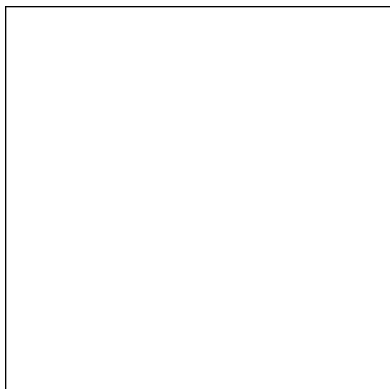
---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1997



# Caleidoscopio

*Italiano*



**Carla Valtriani**

**Carlo Hurle**

*in collaborazione con*

**Susanna Balagi**

**Alessandra Manzin**

*Ospedali Riuniti Livorno - Azienda USL 6 -*

*U.O. Immunologia-Allergologia Livorno*

*Viale Alfieri 36 - 57100 Livorno*

## **Citofluorimetria a flusso:**

**aspetti generali con riferimento particolare  
allo studio di alcune malattie ematologiche**



**113**

**Direttore Responsabile  
Sergio Rassu**

---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401

Stampato a Genova 1997

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

**Dott. Sergio Rassa  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari**

# Caleidoscopio

## Italiano

### Editoriale

*La citometria consiste nel conteggio di qualsiasi cellula, anche se prevalentemente si tratta di quelle del sangue, e la citometria a flusso è una tecnica per la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un veicolo fluido. Sotto alcuni aspetti i citometri a flusso possono essere considerati come dei microscopi a fluorescenza specializzati. I moderni citometri a flusso comprendono una fonte luminosa, un sistema ottico di rilevazione, una parte elettronica e un computer per tradurre i segnali in dati.*

*Nei moderni citometri la fonte luminosa è rappresentata da una luce laser che emette una luce costante ad una lunghezza d'onda precisa. Esistono parecchi tipi di laser che possono essere utilizzati nei citometri a flusso ma i più diffusi utilizzano lo ione argon ed il krypton.*

*Mentre, sino a qualche anno fa, con l'analisi biochimica classica, utilizzando estratti cellulari, si perdevano tutte le informazioni sulla distribuzione dei parametri o sulla associazione di un qualsiasi parametro con la singola cellula, con questo sistema le singole cellule passano singolarmente attraverso una fessura e vengono esposte alla luce o alla corrente elettrica. In base alle dimensioni ed alla granularità intracellulare o alla strutturazione delle cellule, si registreranno gli effetti sulla trasmissione elettrica, sull'assorbimento della luce, sulla fluorescenza e sulla riflessione. L'elaborazione di queste informazioni da parte di un computer, che analizza un numero elevato di cellule, permette di misurare cinque parametri di fluorescenza in base ai dati raccolti dai tubi fotomoltiplicatori. I più moderni fotomoltiplicatori sono capaci, inoltre, di ordinare le cellule in base alle proprietà desiderate basandosi sulla deflessione delle gocce che queste cellule contengono.*

*Lo studio della fisiologia e del comportamento delle cellule ha trovato quindi in questa tecnica un sostegno insostituibile. Infatti in pochi secondi è possibile analizzare da 10.000 a 20.000 cellule quantificando sino a sette parametri per ogni singola cellula.*

*Tra i parametri che possiamo analizzare troviamo il contenuto proteico e di DNA, il contenuto di RNA, l'immuno fluorescenza (utilizzando particolari anticorpi è possibile caratterizzare ad esempio i sottotipi di linfociti), gli organelli intracellulari e l'attività enzimatica quale quella della  $\alpha$ -galattosidasi, della glucosidasi, della glucuronidasi, delle esterasi e delle fosfatasi.*

*Come tradizione della collana, al cui successo hanno collaborato ormai quasi trecento autori delle più prestigiose scuole di medicina Italiani, ospitiamo autori che ci raccontano l'argomento come chi queste esperienze le vive in prima persona e quindi ne ha una conoscenza non superficiale ma profonda. Una conoscenza che ha radici profonde e permette agli autori con una semplicità che sarebbe altrimenti difficile da raggiungere.*

*La Prof.ssa Carla Valtriani, dopo essere stata dal 1969 Assistente Biologo presso il Centro Trasfusionale quindi Coadiutore Biologo (Aiuto) presso lo stesso Servizio e Responsabile della Sezione di Immunologia, dal 1989 ad oggi è Direttore delle U.O. di Immunologia/Allergologia. Inoltre è Prof.ssa Associata all'Università degli Studi di Pisa. Autrice di numerose pubblicazioni scientifiche colpisce immediatamente chi ha la fortuna di conoscerla per il suo sorriso aperto ed accattivante. Persona affidabile sa di essere ascoltata con stima ed attenzione.*

*La Prof.ssa Valtriani ha raggiunto i propri obiettivi per la capacità che ha di assumere la responsabilità delle proprie decisioni e per la naturale capacità di mediazione senza ricorrere ad imposizioni autoritarie cui rifugge in qualsiasi campo e cancellando dal proprio comportamento termini quali "arroganza, ottusità e vulgarità".*

*Persona equilibrata e con un profondo senso della giustizia non può essere che una persona "solare" cui piace anche la musica, il ballo e la gastronomia; capace anche di annullarsi per la propria famiglia, che è anche il suo "clan", ha tuttavia una innata curiosità per la conoscenza degli altri.*

*Il dottor Carlo Hurle, allievo della Prof.ssa Valtriani, ha lavorato in qualità di Tecnico di Laboratorio Biomedico presso il Laboratorio Centrale del Presidio Ospedaliero di Cecina e quindi presso il Centro Trasfusionale. Attualmente è Tecnico Coordinatore di Laboratorio della Unità Operativa di Immunologia - Allergologia.*

Sergio Rassi

## Cenni storici

La comparsa della citometria a flusso (CFM) avviene intorno alla fine degli anni sessanta (van Dilla 1969, Gohde 1971, Kamensky 1965) e determina un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche (87), dando così un impulso decisivo soprattutto agli studi sulla proliferazione cellulare (25).

Fin dall'inizio la CFM si prefigge lo scopo di misurare proprietà multiple di singole cellule ad una velocità così rapida da permettere una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa (22). Tuttavia se l'esigenza iniziale è stata quella di automatizzare l'analisi del DNA per estenderla ad un grandissimo numero di cellule rispetto alle tecniche tradizionali (fotometria, fluorimetria), in seguito l'applicazione migliore sarà quella sui campioni ematologici, che per la loro natura ben si prestano a questo tipo di indagine (23, 53).

Inizialmente la CFM era limitata alla misura di uno o due parametri: generalmente un parametro per la misura fisica del light-scattering e l'altro per fluorescenza. La strumentazione era caratterizzata da varie sorgenti di eccitazione. La tecnologia americana impiegava luce laser inizialmente ad ioni Argon e poi di vario tipo; quella tedesca era invece basata sulla evoluzione della microscopia a fluorescenza, con impiego quindi di sorgenti convenzionali. Usando questi primi strumenti equipaggiati con laser ad ioni Argon, fu perfezionato anche lo studio del sistema immune. Tipicamente gli immunologi si avvalsero di antisieri e anticorpi monoclonali (MoAb) marcati con isotiocianato di fluoresceina (FITC).

Risultò presto evidente che molti MoAb avevano reazioni sovrapposte con vari subsets cellulari. Questo aggiunto alla complessità del sistema immune, rivelata dall'uso di questi MoAb diretti contro antigeni (Ag) di superficie linfocitaria, stimolò sia lo sviluppo di MoAb sempre più specifici, sia la ricerca di nuovi coloranti fluorescenti e di tecniche per coniugarli a tali Ab, nonché di citometri a flusso multiparametrici più sensibili (24).

Il problema principale fu quello di trovare coloranti che potevano essere coniugati agli Ab senza che venisse modificata la loro capacità di legame e di selezionare fluorocromi con spettri distinti di emissione.

I primi sistemi in CFM a doppia fluorescenza impiegarono Ab coniugati con fluoresceina e rodamina, ma ne risultava una sovrapposizione spettrale considerevole. Il problema fu superato con la sintesi di derivati della rodamina, quali il Texas-red, colorante impiegato con successo in combinazione con il FITC, anche se erano necessarie due sorgenti di eccitazione, rispettivamente a 600 e 488 nm.

Un punto di svolta nella CFM fu lo sviluppo di coloranti quali le ficobiliproteine. Questi fluorocromi naturali sono solubili in acqua, sono fluorescen-

ti a pH neutro, facilmente coniugabili con MoAb ed hanno rese quantiche molto elevate. Uno di questi, la ficoeritrina (PE), viene eccitata dalla stessa lunghezza d'onda del FITC (488 nm), pertanto può essere usata insieme ad esso per realizzare un sistema di rilevazione molto sensibile e riproducibile in doppia marcatura.

La CFM raggiungerà il suo culmine di diffusione negli anni '80. Molti dei fattori limitanti la sua iniziale capillarizzazione sono da attribuire per primo ad un elevato costo e complessità strumentale, per secondo alla relativa difficoltà metodologica ad ottenere risultati di sufficiente qualità, come nel caso dei tessuti solidi per la determinazione del DNA. D'altra parte ricerche sia metodologiche che tecnologiche hanno consentito la soluzione di buona parte di questi problemi, rendendo disponibili commercialmente strumenti sempre più dedicati ad applicazioni specifiche con costi contenuti e prestazioni molto avanzate (23, 53).

A questo, attualmente, può aggiungersi la disponibilità di MoAb marcati con fluorocromi e diretti contro una larghissima varietà di Ag di membrana e/o intracellulari, che identificano la linea cellulare, la composizione in sottopopolazioni, il livello di differenziazione e le caratteristiche associate alla proliferazione, così come l'espressione di Ag aberranti, inclusi i prodotti virali, e degli oncogeni. Si può certa mente affermare che la CFM può oggi spaziare in diversi campi, dalla immunologia all'oncologia, dalla citogenetica alla botanica.

## Citometria

In relazione al metodo di preparazione dei campioni, che deve essere sempre in forma di sospensione cellulare monodispersa, si distingue in:

- 1) citometria a flusso
- 2) citometria statica o per immagine (ICM).

Nei citometri a flusso, sospensioni cellulari (come pure di nuclei, cromosomi ed altri materiali biologici) vengono iniettate in un filetto liquido, il quale tende, in condizioni idrodinamiche opportune a trasportare le cellule in maniera separata ed ordinata in un punto in cui arriva un fascio di luce focalizzata.

Al contrario per i citometri statici (analizzatori per immagine) l'elemento cellulare o il particolare elemento biologico viene prima visualizzato dall'operatore (generalmente tramite l'ausilio di un microscopio) e poi analizzato.

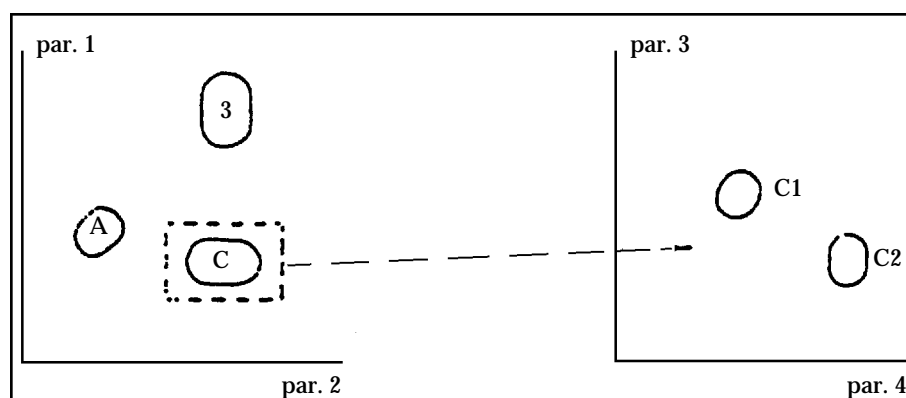
Per quanto riguarda sia la citometria a flusso che la statica, la finalità è quella di misurare parametri biofisici e biochimici per poi raccogliarli nella memoria di un microprocessore, rappresentarli graficamente mediante opportuni software e analizzarli con metodi statistici (92).



Con i moderni citometri a flusso per applicazioni clinico-laboratoristiche si possono misurare simultaneamente diverse proprietà cellulari, senza per questo dover ricorrere a strumenti con doppio /triplo raggio di eccitazione. L'analisi multiparametrica è uno dei più potenti aspetti di questa strumentazione necessaria per affrontare i problemi biologici della eterogeneità cellulare tramite due operazioni fondamentali: il gating ed il sorting (74). Il gating si usa per trarre pieno vantaggio dall'analisi a più dimensioni; ad es. una popolazione C (fig. 1) può in base a determinati parametri di tipo 12 (analisi bidimensionale) essere isolata con l'aiuto di una "finestra elettronica" e quindi permettere la misura di altri due parametri 34, che la suddividono ancora in altre popolazioni. Il cell-sorting, che è un gating fisico, consente invece di raccogliere fisicamente la popolazione C in una provetta separata. Nella ICM la componente strumentale dispone di unità del tipo di quella a flusso, senza dispositivi necessari a focalizzare oggetti in movimento. E' potenzialmente automatizzabile, per es. la ricerca di cromosomi in metafase. Mediante l'uso di coordinate cellulari è possibile eseguire misure multiple successive sulle stesse cellule, eventualmente trattate con metodiche diverse (25, 28). Si possono così ottenere dati autoradiografici tramite l'uso di precursori radioattivi e poi utilizzare la reazione di Feulgen per la colorazione specifica del DNA (87). In generale i diversi metodi microscopici sono ugualmente utilizzabili e intercambiabili in successione. Pertanto le informazioni che si otterranno potranno essere molto dettagliate in relazione alla concentrazione di alcune molecole e alla loro posizione spaziale.

Dunque con i citometri statici si possono acquisire parametri ad alta risoluzione, legati alla geometria, densitometria e struttura di unità e subunità cellulari.

Dall'indagine morfologica qualitativa si possono ottenere informazioni di valido aiuto nei casi di eterogeneità cellulare dei tumori, potendo discrimi-



**Figura 1. Esempio di analisi multiparametrica.**

nare cellule linfocitarie da cellule epiteliali, stromali, infiammatorie etc. E' chiaro che tutte queste informazioni non saranno in certi casi di immediato significato, per cui si richiederanno elaborazioni matematiche e statistiche. Questo oggi è possibile data la disponibilità di microcomputer ad elevata potenza di calcolo che permettono di sviluppare programmi di analisi molto complessi (70). Nella ICM l'immagine fornita da un microscopio ottico, eventualmente automatizzato nelle sue funzioni di focusing e movimento del carrello, viene inviata tramite telecamera a un convertitore analogico digitale, quindi a un computer che la visualizza su un monitor ad alta risoluzione con le relative elaborazioni. Per le sole misure di assorbimento si può impiegare una telecamera standard, mentre per le misure di fluorescenza sono necessarie telecamere ad alta sensibilità.

La citometria statistica è sicuramente destinata ad un notevole sviluppo, sia nel senso della elaborazione dei dati, sia per quanto riguarda il campo evolutivo della microscopia (m. a laser, a scansione etc.).

## Confronto fra CFM e ICM

Per confrontare i due tipi di citometria, consideriamo il semplice e comune esempio di cellule infiammatorie, stromali e tumorali presenti in un campione ottenuto da un tumore solido e preparato per una misura citometrica del DNA.

Mediante la ICM i linfociti o le cellule diverse da quelle tumorali possono essere facilmente riconosciute, morfologicamente, per l'interazione con un operatore. Questo risulta essere un problema seriamente limitante nella CFM, in quanto i parametri di morfologia FSC verso SSC sono a bassa risoluzione e non sempre consentono di separare cellule di isotipo diverso. Ciò comporta che i valori generalmente ottenuti per le cellule neoplastiche in fase S (a meno di una separazione preliminare di cellule tumorali da quelle stromali e infiammatorie) non siano corretti.

Un secondo esempio può riguardare l'analisi di cellule molto rare, che in CFM non sono separabili dal rumore di fondo, a causa del loro ridotto numero in confronto alla massività dell'analisi. Esse possono essere visualizzate e misurate correttamente in ICM. Le limitazioni all'impiego della CFM trovano anche altre giustificazioni, quali la necessità di dover lavorare con campioni in fase monodispersa e l'impossibilità di localizzare la sede di provenienza di un segnale, in caso di contemporanea presenza di marcatori nei diversi compartimenti cellulari.

Gli svantaggi della ICM consistono nei lunghi tempi di misura e nel ridotto numero di cellule esaminate e quindi in dati statisticamente meno affidabili (82). Tra i vantaggi della CFM sono da evidenziare: la possibilità di analisi

multiparametrica, l'elevato numero di cellule esaminate (oltre 50000), l'obiettività, la riproducibilità e l'affidabilità statistica delle letture, la rapidità dei tempi di analisi (oltre 1000 cell/sec), nonché la semplicità di processazione dei campioni da esaminare, evitando lunghe e complesse procedure di purificazione, senza per questo perdere la vitalità cellulare (cell-sorting).

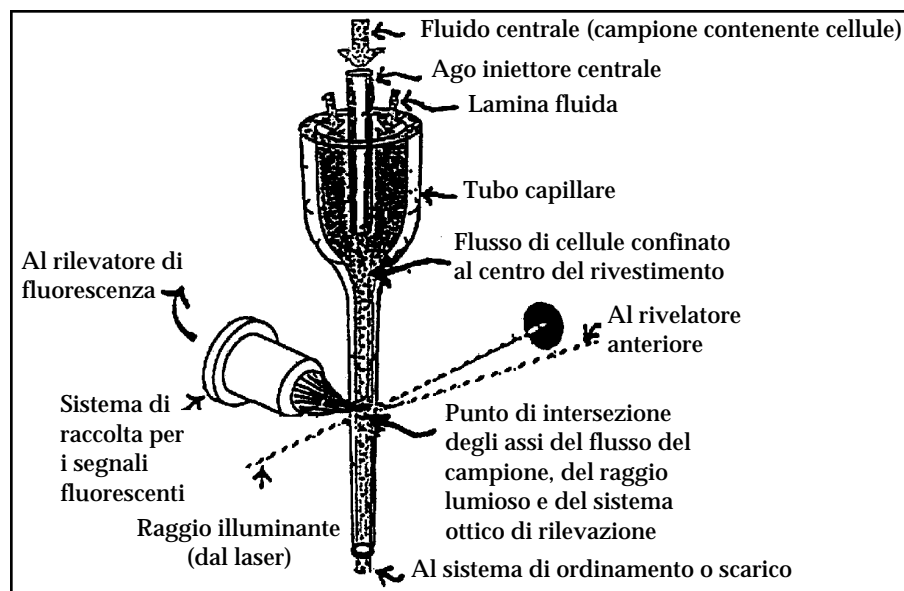
I citometri a flusso a raggio laser consentono inoltre misure molto sensibili dell'ordine di 300-400 molecole di fluoroforo/cell: ridurre la sensibilità è un evento possibile ma nello stesso tempo rischioso, perché può risultare poi difficile separare l'oggetto della misura da artefatti tecnici.

Questo non si verifica per la ICM in quanto è l'operatore che ha un controllo visivo su tutto quanto è misurato.

Si ricorda che i citometri per immagine a tecnologia avanzata hanno la possibilità di permettere la misura di circa 100 fluorofori, purché questi si trovino condensati in una nube tale da dare una sorgente puntiforme (2).

## I Citometri a flusso

Il principio di funzionamento di un citometro a flusso (fig. 2) può essere così riassunto: una sospensione cellulare monodispersa (cellule da sangue periferico, aspirato midollare, agoaspirati di diversa natura da tessuti solidi



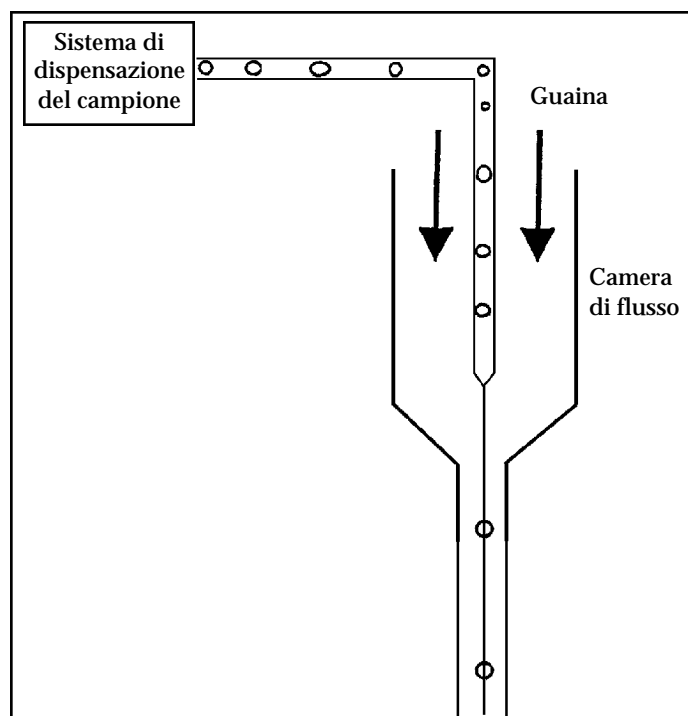
**Figura 2. Schema di un tipico citometro a flusso.**

dissociati), viene convogliata da un sistema fluidico di trasporto fino al punto di misura. Qui incontra un fascio luminoso focalizzato di alcune decine di micron, tramite l'ausilio di una lente proveniente da una sorgente di eccitazione. Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (stream) vengono generati segnali dall'incontro di ogni singola cellula. Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della particella (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di membrana), e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicari) che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, associati tra loro, sono inviati a un analizzatore/elaboratore di dati che provvede alla presentazione su un monitor dei medesimi e alla loro definizione statistica.

## Componenti di un citometro a flusso

### Il sistema fluidico

Nella sua forma più semplice un citometro a flusso è la combinazione di un sistema di dispensazione di un campione liquido con uno spettrofluorimetro ed un fotometro a light scatter. Partendo da un campione consistente in una sospensione cellulare (o di altre particelle) il sistema di dispensazione del campione liquido fornisce un mezzo conveniente ed efficiente per presentare individualmente le cellule del campione alla stazione di misura. La sospensione cellulare è trasportata dal sistema di distribuzione alla cella a flusso dove viene iniettata attraverso un piccolo ago. Nella fig. 3 viene mostrata schematicamente una camera di flusso di un citometro. In essa si realizzano alcune condizioni idrodinamiche necessarie per la misurazione. La focalizzazione idrodinamica consiste nel fare in modo che singole cellule attraversino il punto di intersezione con un raggio di luce, anch'esso focalizzato, mantenendosi allineate lungo l'asse di un filetto fluido di piccole dimensioni (100). In pratica, se il regime fluidico è di tipo laminare, si creano due flussi coassiali. Quello interno contiene le cellule (core flow) e quello esterno mantiene queste ultime lungo l'asse ideale di flusso (sheath fluid). Agendo sul sistema pneumatico di trasporto che controlla la differenza di pressione tra core flow e sheath fluid si regola la velocità di efflusso delle cellule (flow rate), normalmente valutata in numero di "eventi" al secondo, cioè numero di "particelle" che hanno incontrato lo spot luminoso nell'unità di tempo. E' logico pertanto evitare la formazione di aggregati di grosse dimensioni.



**Figura 3. Sistema di trasporto del fluido e camera di flusso.**

Essendo la camera di flusso di geometria variabile, ma di dimensioni ridotte (75-250 nm) c'è la necessità di filtrare i campioni al fine di evitare intasamenti dello strumento. Una pressione di spinta e una progressiva focalizzazione idrodinamica come suddetto, determinano una velocità di conta più o meno costante, che può essere regolata tra 200 e 2000 cell/sec.

Esistono numerose varianti di camere a flusso nel tipo e nella geometria, in relazione alle diverse esigenze di costruzione dei diversi apparecchi e ai vari tipi di illuminazione (laser o lampade). Tra le più semplici ci sono quelle coniche terminanti con un piccolo orifizio o "nozzle"; quelle a cuvetta di quarzo e quelle capillari. Per questa caratteristica si distinguono quindi citometri con fluidica a "circuitto chiuso" (solo analizzatori), nei quali il campione analizzato in cuvetta o in orifizi capillari viene perso, e strumenti a "circuitto aperto" (cell-sorters) nei quali il campione incontra il fascio di luce laser in aria, per poi essere recuperato in toto o selettivamente dopo cell sorting.

In relazione al sorting è necessario dire che esistono citometri in grado di separare fisicamente cellule omogenee da popolazioni eterogenee: per questo scopo, analogamente al gate, si stabiliscono delle finestre di selezione

che corrisponderanno alla popolazione da separare. Le cellule i cui parametri rientrano in tali finestre saranno separate e raccolte in provette distinte. Il principio di funzionamento in breve è il seguente: con l'ausilio di una vibrazione di frequenza opportuna, applicata nel "nozzle", si provoca la rottura del filetto fluido in minute goccioline le quali dovrebbero contenere una singola cellula. La gocciolina, contenente la cellula da separare, sarà dotata di carica positiva o negativa, in modo da poter essere deviata nella corrispondente provetta da un campo elettrostatico (74).

### Sorgenti luminose

Nei citometri con raggio laser, usati per indagini cliniche laboratoristiche, viene impiegata per la maggior parte dei casi una sorgente luminosa ad ioni Argon, di potenza variabile dai 15 m Watt a 5 Watt, centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Questo particolare consente una efficace misura dei parametri fisici, nonché una contemporanea eccitazione di differenti fluorocromi (fino a tre insieme). La sorgente ad ioni Argon ha un costo elevato, ma più contenuto rispetto ad altre forme di eccitazione laser, e permette inoltre l'emissione di un ridotto numero di lunghezze d'onda (514, 488 e 345 nm solo nelle versioni più potenti) (fig. 4). È chiaro quindi che qualora si vogliano utilizzare altre lunghezze d'onda occorrerà impiegare altri tipi di laser quali: Kriptone, Elio Neon, Elio Cadmio etc.; oppure combinazioni dei medesimi con lievitazione dei costi di produzione e gestione (96).

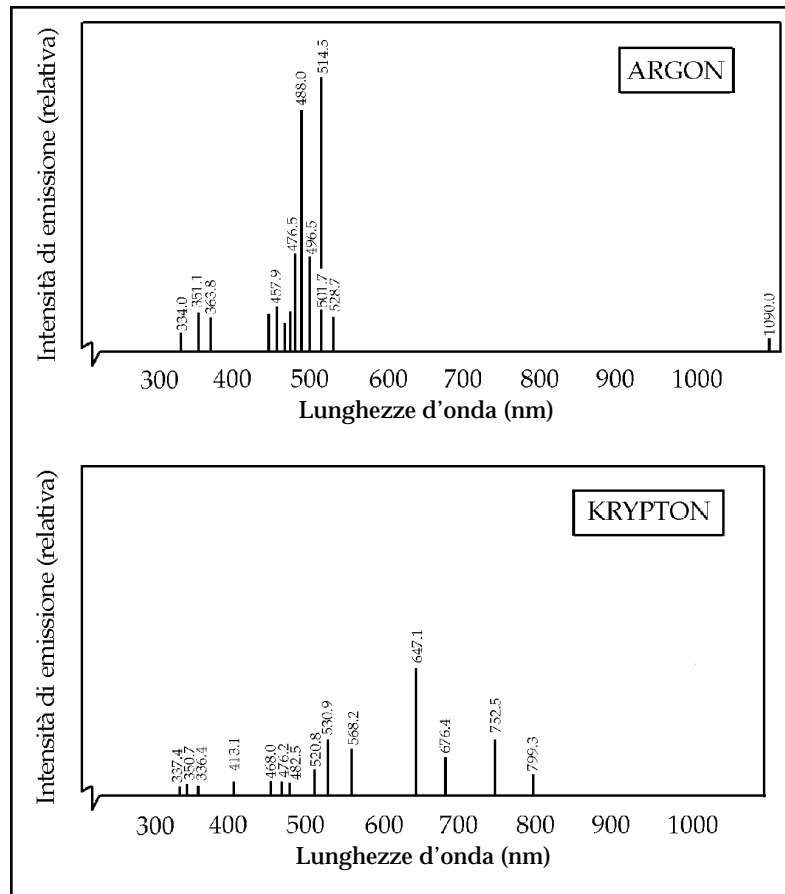
Un'alternativa più economica è costituita dall'uso dei citometri a lampada, che hanno come fonte di eccitazione una lampada a scarica a vapori di Mercurio o di Xenon, da 100 200 W di potenza; questi non necessitano di particolari sistemi di raffreddamento, permettendo la selezione di un notevole numero di lunghezze d'onda (da 345 nm all'infrarosso), utili per applicazioni di particolari fluorocromi. La lampada a vapori di Hg ha uno spettro di emissione a righe simile a quello ottenuto con l'impiego di un laser, con picchi di massima emissione caratteristici nell'UV, nel blu e nel verde; quella a vapori di Xenon invece ha come spettro di emissione una banda larga e continua (fig 5).

Si può capire quindi come il laser ad ioni Argon sia egregiamente utilizzato con riga di emissione a 488 nm, per applicazioni basate sull'impiego di fluorocromi quali il FITC in combinazione con PE.

Per le analisi sul DNA si può utilizzare l'una o l'altra fonte di eccitazione, potendo in questo caso la lampada a scarica eccitare tutti i fluorocromi utilizzabili per la marcatura citochimica del DNA.

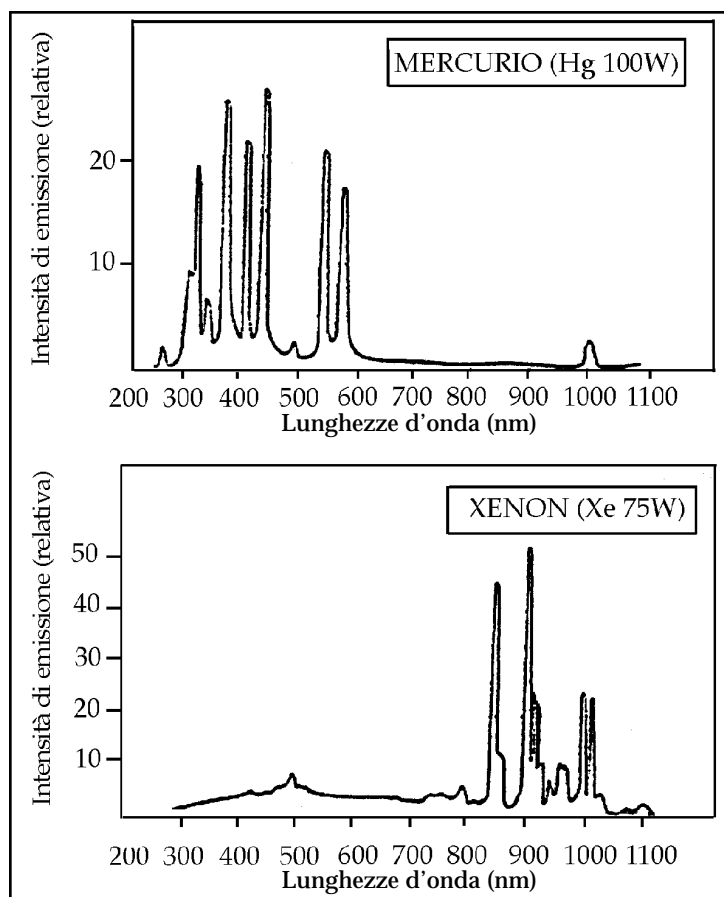
Ciò significa che per l'analisi del DNA, potrebbero essere utilizzati sistemi di CFM dal costo contenuto, con prestazioni di elevata sensibilità.

Tuttavia gli svantaggi derivanti dall'impiego delle lampade stanno nella



**Figura 4. Esempi di Spettri di emissione dei Laser.**

bassa potenza erogata dopo la selezione ottica della banda di colore desiderata, nella scarsa stabilità della luce di emissione, richiedente sistemi elettronici di compensazione, e nel suo rapido decadimento.



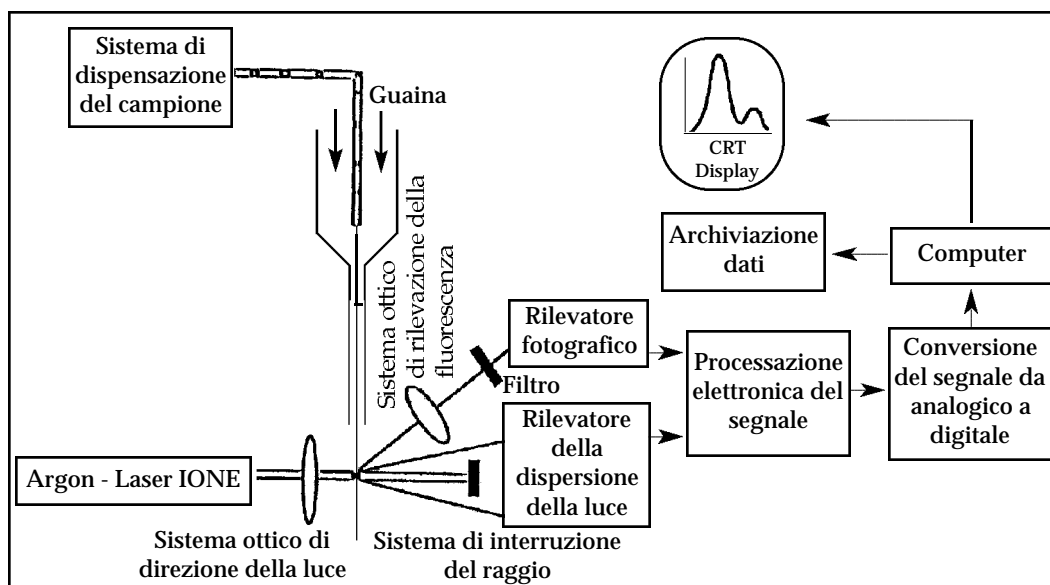
**Figura 5. Esempi di Spettri di emissione delle lampade.**

### Parametri fisici

La cellula, colpita dal fascio luminoso focalizzato, emette per prima cosa segnali di luce diffusa relativi alle sue caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni fisici di rifrazione, riflessione (side scatter) e diffrazione (forward scatter).

La geometria dell'unità ottica di raccolta dei segnali di fluorescenza e diffusione della luce scatterata, è profondamente influenzata dal tipo di sorgente luminosa utilizzata: nei citometri a raggio laser si utilizza una geometria "ortogonale" in quanto le direzioni del fascio di luce di eccitazione, del flusso cellulare (stream) e dell'asse ottico della lente di raccolta della fluorescenza sono mutualmente perpendicolari (fig 6). Il raggio laser, intercettando lo





**Figura 6. Componenti di un citometro a flusso.**

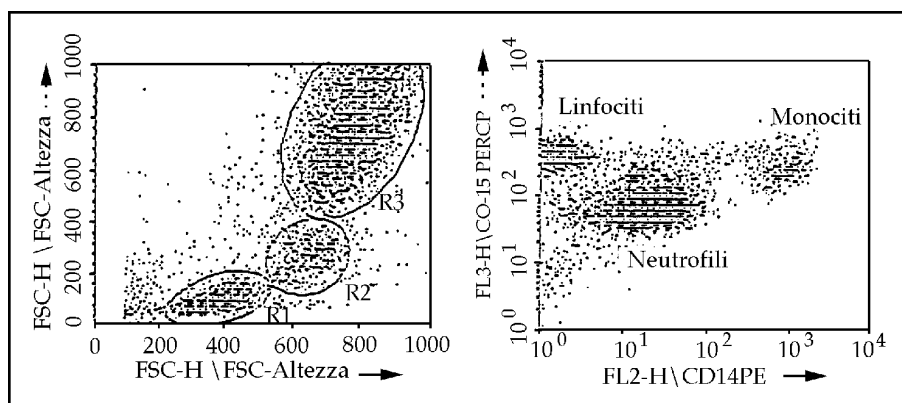
stream, fa sì che la maggior parte della luce incidente sia dispersa nel piano contenente il raggio di luce. Questa radiazione, che rappresenterebbe un disturbo per le misure, è di fatto bloccata da barrette di oscuramento.

La luce dispersa in avanti entro piccoli angoli (forward scatter), legata essenzialmente alla "grandezza" cellulare, è raccolta da un sensore chiamato fotodiodo e il suo contributo alla emissione di fluorescenza si può pensare trascurabile. La luce raccolta a  $90^\circ$  (side scatter) è invece dovuta sia a fenomeni di dispersione che alla emissione di fluorescenza dei fluorocromi legati all'unità cellulare e sue frazioni.

Il segnale correlato ai fenomeni di riflessione e rifrazione, è da attribuire a parametri di morfologia cellulare come: granulosità citoplasmatica, rapporto nucleocitoplasma, rugosità di superficie e diametro (side scatter o scatter a ampio angolo).

Questa luce, è sottoposta ad una analisi spettrale (separazione delle varie componenti a diversa lunghezza d'onda con l'ausilio di specchi diecrici e filtri ottici), quindi raccolta da fotomoltiplicatori, in quanto trattasi di emissioni molto meno intense rispetto al segnale di forward scatter.

Dalla combinazione dei due tipi di segnali si ottiene un particolare diagramma bidimensionale detto "citogramma", nel quale è possibile rilevare diverse popolazioni cellulari (fino a 4-5), in base alle sole loro caratteristiche fisiche (fig. 7).



**Figura 7. Esempi di Gate in Citogramma basato su parametri morfologici.**

### Segnali di fluorescenza e Compensazione

Mediante l'uso della CFM e della fluorescenza è possibile evidenziare diverse strutture cellulari.

Molte molecole a significato antigenico o recettoriale sulla membrana, nel citoplasma, nel nucleo, possono essere messe in evidenza con ligandi fluorescenti, antisieri policlonali o MoAb, prodotti quest'ultimi secondo la tecnica degli ibridomi, marcati con fluorocromi quali per es. il FITC, PE, TexasRed etc.

Altre sostanze, come il DNA, RNA, proteine, ioni citoplasmatici, organuli, possono venir colorati con fluorocromi che si legano ad esse in maniera stechiometrica.

Ogni fluoroforo presenta una caratteristica banda di lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione. La lunghezza d'onda della sorgente di eccitazione costituisce, perciò, un limite alla scelta dei fluorocromi da impiegare in singolo od in combinazione. In quest'ultimo caso si deve essere anche certi che le loro bande di emissione siano sufficientemente diverse tra loro, in modo da poter essere facilmente separate con filtri ottici e misurate ciascuna da un proprio fotomoltiplicatore.

I filtri ottici, in funzione delle loro caratteristiche, si possono classificare mediante dei numeri che ne indicano la lunghezza d'onda di taglio, nonché attraverso sigle che ne definiscono la capacità di eliminare o trasmettere specifiche bande di colore. Anche i fotomoltiplicatori hanno una loro banda ottimale di risposta (92).

Nonostante questo sofisticato sistema di selezione di lunghezze d'onda, può succedere che ad un dato PMT possa giungere una radiazione luminosa di non trascurabile intensità, di colore indesiderato a causa dell'eccessiva ampiezza di banda di emissione del fluorocromo usato e delle caratteristiche

dei filtri ottici. A tal problema si ovvia con un sistema di correzione elettronica dei segnali definito "Compensazione" (96,100).

Questo ha lo scopo di sottrarre elettronicamente dal canale rosso, (PE), una quota fissa di segnale relativo alla lettura parassita del verde (FITC), e viceversa. Pertanto "Compensazione" è uguale a sottrazione.

Allo scopo possiamo enunciare la regola delle 4 "F": la Compensazione deve essere fatta con strumento perfettamente allineato e rimane Fissa per quella data combinazione di Fluorocromi, per quel dato set di Filtri e per quella data regolazione dei Fotomoltiplicatori (verde e rosso per FITC e PE) (92).

Qualsiasi cambiamento di questi parametri richiede un aggiustamento della compensazione.

Infine è da sottolineare che esistono cellule od altri elementi non marcati con alcun fluorocromo, i quali presentano una debole ma misurabile fluorescenza di fondo: fenomeno definito "autofluorescenza". In caso di marcature che determinano debole intensità di colorazione, l'autofluorescenza costituisce il vero fattore limitante il potere risolutivo dello strumento.

### Rilevazione dei dati citometrici

I segnali inviati dai sensori, proporzionali in maniera continua alle dimensioni del parametro misurato, vengono trasformati dai PTM e fotodiodi in impulsi elettrici. Questi ultimi devono, a loro volta, essere amplificati in modo da avere massimi di picco di qualche Volt (generalmente tra 0 e 10 V) in forma lineare o logaritmica. Per i segnali di fluorescenza, che in alcune applicazioni possono variare in un campo di intensità molto ampio, è necessario disporre di preamplificatori logaritmici che consentono di esaltare segnali a bassa intensità e di comprimere quelli ad intensità elevata, permettendoci quindi di analizzare campi di variazione molto ampi senza pericolo di overflow. Gli impulsi amplificati sono tuttavia ancora inadatti per essere elaborati da un computer, essendo del tipo analogico, cioè varianti in maniera continua nel tempo: si rende così necessaria la loro conversione in segnali digitali, effettuata da un convertitore analogico digitale. Questa operazione considera il valore di picco, ovvero il massimo valore assunto dal segnale, corrispondente all'istante in cui la cellula si trova perfettamente centrata sul punto di osservazione e quindi completamente illuminata dalla luce di eccitazione.

La conversione analogicodigitale associerà così agli impulsi un numero prestabilito di valori discreti (compresi per es. tra 0 e 1023 in caso di conversione a 10 bit) a seconda del numero di canali di cui dispone. Ogni singolo valore parametrico, una volta amplificato e digitalizzato, costituisce un "quanto" citometrico, cioè un evento dell'esperimento condotto.

Quando i segnali superano i valori soglia impostati dall'operatore l'elettronica strumentale considera l'"evento" come realmente avvenuto. La visualiz-

zazione dei segnali è di solito effettuata tramite un oscilloscopio; dalla loro forma è possibile capire se il sistema ha problemi di funzionamento delle varie unità che lo compongono.

L'elaborazione dei dati, infine, è affidata a un computer detto "analizzatore multicanale" (M. C. A.) che provvede alla loro rappresentazione mono o multiparametrica in tempo reale su un display video.

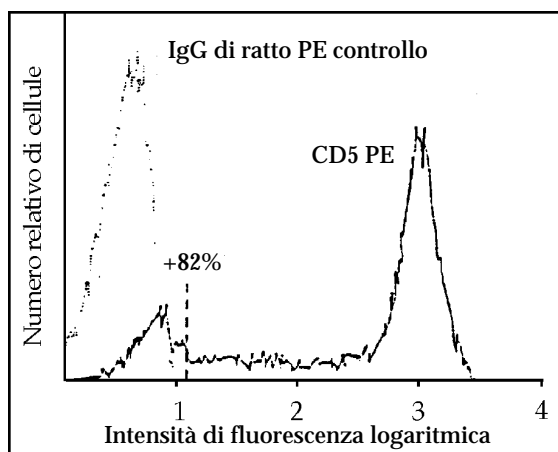
L'M. C. A. è collegato ad un computer general purpose che effettua la memorizzazione dei dati su supporti magnetici: nei citometri di ultima generazione tuttavia le funzioni dell'M. C. A. sono sostituite direttamente dal personal computer che svolge l'elaborazione dei dati in tempo reale.

### Rappresentazione dei dati

La rappresentazione più semplice di un dato citometrico è un istogramma in cui gli eventi accumulati nei vari canali danno un diagramma di distribuzione: l'ascissa riporta una scala discreta della grandezza misurata legata ai livelli (canali) forniti dal convertitore e l'ordinata il numero di cellule (eventi).

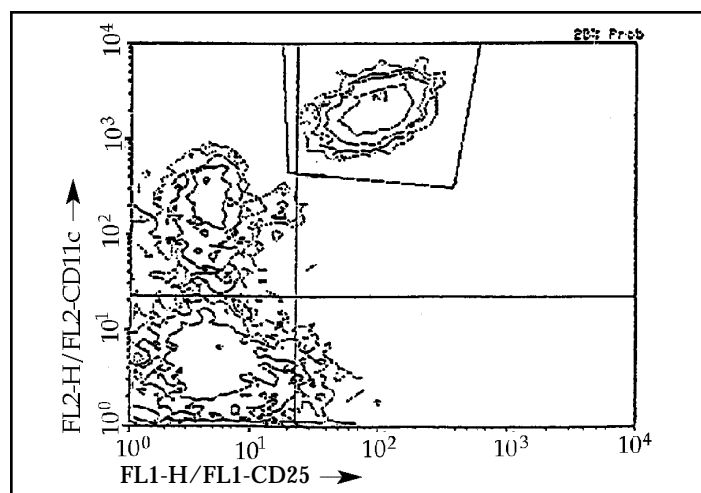
Solitamente è rappresentato l'involuppo della sommità degli istogrammi (fig. 8).

L'analisi statistica si basa sull'impostazione di un certo numero di cursori che delimitano aree di particolare interesse di indagine e sulla enumerazione degli eventi che cadono tra un cursore e l'altro. Di ogni picco o moda è possibile calcolare dati statistici come: valore medio, deviazione standard (SD), coefficiente di variazione (CV) e canale modale (75).



**Figura 8. Rappresentazione di un istogramma in analisi monoparametrica su un campione di sangue periferico analizzato con citofluorimetro FACScan.**

Altra rappresentazione è quella detta bidimensionale a parametri correlati, il cui diagramma definito "dot-plot" fa sì che un punto rappresenti un evento contato, dotato di un definito valore correlato ai parametri misurati. Il dot-plot però ha un limite rappresentativo dato dal fatto che, occupati tutti i punti disponibili di una certa area, l'arrivo di un nuovo evento non sarà in grado di produrre alcuna variazione visuale. Per ovviare a questo inconveniente sono stati sviluppati altri diagrammi capaci di dare maggiori informazioni: i contour-plot o diagrammi a contorni, rappresentanti un perfezionamento del dot-plot, poichè visualizzano aree aventi la stessa densità di probabilità mediante linee concentriche, paragonabili a quelle isoaltimetriche di mappe geografiche (fig. 9).



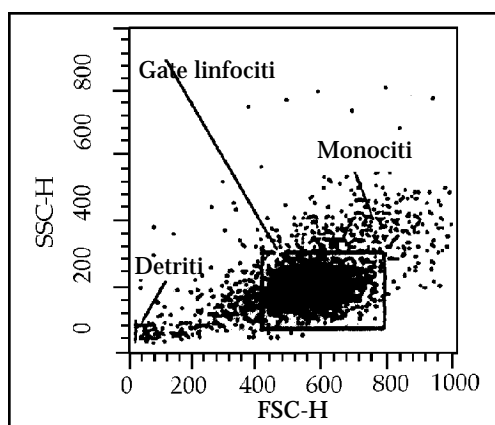
**Figura 9. Esempio di contour - Plot con Gate.**

Come si è detto una delle funzioni del computer è quella di permettere la memorizzazione permanente dei dati sui supporti magnetici: possono essere memorizzati i risultati finali delle misure, ovvero gli istogrammi visualizzati in tempo reale dal M. C. A., oppure si può procedere con l'acquisizione in list-mode. In questo caso per ogni singolo evento vengono memorizzati i valori assunti per ogni parametro, per cui è possibile ricostruire la misura in un secondo tempo, eventualmente applicando criteri selettivi dei dati come il gate, senza per questo perdere delle informazioni. L'acquisizione in list-mode comporta l'impiego di un maggior spazio di memoria disco.

## Gate

La selezione elettronica delle cellule da esaminare, gate, è una caratteristica molto importante dei citometri a flusso; permette ad es. di isolare particolari sottopopolazioni cellulari in base a determinati parametri, per poi valutare per esse altre caratteristiche che altrimenti resterebbero mascherate dalla presenza delle restanti sottopopolazioni.

Tipico es. pratico del gate (fig. 10) si ha nell'isolamento di eventi reali, dovuti alle singole cellule, da quelli spuri dovuti ad agglomerati, mediante la misura dello scatter, eliminando così l'influenza dei segnali di questi ultimi da quelli reali.

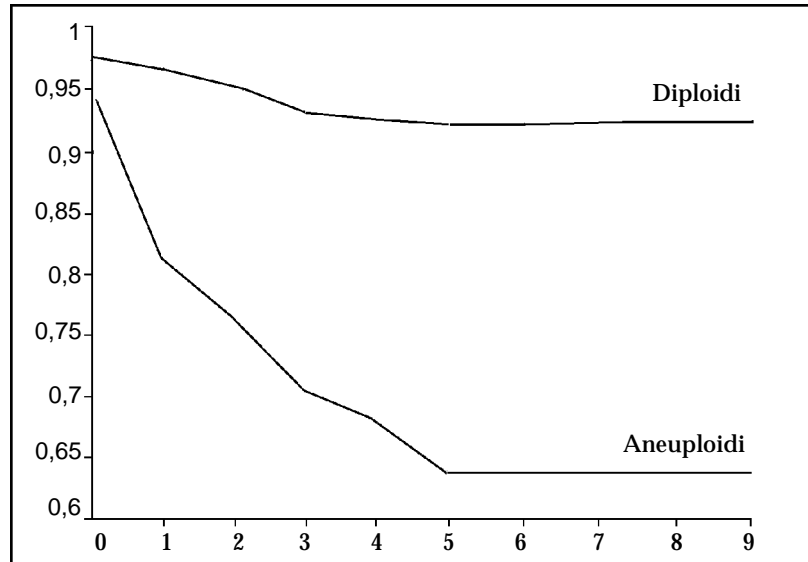


**Figura 10.** Rappresentazione di una GATE linfocitario in un diagramma Dot-Plot Forward scatter vs 90° side scatter ottenuta da un campione di sangue periferico.

## La CFM per lo studio della ploidia e della proliferazione cellulare

Nelle cellule dei tumori solidi è spesso riscontrabile una variazione del contenuto del DNA, principale conseguenza di mutamenti genetici cromosomici e subcromosomici, aventi un ruolo fondamentale per lo sviluppo e il decorso della malattia (58). Infatti numerosi sono i consensi clinici nel ritenere un anomalo contenuto in DNA correlato ad una prognosi peggiore della neoplasia (fig. 11). Inoltre l'evoluzione clinica di quest'ultimo è generalmente in funzione della sua velocità di crescita, determinata dalla frazione di cellule proliferanti rispetto al totale della popolazione generale (6).

Di solito questi fenomeni sono meno pronunciati nelle neoplasie ematolo-



**Figura 11. Probabilità di sopravvivenza in pazienti con tumori diploidi e aneuploidi.**

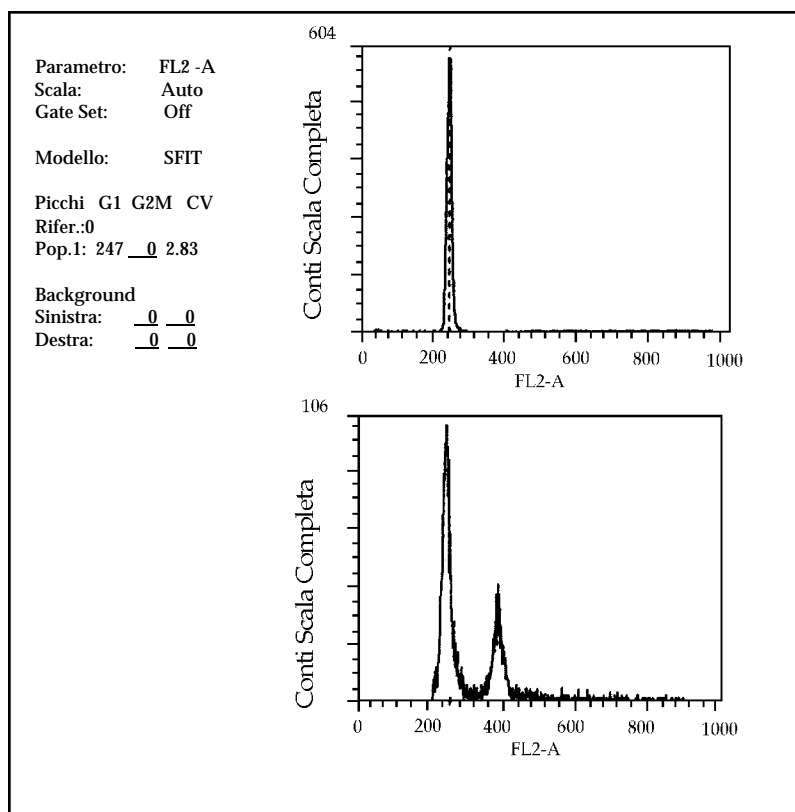
giche che, rispetto a quelle solide, presentano aberrazioni citogenetiche molto meno diffuse; per questo motivo, negli ultimi anni, la applicazione della CFM per l'analisi del DNA delle cellule tumorali, è stata rivolta soprattutto allo studio delle neoplasie solide, nelle quali peraltro data la complessità cariotipica, è molto più difficile l'identificazione di mutamenti cromosomici tumore specifici.

La deviazione dal normale valore diploide implica dei cambiamenti nel numero e/o nella struttura dei cromosomi. Del primo tipo, sono le aneuploidie, con perdite (ipodiploidie) o aggiunte di materiale genetico (iperdiploidie) che conducano alla nascita di monosomi e trisomi o polisomi rispettivamente.

Sono invece mutazioni a carico della morfologia le delezioni, le inversioni, le duplicazioni e le traslocazioni, eventi spesso capaci di attivare gli oncogeni e/o disattivare i tumorsuppressor geni (22, 24, 31, 57).

#### **Analisi del ciclo cellulare**

Considerando le fasi principali del ciclo cellulare (G0-G1-S-G2 ed M) l'istogramma di frequenza del DNA di una popolazione aneuploide ottenuto con la CFM, mostrerà almeno un picco di cellule in fase G0-G1 (fig. 12) soprannumeraria rispetto ad una normale popolazione diploide, a distribuzione di DNA unimodale, con un sol picco di cellule in fase G0-G1 (69).



**Figura 12. Esempio di istogramma del DNA.**

L'anomalo contenuto in DNA può venire espresso in termini di DNA index (DI), cioè dal rapporto fra il contenuto del DNA della cellula tumorale in fase G0G1 e quello di una normale cellula diploide isotipica, nella stessa fase.

Tale rapporto sarà uguale a 1 nel caso di una popolazione neoplastica diploide e diverso da 1 in caso di aneuploidia (14, 21).

L'affidabilità dell'analisi è indicata dal valore del CV (39) relativo al picco G0G1, ovvero dall'ampiezza del picco stesso valutata a metà altezza. Questo parametro, inteso come limite minimo di risoluzione dell'analisi istometrica, condiziona la possibile evidenziazione di eventuali aneuploidie citometriche e la valutazione della fase S (responsabile in parte della crescita neoplastica) spesso mascherata dalla sovrapposizione laterale dei picchi G1G2: evenienza dovuta a cause sia biologiche (la quantità di DNA in G2 non è mai esattamente il doppio di quella in G1) che tecniche (procedure di preparazione e colorazione) risolvibile in parte da metodi statistici, nessuno dei quali



garantisce risultati corretti in caso di popolazioni cellulari molto anomale o di CV eccessivamente alti (71, 72).

Il monitoraggio della proliferazione cellulare (e quindi del ciclo) per mezzo della misurazione del DNA, quale singolo parametro, pone quindi delle reali limitazioni: l'impossibilità di distinguere cellule in G2 da quelle in M aventi lo stesso contenuto di DNA e per lo stesso motivo le cellule in G0 da quelle in G1; la difficile individuazione di sottopopolazioni, come per es. normali cellule diploidi stromali, ma soprattutto la totale mancanza di informazioni circa la cinetica cellulare.

Alcuni di questi inconvenienti possono essere risolti dalla CFM multiparametrica che, valutando, assieme al DNA, altri caratteri della cellula in stretta relazione alla sua posizione nel ciclo, diventa un metodo preferenziale per lo studio delle connessioni fra la sua crescita (misura del contenuto in RNA e proteine) o differenziazione (misura di specifici markers tumorali) e la sua progressione nel ciclo cellulare (22, 56).

### **Analisi Multiparametrica**

La citofluorimetria a flusso multiparametrica viene di solito applicata secondo diversi schemi di azione: l'approccio più comune è l'analisi statistica della popolazione in cui, come già detto, alcuni caratteri quali l'RNA nucleare e cellulare, divengono marcatori predittivi del comportamento cinetico. Un secondo disegno sperimentale consiste nell'analizzare cellule inizialmente sincronizzate o bloccate in metafase. La strategia più conveniente è tuttavia la misura del DNA utilizzando suoi precursori quali ad es. la bromodesossitridina (BrDU): mediante l'impiego di un MoAb anti BrDU, sarà così possibile riconoscere le cellule che hanno incorporato questo precursore nella doppia elica del DNA. La marcatura con FITC consente di evidenziare il complesso MoAbBrDU che, dopo opportuna eccitazione emetterà una quantità di fluorescenza proporzionale alla frazione di cellule impegnate nella fase replicativa (24, 33). La misurazione contemporanea della fluorescenza emessa dopo colorazione con ioduro di propidio (PI) permetterà inoltre il riconoscimento di quelle cellule entrate in fase S, ma non più replicanti (tale frazione cellulare aumenta spesso dopo la somministrazione di alcuni citostatici fase S specifici) (76).

Numerose sono le tecniche adoperate per gli studi di proliferazione cellulare in vitro. Le misure biparametriche possono utilizzare diversi fluorocromi specifici, marcatori di Ag cellulari (PCNA, CICLINE, Ki67 etc.). Queste danno maggiori informazioni sull'attività proliferativa delle cellule in esame, perchè più specifiche nell'individuare sottopopolazioni cellulari non distinguibili con misure monoparametriche e nel seguirne separatamente la progressione nelle varie fasi del ciclo (53, 56).

## La CFM in ematologia

La CFM si è sviluppata rapidamente in anni recenti, in aree molto differenti della medicina in quanto capace di fornire misure accurate, rapide, sensibili e oggettive di un ampio range di caratteristiche cellulari.

L'ematologia quale branca della medicina, rappresenta una delle aree emergenti più importanti, per la quale la CFM è idealmente adattabile allo studio di leucociti, globuli rossi e piastrine, in quanto che, il sangue è una sospensione "naturale" di cellule monodisperse e c'è un numero sempre più crescente di aspetti clinicamente rilevanti della fisiopatologia di queste cellule, che possono essere misurate con questa tecnica.

## Cinetica cellulare/ploidia in oncoematologia

Volendo correlare la cinetica cellulare al grado di ploidia per applicazioni oncoematologiche, la misura del contenuto nucleare del DNA ha avuto un grande impatto nello studio delle leucemie e dei linfomi. La CFM in questo campo fornisce due diversi tipi di informazione:

a) attività proliferativa, la quale viene valutata analizzando le diverse fasi del ciclo cellulare, in particolare determinando la frazione di cellule in fase S (7).

b) anomalie del contenuto del DNA (DI)

Più recentemente l'analisi in CFM del contenuto di DNA, è stata usata per caratterizzare e distinguere i due diversi meccanismi di morte cellulare: apoptosi e necrosi (25).

E' necessario premettere che alcune neoplasie ematologiche hanno gradi molto lievi di aneuploidie. Pertanto durante l'analisi, è necessario ottenere CV molto bassi. Inoltre la loro incidenza è molto più bassa di quella evidenziabile con metodi citogenetici, in quanto, anche nelle condizioni tecniche migliori, la CFM non consente di evidenziare anomalie del cariotipo compensato, (delezioni, traslocazioni, ecc..).

I dati generali indicano che l'incidenza di aneuploidie è abbastanza bassa nelle leucemie linfatiche croniche (LLC) e nei linfomi di Hodgkin (LH) e alta nel mieloma multiplo (MM) (33, 36, 37, 42). Tra le leucemie acute (LA), le non linfoidi (LANL) mostrano una incidenza che varia tra il 5% e il 20%, mentre le leucemie linfoblastiche acute (LLA) dell'adulto e del bambino variano tra il 25-35% (1). L'iperploidia è molto più comune della ipoploidia. L'analisi delle cinetiche del ciclo cellulare nei disordini ematologici ha dimostrato l'esistenza di una importante eterogeneità proliferativa. Per es. le LLC-B mostrano una bassa percentuale di cellule, nel periferico, in fase S, rispetto a quelle trovate sia nelle LLA che LANL (3, 24). Tuttavia esiste una grande variabilità nei risultati riportati in letteratura, spesso correlata agli approcci metodologici.

Nonostante le molte differenze tra i risultati ottenuti dai vari autori, può essere affermato come regola generale che un'alta attività proliferativa è associata con un minor tasso di sopravvivenza. Casi di linfomi non Hodgkin-B (NHL-B) e LLC-B con ritmo proliferativo e misure di fase S più alti, mostrano una prognosi peggiore, lo stesso dicasi per il MM e le sindromi mielodisplastiche (MDS) (38, 42, 55). Diversi fattori sono responsabili delle discrepanze che emergono in quest'area. Spesso il solo parametro cinetico analizzato è la percentuale di cellule in fase S. Questa offre limitate indicazioni della proliferazione. Per ovviare a questa restrizione, dovrebbero essere analizzati anche i parametri di proliferazione, associati al DNA (Ki67 etc.). Le tecniche multiparametriche consentono una valutazione più precisa della "frazione di crescita leucemica", cioè di cellule in ciclo, come pure quella di cellule a riposo (G0) permettendo quindi, di correlare l'aspetto temporale del ciclo cellulare dei parametri "frazione di crescita e aliquota di cellule quiescenti", al processo di trasformazione neoplastica ed ai meccanismi di risposta alla terapia.

### **Immunofenotipo cellulare in CFM**

Per immunofenotipizzazione (IFT) si intende la definizione di un insieme di metodi diretti al riconoscimento, alla quantificazione e alla localizzazione di strutture cellulari per mezzo di agenti immunologici (anticorpi poli e monoclonali).

In CFM vengono utilizzati anticorpi marcati con fluorocromi. Il vertiginoso sviluppo della tecnologia dei MoAb ha fatto sì che la IFT costituisca attualmente, il più vasto ed elettivo campo di applicazione clinica della CFM.

L'IFT può essere effettuato su campioni cellulari provenienti da distretti corporei diversi: sangue periferico, midollo osseo, linfonodi, milza; oppure su liquidi biologici quali il liquor, versamenti cavitari, peritoneali, pleurici etc.

Se da una parte le tecniche morfologiche e citochimiche ci permettono di studiare le cellule nel contesto della loro "architettura tissutale", con il limite che la fissazione può alterare i diversi determinanti antigenici, rendendone difficoltosa l'identificazione, dall'altra questo problema non si presenta con metodi di colorazione immunofluorescenti di sospensioni cellulari. Certamente una analisi che vede l'impiego di markers cellulari non sostituisce, ma integra, lo studio morfologico e citochimico, permettendogli di conservare la sua tradizionale importanza.

In senso del tutto generale le procedure da impiegare per la analisi dell'IFT in CFM sono:

- 1) acquisizione del campione, marcato con una o più fluorescenze.
- 2) acquisizione delle modalità caratteristiche dell'autofluorescenza di un preparato di controllo, per stabilire dei limiti oltre i quali una cellula viene considerata positiva.

3) definizione della popolazione cellulare da includere nell'analisi (gate)

4) analisi delle caratteristiche di distribuzione del campione marcato. Come già accennato precedentemente, particolare importanza assume la funzione del gate: essa consente di delimitare l'analisi in CFM solo agli elementi di interesse, escludendo, in IFT, quelli contaminanti o comunque inutili ai fini interpretativi.

Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato un gate basato su parametri fisici e immunologici, per assicurare una maggiore "purezza". La selezione cellulare viene effettuata a posteriori, acquisendo cioè le informazioni relative a tutte le cellule del preparato, compresi gli eventi contaminanti e perfezionando in un secondo tempo la delimitazione (gate) delle cellule da includere nell'analisi. (Tecnica del Back-Gate). Con i sistemi di acquisizione in listmode questa procedura è molto utile in caso di analisi particolarmente complesse, o meritevoli di ripensamenti in tempi successivi. La correttezza della impostazione del gate è essenziale per la qualità dell'analisi.

### **L'IFT in soggetti con infezione da HIV 1/2**

La patogenesi della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è largamente da attribuire ad una deplezione dei linfociti T CD4+. La loro progressiva riduzione è associata a un incremento di probabilità di implicazioni patologiche (19).

Il principale "reservoir" dell'HIV è infatti costituito dal linfocita CD4+, anche se possono venire infettati molti altri tipi di cellule, quali i monociti ed i macrofagi(88). Il virus si lega mediante la glicoproteina gp120 al recettore CD4, quindi penetra nella cellula integrandosi nel genoma dell'ospite(stadio di provirus) o restando libero nel citoplasma (49). La replicazione del virus all'interno dei linfociti (16, 64) determina una distruzione più o meno lenta, che avviene attraverso vari meccanismi. I principali sono la apoptosi e la formazione di sincizi, ma non è da escludere anche una distruzione autoimmune (94). Pertanto i CD4+ risultano diminuiti sia come numero assoluto che relativo (89). Nei soggetti normali si hanno valori reali compresi tra 600 e 1200 CD4/mm; i pazienti con AIDS hanno invece conteggi molto inferiori ai 600 CD4/mm (95). Dunque la misura dei CD4+ è utile per stabilire l'inizio di una profilassi da patogeni polmonari, per la terapia antivirale e per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento (63, 83).

Le linee guida del Center of Disease Control (CDC) di Atlanta raccomandano un monitoraggio di questi linfociti ogni 36 mesi nei soggetti HIV positivi, che è il risultato di tre tecniche di laboratorio (97):

- a) conteggio dei leucociti (WBC)
- b) percentuale dei linfociti
- c) percentuale dei linfociti CD4+

Quest'ultima determinazione viene eseguita, ormai di routine, per mezzo della CFM. Pertanto l'esatta quantificazione delle cellule CD4+ si basa su un test combinato citometrico/ematologico (26). Tale procedura, che prevede l'utilizzo di doppia strumentazione, può sensibilmente risentire delle differenti tecnologie impiegate. Stanno entrando in uso sistemi diagnostici basati su citofluorimetri che consentono di ottenere direttamente conteggi assoluti di CD4+. Per ridurre ulteriormente il grado di incertezza della determinazione è preferibile adottare dei metodi standard come pure seguire le linee guida per il controllo di sicurezza di qualità. Vengono indicate di seguito le raccomandazioni fornite dal CDC per l'IFT in citometria a flusso (18):

1)effettuare il conteggio delle WBC in maniera automatica entro 6 h dal prelievo

2)effettuare l'immunofenotipo entro le 30h successive, con il metodo in doppia fluorescenza, con tecnica della colorazione seguita da lisi per NH<sub>4</sub>Cl, di sangue raccolto con EDTAK<sub>2</sub>

3)usare il seguente pannello di MoAb:

a) CD45 FITC/CD14 PE per definire il gate linfocitario immunologico e con tecnica di backgate estenderlo al citogramma morfologico FSC vs SSC. I linfociti appaiono intensamente fluorescenti per CD45 e negativi per CD14.

b)controllo isotipico

c)CD3 FITC/CD4 PE. Si misurano solo le cellule T CD4+,evitando l'inquinamento dei monociti

d)CD3 FITC/CD8 PE. Si misurano solo le cellule T CD8+ eliminando l'interferenza dei natural killer (NK) (84)

e)CD3 FITC/CD19 PE. Si misurano i linfociti B

f)CD3 FITC/CD16+56 PE. Per misurare gli NK e definire la somma totale dei linfociti.

### **IFT nelle malattie clonali dei leucociti**

L'IFT in CFM è divenuto il metodo preferito per l'assegnamento della filiera di appartenenza e per la caratterizzazione maturativa di cellule maligne nella diagnosi di linfomi e leucemie acute (5). Il metodo viene anche usato per analisi multiparametriche molto complesse di coespressione di antigeni aberranti e per l'analisi dell'eterogeneità e clonalità delle cellule neoplastiche. La disponibilità di MoAbs contro gli Ag di differenziazione leucocitari ha evidenziato che i blasti immaturi, a dispetto della somiglianza morfologica, possono appartenere a diverse linee cellulari e anche a stadi diversi di differenziazione. Un aspetto rilevante della CFM è quello di consentire l'analisi di Ag a bassi livelli di espressione di fluorescenza, così da permettere la suddivisione di una popolazione cellulare in più sottopopolazioni anche in base al grado di intensità della fluorescenza (4). Quest'ultimo aspetto della

IFT è di grande rilevanza: permette di conoscere la densità di un dato marcatore e quindi il numero di molecole realmente espresse da una cellula (es. CD4 sui monociti, CD8 su NK e CD5 su B e T linfociti) (11).

Scopo dell'indagine è quello di fornire un metodo obiettivo e riproducibile per la diagnosi e il controllo della terapia delle neoplasie ematopoietiche sulla base di una caratterizzazione immunologica di cellule linfoide e mieloidi clonalmente espanse (9).

La classificazione diagnostica della malattia viene effettuata insieme alle indagini cliniche, morfologiche e citochimiche a tre livelli:

- 1) assegnamento del lineage cellulare e analisi del grado di maturazione.
- 2) analisi di coespressione di Ag aberranti e di eterogeneità
- 3) caratterizzazione multiparametrica di immunofenotipi anormali per una valutazione prognostica e per il monitoraggio durante la terapia, nonché per la valutazione della malattia minima residua. I quadri leucemici umani possono essere distinti in forme acute e croniche e nei linfocite e mielocite in considerazione del lineage di appartenenza del clone in proliferazione (10, 12, 15, 17).

Le forme acute sono caratterizzate dalla perdita del controllo proliferativo e da scarsa o nulla differenziazione. Le croniche mostrano una produzione eccessiva di cellule più differenziate e mature (61).

Questa classificazione in apparenza semplice, è in realtà complicata da:

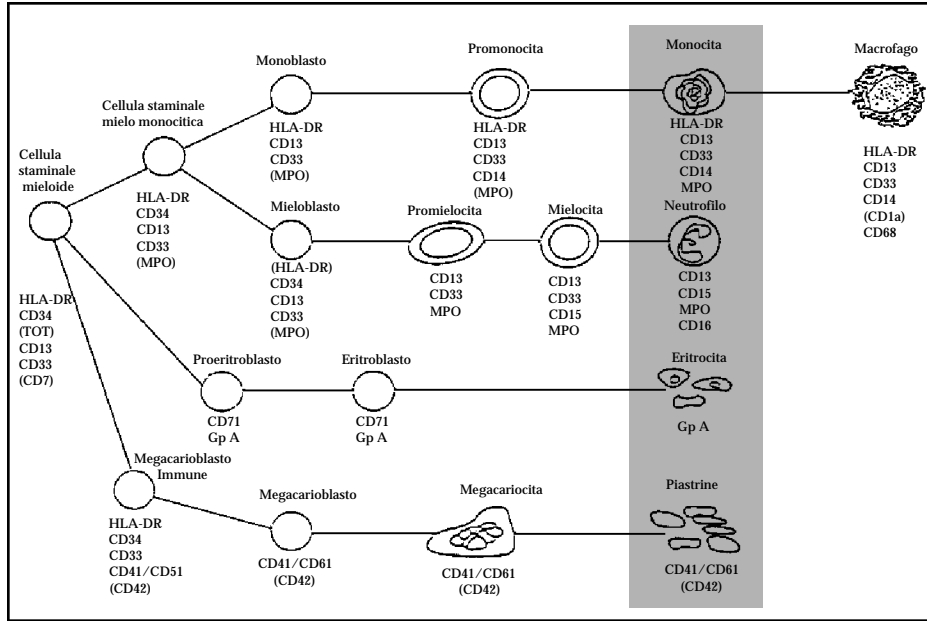
- 1) l'esistenza di crisi blastiche (CB) sia in senso linfocite che mielocite delle leucemie mieloidi croniche (LMC) (91)
- 2) l'esistenza di disordini monoclonali maligni, quali le mielodisplasie (MDS) con evoluzione in quadri clinicoematologici sovrapponibili a quelli delle LA (21).

Il valore diagnostico della CFM nell'IFT è stabilito per le seguenti neoplasie ematologiche:

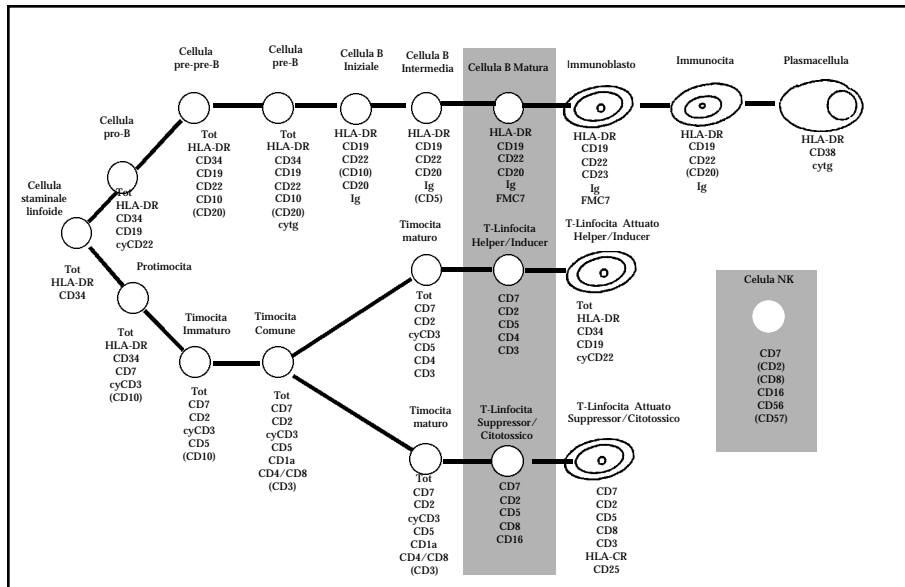
- Leucemie acute
- Crisi blastiche
- Disordini linfoproliferativi cronici (T, B, NK)

La raccolta dei campioni, la loro conservazione e l'avvio all'analisi devono seguire protocolli di consenso stabiliti (48, 81). Le indagini si basano sulla definizione dell'espressione antigenica di popolazioni espanse di cellule nucleate in confronto al normale fenotipo dei vari stadi cellulari durante la differenziazione (fig. 13). Le cellule non nucleate vengono eliminate usando un arricchimento in gradiente di densità di cellule mononucleate oppure con la lisi degli eritrociti.

Se possibile, la combinazione di Ag per la definizione delle popolazioni cellulari è selezionata sulla scorta dei risultati dell'analisi citochimica e morfologica. Oppure può essere usato un panel minimo primario per l'assegnamento di linea dei blasti, seguito da un pannello secondario di MoAb che caratterizza il fenotipo definito e lo stadio maturativo della popolazione blastica. In alternativa può essere selezionato un panel predeterminato per una



**Figura 13. Schema Immunofenotipico nel corso di differenziazione cellulare Mieloide.**



**Figura 13b. Schema Immunofenotipico nel corso di differenziazione cellulare Linfoide.**

fenotipizzazione diretta più estensiva delle cellule mature ed immature del campione. Quest'ultimo approccio ha lo scopo di incrementare la sensibilità per l'evidenziazione delle popolazioni cellulari minime, per caratterizzare l'eterogeneità delle cellule patologiche e per analizzare i concomitanti disturbi della maturazione degli altri sistemi cellulari.

### Leucemie acute

Una delle più importanti applicazioni dell'IFT nella caratterizzazione delle LA è la distinzione tra forme di LANL e LLA indifferenziate morfologicamente e citologicamente, cioè quando si incontrano blasti negativi citochimicamente per la mieloperossidasi (MPO). Un panel primario da usare dovrebbe includere l'HLA-DR e CD34 come marcatori cellulari di immaturità. Poi dovrebbero essere analizzati più antigeni di ciascuna linea: alcuni di essi possono essere perduti durante il processo leucemogenico ed altri possono essere associati con linee diverse, piuttosto che essere linea specifici (tab. 1) (67). La differenziazione mieloidi si dovrebbe basare sul rilevamento immunologico della MPO (reattività immunologica sia per l'enzima attivo che per il proenzima inattivo), del CD13 e del CD33.

L'aggiunta di CDw65 e CD117 può aumentare la sensibilità di definizione delle cellule mieloidi. Le cellule linfoidi B dovrebbero essere determinate tramite l'espressione del CD22 citoplasmatico e del CD19 di superficie. La risoluzione di linea T dovrebbe basarsi invece sulla espressione citoplasmatica del CD3 e TdT e sul CD7, CD5 o CD2 di superficie (44). Il ruolo clinico maggiore stabilito dall'IFT nella ulteriore definizione dei sottotipi di LANL è la ricognizione dei sottotipi M0 e M7 della classificazione FAB (Franch-American-British) mentre per quelli da M1 a M6 ci si basa ancora principalmente sulla morfologia e sulla citochimica.

Attualmente è scopo di ricerca se l'IFT possa servire per una ulteriore caratterizzazione clinicamente più rilevante e riproducibile dei sottotipi di LANL (29). Di sicuro la determinazione di Ag megacariocitici come il CD61 è obbligatoria nell'analisi secondaria in LANL (tab. 1). Inoltre è stato suggerito di includere Ag che caratterizzano i neutrofili (CD15), i monociti (CD14 o CD64), le cellule eritroidi (Glicoforina A) ed altri Ag espressi in maniera aberrante (34).

Le LANL possono essere dunque suddivise in 8 sottogruppi: M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 (40).

Tali varianti derivano dalla proliferazione clonale di cellule staminali pluripotenti o multipotenti o di cellule committed verso la linea mieloidi, eritroide o megacariocitica. La classificazione immunologica si avvale della normale ontogenesi cellulare (fig. 13) e dei suoi stadi di differenziazione, ciascuno dei quali può essere individuato dalla espressione di Ag cellulari ristretti o



Antigene	Classificazione FAB						
	MO	M2 I(8;21)	M3 I(15;17)	M4Eo Inv.16	M5	M5 I(9;11)	M7
MPO	+/-	+	+	+	-/+	-	-
CD2	-			+			
CD13	+/-	+	+	+	+	-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+	-	+/-		+	-
CD19	-	+					
CD33	+/-	+	+	+	+	+	+/-
CD34	+/-	+	-	-/+			
CD56		+					
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+	+	+	+	
CDw65	+/-	+	-/+	+	+	+	+
CD117	+	+/-	-/+	+	+/-		
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	+	+/-

-: Antigeni non espressi, -/+: antigeni espressi in meno del 50% dei pazienti, +/- antigeni espressi nella maggior parte dei pazienti, +: antigeni espressi, campi aperti rappresentano l'espressione parziale senza specificità per la diagnosi o la mancanza di dati affidabili.

**Tabella 1. Diagnosi immunologica nella leucemia mieloide acuta.**

associati (41). Dalla complessa sequenza di modificazioni a carico del fenotipo in corso di processo maturativo di questi cloni cellulari è così possibile individuare un ben preciso stadio identificante una cellula normale e riconoscerne, nella maggior parte dei casi, la controparte neoplastica.

L'ontogenesi mielomonocitica si esprime con l'espressione ubiquitaria di HLADR, CD13, CD33, CD34. La cellula commissionata verso la linea mieloide allo stadio di progranulocito non esprime più HLADR. Questo Ag viene preservato nel lineage monocitico e le cellule più mature esprimono il CD14. Gli Ag CD33 e CD13 sono normalmente coespressi su tutte le cellule mielomonocitiche normali.

Frequentemente la LANL ne esprime uno solo dei due. L'espressione superficiale di HLADR è virtualmente ubiquitaria nelle LA nonT (mieloide, monocitica e precursori di cellule B) con l'eccezione della forma promielocitica (FAB M3). La combinazione di HLADR negativo, con markers positivi mieloidi come il CD13 e/o CD33 in blasti altrimenti indifferenziati, è utile per evidenziare la rara forma ipogranulare della leucemia promielocitica.

Come già indicato, diversi MoAb (CD41 e CD61) possono essere utili per rivelare la variante M7, quando la morfologia è ambigua. Per la eritroleucemia (FAB M6) può essere conveniente invece utilizzare MoAbs contro la maggiore sialoglicoproteina della membrana eritroide, la glicoforina A.

Degne di nota le LANL che in assenza di marcatori linfoidi sono TdT positive(30). Sono casi riferiti con incidenza variabile (fino al 10%) (35) e potrebbero rappresentare un gradino più indifferenziato delle nullLLA che esprimono marcatori mieloidi, oppure LA in apparenza bifenotipiche.

### **Leucemia mieloide cronica (LMC)**

La LMC è invece caratterizzata da proliferazione incontrollata e da anomalie differenziative dei precursori mieloidi indirizzati verso lo sviluppo granulocitario. In queste manifestazioni patologiche aumenta notevolmente, in circolo, il numero dei granulociti presenti in tutti gli stadi di differenziazione (fase iniziale).

La fase terminale (crisi blastica) mostra invece un incremento marcato di elementi immaturi senza tendenza alla differenziazione e con manifestazioni simili a quelle delle leucemie acute. Al momento attuale la immunofenotipizzazione delle LMC riveste minore importanza rispetto alle LLC. Tuttavia spesso consente diagnosi di forme a difficile inquadramento o con espressioni inusuali di marcatori (es. TdT).

### **Leucemie linfatiche acute (LLA)**

Le forme linfoproliferative (leucemie, linfomi e mielomi) rappresentano un gruppo eterogeneo, in cui un evento oncogeno induce una abnorme espansione di un tipo cellulare bloccato ad un certo stadio maturativo (47). Perciò la cellula proliferante rappresenta nella maggior parte dei casi l'alter ego neoplastico di un progenitore normale.

Come per la linea mieloide, anche per i linfociti sono sufficientemente conosciute le tappe dell'iter maturativo, ciascuna delineata da molecole che man mano vengono acquisite o perdute. Il loro riconoscimento permette di individuare uno spettro maturativo con tappe che possono essere associate al processo linfoproliferativo stesso.

Nel caso delle linfocitosi acute il livello maturativo è minimo o nullo, mentre nelle forme croniche si possono avere in circolo grandi quantità di cellule apparentemente mature. In entrambi i casi l'origine è monoclonale.

E' necessario tener presente che le cellule del sistema linforeticolare possono essere fisse o mobili. Tra tessuti, sangue e midollo osseo c'è continuo scambio, per cui ciascuno di questi compartimenti può essere interessato nelle varie fasi che accompagnano un disordine linfoproliferativo.

L'analisi fenotipica suddivide i linfociti in tre linee cellulari distinte:  
-linea T, linea B, linea LGL

In base alle caratteristiche morfologiche nucleocitoplasmatiche il FAB distingue tre principali gruppi di neoplasie linfoproliferative acute (L1, L2, L3). Rispetto alle LANL, in cui la diagnosi morfologica è sufficientemente indicativa del sottotipo, per la caratterizzazione delle LLA diviene invece indispensabile l'applicazione di tecniche immunologiche come la CFM, la quale consente una ulteriore classificazione dei sottotipi FAB (46). In questa maniera è stato possibile evidenziare che l'80% delle LLA coinvolge la linea B ed il 20% la T (60). Le LLA nonT possono essere separate in gruppi fenotipicamente definiti per mezzo di Ag ristretti (CD20, CD19) od associati (CD10, HLADr etc.) (54). Facendo riferimento, anche in questo caso al normale schema di differenziazione, può essere individuato nelle cellule prepreB il precursore più immaturo della filiera (fig. 13). Esse hanno positività per la TdT nucleare e possono o meno esprimere il cosiddetto Ag comune (CALLA) CD10. Per molto tempo tutti quei casi classificati come nullLLA o nonT, nonB, non Commun sono stati attribuiti alla linea linfoide solo per la positività della TdT e dello HLADR. L'uso combinato di indagini immunologiche e molecolari ha stabilito con ragionevole certezza la loro appartenenza alla lineaB. Le nullLLA potrebbero coinvolgere cellule ad uno stadio differenziativo più precoce di quelle della cLLA e dunque essere classificate come precLLA, con positività del CD22 citoplasmatico (66) e bassa o nulla espressione del CD10 (73). Tale Ag individua una forma di LLA più matura ed a prognosi migliore della cLLA. In questa forma è coinvolta la proliferazione di elementi cellulari B relativamente immaturi. Una parte dei blasti può contenere immunoglobuline citoplasmatiche (cIg) (65).

La tappa successiva è costituita da cellule che, dopo aver perso la TdT, esprimono, tutte, cIg ed Ag come il CD20. Come si evince dallo schema lo sviluppo prosegue con la perdita graduale del CD10, la superficializzazione delle Ig (prima IgM, poi IgA) e la espressione del CD22. Tale profilo molecolare, tipico delle forme ormai mature, definisce la rara e aggressiva neoplasia ematologica indicata come BLLA. In queste forme (like-Burkitt) l'aspetto vacuolare dei blasti costituisce criterio morfologico di classificazione di abbastanza agevole interpretazione (L3), rendendo spesso accessoria la IFT (TdT, CD10, sIg+, antiB+). La monoclonalità può essere evidenziata in CFM per l'espressione di catene leggere o Kappa o Lambda, mai coesprese sulla stessa cellula.

Tra le LLA, seconda come frequenza dopo le cLLA, è la linfoblastica a cellule T(59, 73). Mediante l'uso di MoAb è stato possibile accertare che tutte le forme, le quali derivano da "blocchi" a livelli diversi di maturazione intratimica, sono TdT positive. Nello spettro differenziativo la prima forma classificabile è quella del pretimocita (fig 13).

Esso esprime un CD3 (66) citoplasmatico e CD2, CD5, CD7 sulla superficie.

In tutti i casi è presente il CD7 (marker di homing) che precede l'espressione sia del CD2 che del CD3 (68). Un altro Ag espresso in quasi tutti i casi di LLAT è il CD5. Il timocita corticale esprime quindi CD1, CD4 e CD8. Lo sviluppo prosegue con la perdita del CD1, l'acquisizione del CD3 di membrana, mentre il CD4 e CD8 si distribuiscono su due popolazioni cellulari differenti. Si giunge in tal modo allo stadio maturativo finale di linfocita T circolante, che ha fenotipo: CD3+, CD4+ o CD8+, CD5+, CD7+, CD2+, HLA-DR e positività per gli Ag HLA di classe 1.

### Disordini linfoproliferativi cronici (LLC)

Nelle leucemie linfatiche croniche si ha l'espansione di un clone linfocitario relativamente differenziato. Bennet et al. nel 1977 hanno proposto una classificazione delle leucemie linfatiche croniche LLC (T e B) (13) tenendo conto sia del fenotipo immunologico sia di talune peculiari caratteristiche morfologiche dei singoli elementi linfoidei (tab 2). La LLC a cellule B è la più

Antigene	Diagnosi						
	CLL	PLL	HCL	FL	MCL	LP-IL	PCL
slg	+/-w	+s	+s	+s	+s	+s	-
CD5	+	-/ +w	-	-	+	+/-	-
CD10	-	-	-	+/-	-	-	-/ +
CD11c	+/-w	-/ +	+s	-	-	-/ +	-
CD19	+	+	+	+	+	+	-
CD20	+	+	+	+	+	+	-
CD23	+	-/ +	-	-/ +	-	-/ +	-
CD38	-	-	-/ +w	-/ +w	-	+/-	+s
CD103	-	-	+s	-	-	-	-
FMC7	-/ +w	+	+	+	+	-/ +	-

-: Antigeni non espressi, -/+: antigeni espressi in meno del 50% dei pazienti, +/- antigeni espressi nella maggior parte dei pazienti, +: antigeni espressi, w. debole espressione, s: forte espressione  
 FL linfoma follicolare, HCL leucemia a cellule capelute, LGLL linfoma granulare grande, LP-IC immunocitoma linfoplasmocitico, MCL linfoma a cellule del mantello, PCL plasma di cellule della leucemia, PLL leucemia prolinfocitaria

**Tabella 2. Diagnosi immunologica nelle malattie linfoproliferative leucemiche a cellule-B.**

frequente tra queste ed è contrassegnata da una espansione afinalistica e incontrollata di piccoli elementi linfocitari, in apparenza relativamente maturi (36). Nonostante l'aspetto parzialmente differenziato, queste cellule costituiscono la controparte neoplastica di cellule antigenicamente immature (virgin-lymphocyte).

La natura monoclonale è evidenziabile dalle sIg che sono ristrette a livello di catene leggere Kappa o Lambda. Un'altra proprietà distintiva è la ridotta espressione delle sIg che si manifesta in CFM con un segnale a debole intensità di fluorescenza, diversamente da altri disordini linfoproliferativi B. Un secondo marcatore che può essere considerato patognomonico di questa malattia è il CD5. Esso viene coespresso a media e bassa intensità di fluorescenza da cellule B (CD19+, CD20+) come sottopopolazione da cui si originerà la LLC e da cellule T, però ad alta intensità, in quanto Ag costitutivo di questa linea (55). Possono essere messi in evidenza altri Ag B (78) ma questi non danno molte informazioni ai fini di una discriminazione con altre forme di LLC.

Occasionalmente si può riscontrare la presenza di CD25 quale marker di attivazione. Nella forma classica di LLC-B sono assenti o non rilevabili l'FMC7 e il CD11c (79). Non è molto chiara al momento attuale la possibile coespressione di Ag associati alla linea T o alla filiera mielomonocitica.

La leucemia prolinfocitica a cellule B è caratterizzata da un elevato conteggio leucocitario e dalla presenza di tipici prolinfociti, morfologicamente distinguibili per i loro nucleoli. A differenza della LLC-B ha carattere spiccatamente aggressivo, come questa mostra positività per molti antigeni della linea B, ma si distingue per una più intensa espressione delle sIg, per l'assenza del CD5 e per la reattività allo FMC7.

La leucemia a cellule capellute (HCL) è un disordine ematico definito dalla presenza nel sangue periferico di elementi con tipiche espansioni citoplasmatiche. Ci si può avvalere di questo tratto morfologico per distinguerla dalle altre forme leucemiche croniche. Dal punto di vista immunologico la trasformazione neoplastica sembra a carico di un linfocita B a maturazione intermedia, che la pone nello spettro differenziativo fra la LLC-B più immatura e la LPB più matura (90).

La IFT dimostra, praticamente in tutti i casi una positività per il CD25, per il CD11c e per la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP positiva). Le cellule sono in genere negative per il CD5 ed hanno reattività intermedia per FMC7.

I disordini che coinvolgono la linea T hanno una incidenza molto minore. In ogni caso le LLC-T mostrano un fenotipo T maturo post-timico: CD2+ e TdT- (tab. 3).

La forma a "grandi linfociti granulati", LGL, è più spesso una patologia reattiva che neoplastica. I linfociti mostrano abbondanza di granulazioni az-zurrofile e la tipizzazione in CFM consente di stabilire una diagnosi di espansione di LGL con quasi assoluta certezza: può essere espresso un fenotipo T soppressore-citotossico (CD2+, CD3+, CD8+) o quello più frequente delle cellule NK (CD2-, CD3-, CD8-, CD16+, CD56+) (20).

Antigene	Diagnosi			
	T-PLL	Sézary/MF	LGLL	ATL
CD3	+	+	+	+
CD4	+/-	+	-/+	+
CD5	+	+	+	+
CD7	+	-	-/+	-/+
CD8	-/+	-	+/-	-
CD56	-	-	+/-	-
CD57	-	-	+/-	-
HLA-DR	-	-	-	-

-: Antigeni non espressi, +/-: antigeni espressi in meno del 50% dei pazienti, +/- antigeni espressi nella maggior parte dei pazienti, ATL leucemia a cellule-T adulte, LGLL leucemia a grandi linfociti granulari, T-PLL leucemia prolinfocitica.

**Tabella 3. Diagnosi immunologica nelle malattie linfoproliferative leucemiche a cellule-T.**

La leucemia prolinfocitica a cellule T ha invece caratteristiche del tutto simili a quella B. Anche in questi casi con CFM si può mettere in evidenza un fenotipo posttimico, CD4+ o CD8+, CD2+, CD3+, CD5+, CD7+ con assenza di TdT, CD1 e CD38. Rari sono i casi di coespressione di CD4 e CD8. Medesimo assetto antigenico può essere dimostrato nella leucemialinfoma a cellule T dell'adulto: in questa forma che mostra un andamento subacuto, vi è tuttavia una prevalente espressione del CD4, la quale dimostra una derivazione dalla sottopopolazione dei T helper-inducer (60).

Infine la sindrome di Sezary: alla sua diagnosi concorrono sia le manifestazioni cutanee, sia il tipico quadro morfologico cellulare (nucleo cerebriforme), mentre il fenotipo dei linfociti che invadono la cute e di quelli che si riversano nel torrente ematico mostra un "aspetto" immunologico tipico degli altri disordini linfatici cronici T, con aumento dei CD4+.

In tutte le forme le indagini molecolari, ma non la CFM, possono confermare la monoclonalità con la dimostrazione del riarrangiamento dei geni del recettore per le cellule T (TCR). I linfomi vengono descritti come forme linfoproliferative di solito limitate ad organi linfatici e tessuti (47).

Pertanto in questi casi l'analisi del fenotipo si dimostra meno agevole in quanto deve essere effettuata su sospensioni monodisperse di linfonodi e milza. Recentemente è stato evidenziato in queste forme il rilascio di piccole

ma significative quote di linfociti B in circolo (93). Essi sono facilmente identificabili in CFM e possono essere sottoposti ad analisi di monoclonalità. Virtualmente tutte le cellule linfomatose esprimono l'antigene leucocitario comune CD45.

Perciò le cellule CD45- non appartengono ad una neoplasia emopoietica. Nel caso di NHLB quale indice di malignità si può valutare la restrizione monoclonale di sIg (51). L'IFT dei NHLT è invece di scarso ausilio, poiché la monoclonalità dei TCR può essere messa in evidenza con studi biomolecolari di arrangiamento genico, come già abbiamo avuto occasione di dire. Come elemento di "sospetto", semmai, può essere utilizzata la predominanza di linfociti T con restrizione CD4 o CD8. Per gli HL a tutt'oggi le più idonee per la diagnosi risultano le tecniche istologiche e citochimiche con la dimostrazione delle cellule proliferanti di Reed-Sternberg a fenotipo CD15+, CD30+.

In tutti i casi di leucemizzazione l'aspetto non è dissimile dalle corrispondenti leucemie a cellule T e B.

Nel mieloma multiplo (MM) l'elemento distintivo è una plasmacellula proliferante capace di secernere una Ig monoclonale (componente M).

Raramente le plasmacellule invadono in modo massivo il circolo ematico (leucemizzazioni), pertanto come avviene per i linfomi, l'analisi del fenotipo in CFM risulta di non immediata applicabilità, dovendo effettuarsi su campioni midollari (99). Ad ogni buon conto le plasmacellule mostrano positività per Ig citoplasmatiche, per PCA1 e CD38 ad alta densità. Molti studi hanno evidenziato positività anche per marcatori propri della linea B come CD10 (43), CD19, CD21, per marcatori mieloidi come CD11b e CD33, megacariocitici come CD41 ed eritroidi come la glicoforina. Questo può deporre per l'origine altamente indifferenziata del clone plasmacellulare neoplastico a dispetto della sua forma apparentemente matura (99).

## Analisi dei dati

Il grande sviluppo e l'impiego su larga scala delle tecniche citofluorimetriche ha reso necessario affrontare il problema dell'analisi e interpretazione dei dati che queste forniscono. Più in generale, sia che si tratti di misure del DNA per la valutazione della ploidia e del ciclo cellulare, sia che si tratti di analisi dell'immunofenotipo per patologie correlate ad: deficit immunitari, oncematologici o di neoplasie solide, il risultato finale di una misura è riconducibile a un istogramma. E' questo il modo più semplice per rappresentare i dati, diagrammando la distribuzione di frequenza degli elementi in rapporto alla intensità di fluorescenza, anche se, come già indicato, in corso

di analisi multiparametriche si possono utilizzare rappresentazioni a punti (dot/plot) o a contorni isodensitometrici (contourplot) (100). Gli istogrammi ottenuti in CFM contengono dati di 10000 o più cellule e pertanto rappresentano una misura campionaria enorme da cui si possono calcolare parametri statistici come la media, la moda, la DS ed il CV. La metodologia di studio è essenzialmente la stessa e prevede la marcatura a singolo colore o più colori di strutture superficiali od interne di cellule prese singolarmente. Ciò che varia di volta in volta è la qualità dei MoAb da impiegare e l'atteggiamento da tenere in presenza di cellule anomale o di marcatori particolarmente deboli.

E' chiaro che le misure devono essere effettuate nelle migliori condizioni strumentali di allineamento, risoluzione e sensibilità. La linearità indica la capacità di risposta lineare su tutto il range dei valori delle misure. Può essere valutata, come nel caso del DNA, con standard a contenuto noto in funzione delle diverse variabili strumentali, quali l'intensità di eccitazione e le amplificazioni della elettronica di rivelazione (39).

La risoluzione è un parametro stimato dal CV (fig. 14a). Risulta evidente che con un basso potere di risoluzione le due popolazioni non sono più distinguibili (96).

La sensibilità costituisce la capacità di discriminare il segnale di fluorescenza del fluorocromo sonda dal segnale legato all'autofluorescenza. In genere il problema della sensibilità non si pone per i fluorocromi specifici per il DNA, ma solo per le misure di immunofluorescenza di Ag debolmente rappresentati. La sensibilità viene definita come numero di molecole del fluorocromo che producono un'intensità di fluorescenza, equivalente all'autofluorescenza di un bianco opportuno. Il calcolo della soglia minima si esegue utilizzando delle microsferette standard ad intensità nota e calibrata di fluorescenza. L'unità di misura è il MESF (molecole di fluorocromo solubile equivalente).

Tuttavia una adeguata e attenta preparazione del campione e la raccolta dei dati da un citometro correttamente calibrato non garantiscono una accurata informazione; occorre analizzare e interpretare questi dati.

La standardizzazione delle metodiche in IFT impone la discriminazione negativi-positivi. La percentuale di quest'ultimi fornisce, infatti, la misura delle cellule che hanno emesso la fluorescenza dovuta agli specifici Ab marcati che si sono legati agli Ag in studio. I criteri per l'impostazione del limite tra elementi negativi e positivi per un dato marcatore, debbono tener conto di alcune condizioni preliminari, tra cui l'obbligo del preparato di controllo che includa sia un bianco campione per l'autofluorescenza, sia un controllo positivo o isotipico. Solo dal confronto tra questi si può determinare se il back ground di legame sia imputabile all'autofluorescenza oppure avvenga tramite recettori Fc od altro (8). Nella "finestra" stabilita in base al controllo, il cursore viene posizionato in modo che non più del 2% degli elementi positivi cada al disotto di esso (fig. 14b). Il limite impostato mediante controllo è



tanto più soddisfacente quanto più il cursore è spostato a destra. Pertanto il computo delle cellule colorate per un dato marcatore è più preciso se la colorazione è brillante ed i picchi di fluorescenza sono distinti da quelli isotipici. In tali casi è possibile impostare una "finestra" in modo restrittivo, cioè relativamente lontano dal piede dell'istogramma o del contour di controllo. In questo modo gli elementi positivi saranno compresi nella "finestra" ed eventuali lievi shift verso destra della frazione di cellule non marcate (per attacco aspecifico del reagente) potranno essere compensati senza danni (fig. 14c).

Il computo di questi valori sarà più complesso se i picchi della fluorescenza specifica e del controllo sono sovrapposti, come conseguenza, ad es. di una colorazione debole. In queste situazioni una impostazione restrittiva rischia di far perdere elementi positivi del conteggio.

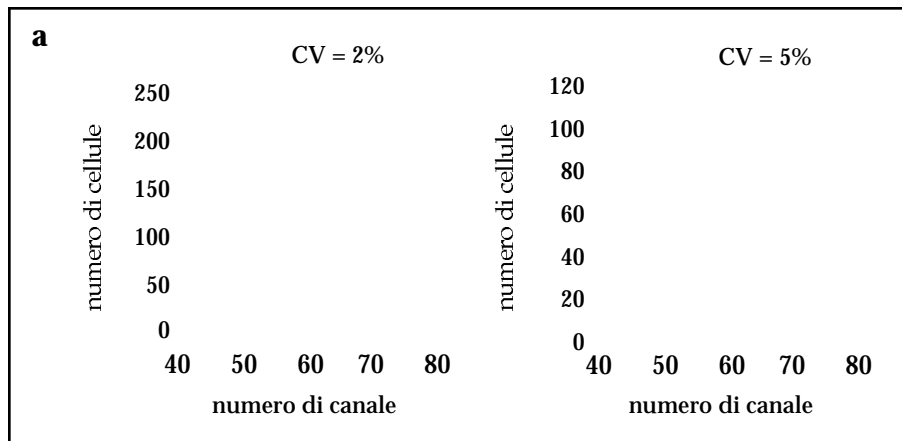
Quindi occorre una finestra posizionata il più vicino possibile allo istogramma di controllo (fig. 14 d).

Limitandosi al caso di intensità debole, si può distinguere la situazione in cui la forma dell'istogramma del test è chiaramente composta da più distribuzioni, da quella unimodale (71), ossia costituita da un unico picco. Per questa situazione una valutazione attendibile (70) della percentuale di positività appare più problematica. In particolare, si supponga che l'istogramma del test sia di forma simile a quello del controllo, ma solo spostato più a destra per un certo numero di canali (fig. 14e). Se lo spostamento è consistente si può ragionevolmente concludere che nel test non c'è alcuna distribuzione negativa (fluorescenza spontanea) e la positività è del 100%. Se lo shift è invece piuttosto modesto non è corretta una simile conclusione.

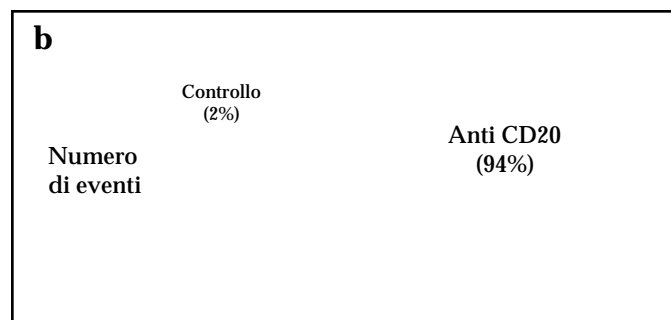
Per quanto riguarda le situazioni in cui si può escludere che il test sia unimodale, si possono utilizzare varie procedure di confronto fra distribuzione degli eventi test e quelli del controllo. Analogamente al DNA possono essere elaborati algoritmi intelligenti per fornire delle soluzioni approssimative. I più usati sono la "sottrazione normalizzata", la "sottrazione cumulativa" e il metodo del valore D.

Il metodo della sottrazione canale per canale si propone di isolare la distribuzione delle cellule positive nel test, sottraendo da essa l'istogramma di controllo, dopo averlo normalizzato per confrontare distribuzioni di uguale area. Analogo al precedente è il metodo della sottrazione cumulativa, nel quale però si usa una strategia differente: l'algoritmo muove un limite attraverso il dominio di tutti i canali per determinare l'integrale dei positivi, sia per l'istogramma del test che per quello di controllo. La procedura costruisce un istogramma cumulativo inverso (100% all'origine) sia per il test che per il controllo. Si trova quindi la massima differenza positiva tra queste due curve e si assume che questo valore costituisca una buona stima dei positivi.

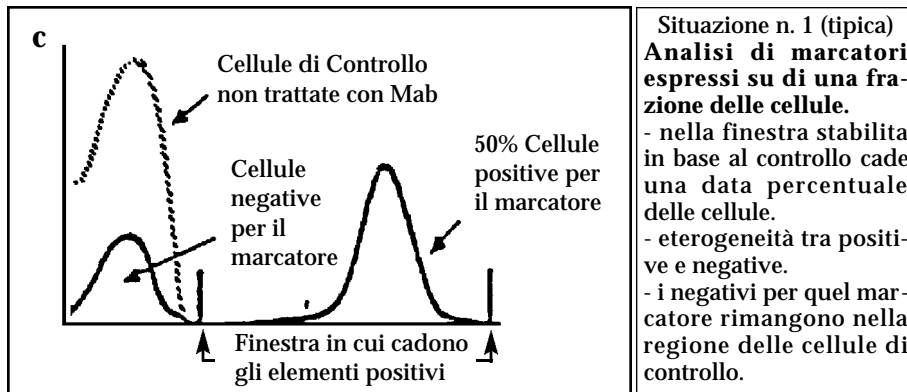
Il metodo del valore D fu proposto nel 1977 da Young per confrontare le differenze tra due istogrammi, utilizzando la statistica di Kolmogorov Smirnov (KS). Qualunque sia il numero finale di eventi è sempre possibile calco-



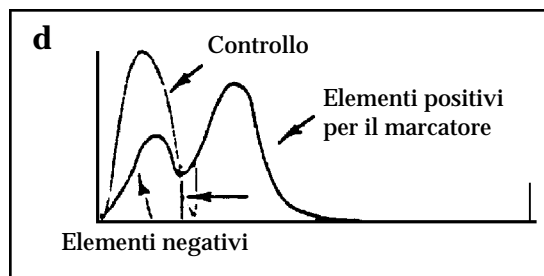
**Fig. 14a.** Analisi monoparametrica di Dot-Istogram in cui si valuta il grado di risoluzione in relazione ai rispettivi coefficienti di variazione CV.



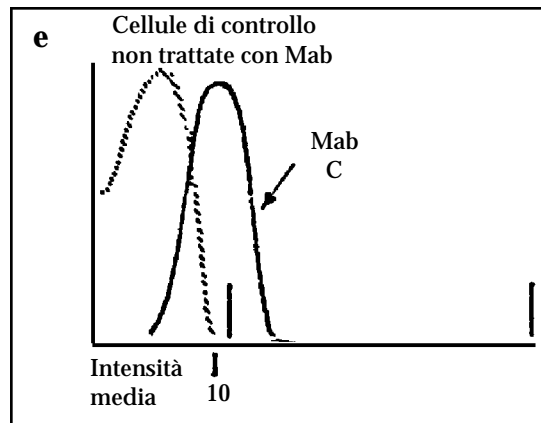
**Figura 14b.** Analisi monoparametrica di un Dot-Istogram nel quale l'inserimento di un controllo isotopico discrimina il 2% di elementi positivi per emissione di autofluorescenza, dal restante % dei positivi emettenti fluorescenza dovuta a specifici anticorpi marcati che si sono legati ad antigeni in studio.



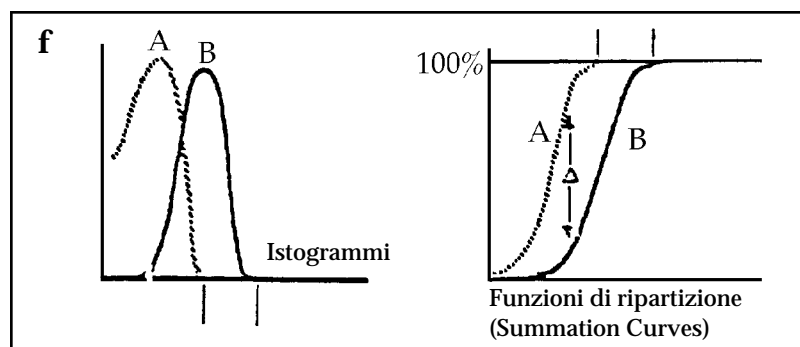
**Figura 14c. Esempio di Dot-Istogram, in cui cellule negative per il marcatore sono ben separate da quelle positive, cadenti pertanto in una finestra ben definita.**



**Figura 14d. Esempio di Dot-Istogram, nel quale si osserva parziale sovrapposizione di istogrammi di fluorescenza, tra cellule negative, controllo isotipico e cellule positive per il marcatore.**



**Figura 14e.** Esempio di Dot-Istogram, con picco unimodale di fluorescenza, in cui l'istogramma del campione marcato è parzialmente sovrapposto a quello del controllo non marcato, con leggero shift a destra.



**Figura 14f.** Esempio di Dot-Istogram, in cui si confrontano le differenze tra due istogrammi, mediante l'utilizzo dell'analisi statistica non parametrica di Kolmogorov-Smirnov (KS).

lare una funzione di ripartizione (derivata seconda dell'involuppo degli istogrammi) che riarrangia i dati in ordine crescente di valore e indica come questi raggiungono il 100% a partire dal valore minimo (statistica non parametrica) (fig. 14f).

La funzione KS calcola per ogni valore la differenza tra le due funzioni e ne trova il valore massimo, da esso si calcola un valore D (tra 0 e 1), riportato su apposite tabelle, che risulterà tanto più vicino a 0 quanto più le due funzioni sono sovrapponibili.

Tutti questi metodi, benchè semplici e obiettivi, danno luogo in generale a risultati tanto meno accurati quanto maggiore è il grado di sovrapposizione.

Più recentemente sono stati proposti metodi matematici atti a rappresentare le distribuzioni di immunofluorescenza. Si basano sulla supposizione che la distribuzione negativa del test sia sovrapponibile a quella di controllo. Pertanto un modello statistico che si adatti nel miglior modo possibile all'istogramma di controllo, può essere usato per individuare la frazione negativa del test (72). Il procedimento di analisi degli istogrammi consente di ottenere stime per la percentuale positiva, molto più attendibili di quelle fornite dai metodi basati su un valore soglia o sulla sottrazione del controllo dal test.

## Materiali e metodi

Di seguito vengono illustrati una serie di casi di indagini immunofenotipiche in CFM effettuate presso la Unità Operativa di Immunologia della USL 6 di Livorno, sia su soggetti sieropositivi per HIV1/2 sia su pazienti leucemici. È stato usato un citofluorimetro FACSCAN Becton Dickinson con sorgente di eccitazione laser ad ioni Argon, raffreddato ad aria, con potenza di 15mW ed emissione a 488 nm, raggio ellittico 20x46nm, ottica ad allineamento fisso, specchi dicroici 560/22.5 (bleu/arancio) e 640 LP (arancio/rosso); filtri: FL1 530/30, FL2 585/42 e FL3 650 LP.

È stato usato sangue "intero", raccolto con EDTAK3 ed i MoAb riportati in tab 4.

Sono state utilizzate le seguenti tecniche di preparazione dei campioni: incubazione diretta con MoAb seguita da lisi degli eritrociti. Il materiale viene dapprima incubato nelle proporzioni di 100 µl di sangue e 20 µl di MoAb marcati. Segue una incubazione di 20' 30' a temperatura ambiente (t. a.) al buio. Al termine di questa fase viene eseguita la lisi dei g. r. con cloruro di ammonio (NH<sub>4</sub>Cl) per 10'. La miscela viene quindi direttamente letta al citofluorimetro, senza preliminari passaggi di lavaggio, come da alcuni indicato, per rimuovere i residui di g. r. e dei MoAb non legati.

Per la ricerca di Ag intracellulari lo step dell'incubazione dei MoAb viene fatto precedere dal trattamento del campione con 2ml di una soluzione fis-

CD41a	Piastriine megacariociti	Glicoproteina IIb/IIIa Recettore Fibrinogeno
CD42b	Piastriine megacariociti	Glicoproteina Ib, parte del fattore-recettore di Willebrand
CD45	Tutti i leucociti	Antigene T200, proteina-tirosina-fosfatasi
CD61	Piastriine megacariociti	Glicoproteina IIIa, catena del recettore per la nitrovettrica
CDw65	Neutrofili, debole espressione sui monociti	Ceramide dodecasaccaride 40
CD71	Cellule eritroidi, linfociti attivati B e T, macrofagi	Recettore per la transferrina
CD79a	Linfociti	Iga/mb-1 parte del recettore per l'antigene della cellula
CD103	Linfociti intraepiteliali	HML-1
CD117	Cellule precursore mieloidi	C-kit, fattore recettoriale della cellula staminale
FMC7	Linfociti B differenziati	Glicoproteina 105 KDa
glicoforina A	Eritrociti, eritroblasti e cellule precursore	Polipeptide ricca di acido sialico
HLA-DR	linfociti , linfociti attivati T	Parte del complesso MHC II
MPO	Espressione lisosomiale nei neutrofili e monociti	Mieloperossidasi
TdT	Espressione nucleare nelle cellule precursore linfoidi	Desossinucleotidil transferasi terminale
kappa	Espressione sulla superficie dei linfociti B	Catena leggera delle immuno-globuline tipo kappa
lambda	Espressione sulla superficie dei linfociti B	Catena leggera delle immuno-globuline tipo filolambda
Ig-chain	linfociti	Catena pesante delle immunoglobuline-M

**Tabella 4. Caratterizzazione degli antigeni.**

sante-permeante (Permeafix) per un periodo di 45' a t. a. In tal modo le cellule vengono fissate e rese permeabili alla penetrazione dei marcatori fluorescenti. Dopo incubazione si centrifuga a 400 xg per 5', si elimina il surnatante e le cellule vengono risospese in 2 ml di lisante per 10'. Si centrifuga di nuovo a 400 xg, si scarta il surnatante ed al residuo si aggiungono 20 µl di MoAb per il riconoscimento degli Ag intracitoplasmatici, quindi incubazione per 40' a t. a.

Al termine le cellule vengono lavate e risospese in 2 ml di tampone PBS al 5% e sono pronte per la lettura. Per la valutazione delle catene leggere kappa e lambda delle sIg è stato invece adottato il metodo della lisi del campione seguita da incubazione con MoAb: dopo la lisi si effettuano tre lavaggi delle cellule mononucleate residue, ciascuno con 2 ml di PBS al 5%, quindi si risospescono in 1 ml di tampone per 45' a 37°C. Questo passaggio ha lo scopo di eliminare gli Ab sierici adesi aspecificamente sulla membrana cellulare. Dopo l'incubazione si centrifuga a 1100 rpm per 10', si scarta il surnatante e si aggiunge l'antisiero anti-K ed anti-L (20 µl). Segue una ulteriore incubazione di 30' a 4°C al buio, dopodichè si risospescono le cellule in PBS e si effettua la lettura.













23: MONT004

Quad Stats

File: 23: MONT004 Sample: CD5 FITC 003

Date: 11/29/95 Gate G1 = R1

Selected Preference: Arithmetic/Linear

Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG) Quad Location: 11.14, 8.06

Total= 10000 Gated= 3423

Quad	Events	%Gated	%Total	Xmean	Ymean
1 UL	1914	55.92	19.14	2.28	26.23
2 UR	27	0.79	0.27	124.24	10.19
3 LL	228	6.66	2.28	2.15	3.29
4 LR	1254	36.63	12.54	106.63	3.79

## Risultati

- B. C. femmina eterosessuale, 37 anni HIV1-2Ab + dal 1990, HIV-Ag-western-blot + (p24+). IFT n° 1
- C. S. maschio tossicodipendente, 28 anni HIV1-2 AB + dal 1987, HIVAg +, western-blot + (p24+). IFT n° 2
- M. M. maschio omosessuale, 55 anni HIV1-2 Ab + dal 1988, HIVAg, western-blot + (p24+). IFT n° 3
- R. D. femmina, 81 anni: classificazione clinicomorfológica FABM2 IFT n° 4
- C. F. maschio, 58 anni: classificazione clinico morfologica LLBC IFT n° 5
- M. I. maschio, 52 anni: probabile LGL IFT n° 6

## Conclusioni

I MoAb consentono di analizzare le variazioni antigeniche che accompagnano la differenziazione delle cellule staminali negli elementi delle diverse linee emopoietiche, costituendo reagenti estremamente utili per identificare le singole cellule, stabilirne l'appartenenza ad una linea cellulare e il livello di maturazione. Ciò non solo ha consentito di compiere grandi progressi nella diagnosi e classificazione di leucemie e linfomi, ma ha anche permesso di individuare caratteristiche biologiche in grado di condizionare sia la presentazione clinica che la risposta alla terapia, offrendo nuove prospettive diagnostiche e terapeutiche.

Una delle sfide maggiori della tecnologia analitica della CFM è attualmente rivolta allo studio di sottopopolazioni in quanto piccole porzioni di un intero campione. Alcuni dati preliminari sulla determinazione della malattia minima residua con completa remissione morfologica, indicano che la applicazione della CFM con differenti MoAb può costituire un metodo adatto in un'alta percentuale di pazienti con LLA. Potrebbe essere raggiunto un livello di sensibilità di 1 cellula leucemica su 10000. La dimostrazione sia della persistenza di cellule con fenotipo leucemico, durante la chemioterapia, sia del loro incremento dopo remissione completa, dovrebbe significativamente contribuire ad una diagnosi precoce di ricaduta.

## Bibliografia

1. Aiello A., Delia D.: Immunofenotipizzazione delle malattie linfomato-poietiche in citofluorimetria a flusso.
2. Arndt-Jovin D.J., Nicoud M.R., Kaufman S.J., Jovin T.M.: Fluorescence Digital Imaging Microscopy in Cell Biology, 1984; 21.
3. Autori Vari Speciale Citometria a Flusso (5 articoli). Biologi Italiani XIX (N° 9): 8, Settembre 1989.
4. Ball D.L., et al.: Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. Blood, 1991; 77: 2242.
5. Barclay A.N., et al.: The leucocyte antigen. Edito da Academic Press. Inc. 1993.
6. Barlogie B., Raber M.N., Schuhmann J., Johnson T.B., et al.: Flow Cytometry in clinical cancer research. Cancer Res., 1983; 43: 3982.
7. Bauer K.D., Merkel D.E., Winter J.N.: Prognostic implication of ploidy and proliferative activity in diffuse large cell lymphomas. Cancer Res., 1986; 46: 3173.
8. Beck H.P.: Evaluation of flow cytometric data of human. Correction procedures for background and cell aggregations. Cell Tissue Kinet, 1980; 13: 173.
9. Bennet J.M., Catovsky D., et al.: Proposed revised criteria for the classification of acute leukemia. A report of French-American-British Cooperative Group. Ann. Intern. Med., 1985; 103: 626.
10. Bennet J.M., Catovsky D. et al.: The morphologic classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. A report of French-American-British Cooperative Group. British Journal Haematology, 1981; 47: 553.
11. Berti E., Cattoretti D., et al.: International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Vienna, February, 21-25, 1989: a report. Haematologica, 1989; 74: 401.
12. Binet J.L., Augier A., Dighiero G., et al.: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer, 1981; 48: 198.
13. Boumsell L. et al.: An antigen shared by a human T cell subset and B cell chronic cells lymphocytic leukemic cells. J. Exp. Med., 1980; 152, 229.
14. Braylan R.C., Benson N.A., Nourse V.A.: Cellular DNA of human neoplastic B-cells measured by flow cytometry. Cancer Res., 1984; 4: 5010.

15. Cantù-Rajnoldi A., Cattoretti G., Schirò R., et al.: Morphologic, cytochemical and immunological profile in T-cell lymphoblastic leukemia of childhood. *Haematologica*, 1986; 71: 467.
16. Carriere D., Fontaine C., Berthier A.M., et al.: Two-site enzyme immunoassay of CD4 and CD8 molecules on the surface of T lymphocytes from healthy subjects and HIV-1 patients. *Clin. Chem.*, 1994; 40: 30.
17. Catovsky D., Matutes E.: The classification of acute leukemia. *Leukemia*, 6: 1992 Supplement 2: 1-6.
18. C.D.C. 1994 Revised guidelines for the performance of CD4+T-Cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infections. *MMWR* 1994; 43 (No. RR-3): 1.
19. C.D.C. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992; 41 (No. RR-17): 1.
20. Chan C.W., Link S., et al.: Heterogeneity of large granular lymphocyte proliferations: delineation of two major subtypes. *Blood*, 1986; 68: 5.
21. Clark R., Peters S., et al.: Prognostic importance of hypodiploid hemopoietic precursor in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.*, 1986; 314: 1472-1475.
22. Colnaghi M.L.: Acquisizione e Prospettive in Immunodiagnostica Oncologica. *Diagnosis*, 1992; 3: 2.
23. Comitato GIC per la Standardizzazione delle metodiche di Immunofenotipizzazione Linfocitaria su Sangue Intero e Immunofluorescenza Diretta in Citometria e Flusso. *Lettere GIC*, 1992; 1 (1): 34.
24. Coon J.S., Landay A., et al.: Biology of disease. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab. Invest.*, 1987; 57: 453.
25. Coon J.S., Deitch A.D., et al.: Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. *Cancer*, 1988; 61: 126.
26. Cooper D.A., Gatell J.M., Kroon S., et al.: Zidovudine in persons with asymptomatic HIV infection and CD4+ cell counts greater than 400 per cubic millimeter. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 329: 297.
27. Costa A., Mazzini G., Del Bino G., et al.: DNA content and kinetic characteristics of non-Hodgkin's lymphoma: determined by flow cytometry and autoradiography. *Cytometry*, 1981; 2: 185.
28. Coulter W.H.: Means for counting particles suspended in a fluid. U.S. Patent, 1953; 2: 656.
29. Cross A.H., Goorha R.M., et al.: Acute myeloid leukemia with T-Lymphoid features: a distinct biologic and clinical entity. *Blood*, 1988; 72: 579.

30. Crowther D., Beard M.E.J., et al.: Factors influencing prognosis in adults with adult myelogenous leukemia. *Br. J. Cancer*, 1975; 32: 456.
31. Danova M., Riccardi A., et al.: Ras oncogene expression and DNA content in plasmacell dyscrasias: a flow cytofluorimetric study. *Br. J. Cancer*, 1990; 62: 781.
32. Dean P., Jett J.: Mathematical analysis of DNA distribution derived from flow microfluorometry. *J. Cell. Biol.*, 1974; 60: 523.
33. Del Vecchio L.: Il ruolo della citometria nello studio delle leucemie umane. In: *Lezioni del Corso GIC "Applicazioni della citometria in oncologia"*. Portici, 25-28.2.1992; pp 113-118.
34. Del Vecchio L., Finizio O., et al.: Coordinate espressione of T-cell antigens on AML and of myeloid antigens on T-ALL. Speculations on a highly balanced bilinearity. *Leukemia*, 1991; 9: 815.
35. Del Vecchio L., Schiavone E.M., et al.: Immunodiagnosis of acute leukemia displaying ectopic antigens: proposal for a classification of promiscuous phenotypes. *Am. J. Hematol.*, 1989; 31: 173.
36. Dighiero G., Travade P., Chevret S., et al.: B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: present status and future directions. *Blood*, 1990; 78: 1901.
37. Dosik G.M., Barlogie B., Smith T.L., et al.: Pretreatment flow cytometry of DNA content in adult acute leukemia. *Blood*, 1980; 55: 474.
38. Dow L.W., Chang J.A., et al.: Relationship of pretreatment lymphoblastic proliferative activity and prognosis in 97 children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1982; 59: 1197.
39. Dressler L.G., Controls, Standards, and histogram interpretation in DNA flow cytometry. *Methods in cell biology*. Vol. 33 1990; Chapter 17, 157.
40. Drexler H.G.: Classification of Acute Myeloid Leukemias. A comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia*, 1987; 1: 697.
41. Drexler H.G., Menon M., Bhoopalam N., et al.: Correlation of surface marker expression with morphologically and immunologically defined subclasses of acute myeloid leukemia. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986; 65: 363.
42. Durie B.G.M., Salmon S.E., et al.: Pretreatment tumor mass, cell kinetics and prognosis in multiple myeloma. *Blood*, 1988, 55: 364.
43. Epstein J., Xiao H., et al.: Markers of multiple hematopoietic-cell lineages in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 1990; 322: 664.
44. Ferrara F., Finizio O., De Rosa, et al.: Acute myeloid leukemia expressing T cell antigens: clinico-hematological report on six cases. *Leukemia and Lymphoma*, 1990; 3: 217.



45. Foa R., Madon E., Masera G., et al.: Multimarker phenotypic characterization of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: an Italian multicentre study *Br. J. Haematol.*, 1985; 61: 251.
46. Foa R., Migone N., Gavosto F.: Immunological and molecular classification of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 1986; 71: 277.
47. Foon K.A., Todd R.F.: Immunologic classification of leukemias and lymphomas. *Blood*, 1986, 68: 1.
48. Foucar K., Chen I.M., Crago S.: Organization and Operation of a Flow Cytometric Immunophenotyping Laboratory. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 1989; 6: 13.
49. Franke L., Nugel E., Docke W.D., Portsman T.: Quantitative determination of CD4/CD8 molecules by a cell marker ELISA. *Clin. Chem.*, 1994; 40: 38.
50. Fried J., et al.: Flow cytometric analysis of cell cycle distribution using propidium iodide. *J. Cell Biol.*, 1976; 71: 172.
51. Freedman A.S. and Nadler L.M.: Immunologic Markers in non-Hodgkin Lymphoma. *Hematology-Oncology Clin. North Am.* 5(5): 871, October 1991.
52. Gale R.P. and Ben Bassat I.: Hybrid acute leukemia. *Br. J. Haematol.*, 1987; 65: 261.
53. Ganzler T.: Applicazioni della citometria a flusso nella quantificazione del DNA nella patologia tumorale. *The Ligand Quarterly Clas International*, 1988; 284-289.
54. Gavosto F.: Immunobiologicals features of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 1983; 68: 1.
55. Geisler C.H.; et al.: Prognostic importance of flow cytometry immunophenotyping of 540 consecutive patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1991; 78: 7.
56. Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., et al.: Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Immunol.*, 1983; 133: 1710.
57. Giaretti W.: Ploidy and proliferation evaluated by flow cytometry. An overview of techniques and impact in oncology. *Tumori*, 1991; 77: 403.
58. Gould P.R., Alexanian R. et al.: Plasma cell karyotype multiple myeloma. *Blood*, 1988; 71: 453.
59. Greaves M.F.: Immunological classification of T-cell acute lymphocytic leukemia using monoclonal antibodies. *Leukemia Res.*, 1983; 7: 339.
60. Greaves M.F., Rao J., Hariri G., Verbi W., et al.: Phenotypic heterogeneity an cellular origins of T cell malignancies. *Leuk. res.*, 1981; 5: 281.

61. Greaves M.F., Chan L.C., et al.: Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood*; 1986; 67: 1.
62. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cancer Genet. Cytogenet.*; 1984; 13: 181.
63. Ho D.D., Cao Y., Zhu T., Farthing C. et al.: Idiopathic CD4+ T-Lymphocytopenia-Immunodeficiency without evidence of HIV Infection. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 328: 380.
64. Hulstaert F., Strauss K., Levacher M., et al.: The staging and prognostic value of subset markers on CD8 cells in HIV disease. In: Janossy G., Autran B., Miedema F., (eds): *Immunodeficiency in HIV infection and AIDS*. Karger, Basel; 1992; 185.
65. Jacobberger J.W., et al.: Analysis of Intracellular Antigen by Flow Cytometry. *Cytometry*; 1986; 7: 356.
66. Janossy G., Coustan-Smith E., Campana D.: The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia*, 1989; 3: 170.
67. Kita K., Miwa H., Nakase K., et al.: Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. *Blood*, 1993; 81: 2399.
68. Kurtzberg J., Waldann T.A., et al.: CD7, CD4-, CD8- acute leukemia: a syndrome of malignant pluripotent lymphohemopoietic cells. *Blood*, 1989; 73: 381.
69. Lajtha L.G.: On the concept of the cell cycle. *J. Cell Comp. Physiol.*, 1963, 62, suppl. 1: 143.
70. Lampariello F.: Evaluation of the number of the positive cells from flow cytometric immunoassay by mathematical modeling of cellular autofluorescence. *Cytometry*, 1994; 15: 294.
71. Lampariello F., Mauro F., Uccelli R., Spanò M.: Automatic analysis of flow cytometric DNA histograms from irradiated mouse male germ cells. *Cytometry*, 1989; 10: 62.
72. Lampariello F., Sebastiani G., Cordelli B., Spanò M.: Comparison of Gaussian and distribution densities for modeling fluorescence dispersion in flow cytometric DNA histograms. *Cytometry*, 1991; 12: 343.
73. Le Bien T.W., McCormack R.T.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10). Emancipation from a functional enigma. *Blood*, 1989; 73: 625.
74. Malamed M.R., Mullaney P.F. and Mendelsohn M.L.: *Flow Cytometry and Sorting*. John Wiley and Sons Inc., New York, 1979.

75. Mann R.C., Hand R.E. Jr. et al.: Parametric analysis of histograms measured in flow cytometry. *Cytometry*, 1983; 4: 75.
76. Mazzini G., Giordano P., Ricciardi A. e Montecucco C.M.: A flow cytometric study of the propidium iodide staining kinetics of human leukocytes and its relationship with chromatin structure. *Cytometry*, 1983; 3: 443.
77. Mendelsohn M.C.: The growth fraction: a new concept applied to tumors. *Science*, 1960; 132: 1496.
78. Miller M.L., Fishleder A.J., Tubbs R.: The expression of CD22 (Leu 14) and CD11c (Leu M5) in chronic lymphoproliferative disorders using two-color flow cytometric analysis. *Am J. Clin. Pathol.*, 1991; 96: 100.
79. Molica S., Dattilo A., Mannella A.: CD11c expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1993; 82: 1277.
80. Molica S., Levato D., Levato L.: Infections in chronic lymphocytic leukemia: analysis of incidence as a function of length, of follow-up. *Haematologica*, 1993; 78: 374.
81. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes; Tentative guideline. NCCLS document H42-T, Villanova, PA, 1992.
82. Nawrath R., Serra J.: Quantitative image analysis. *Microscopia Acta*, 1979; 82: 101.
83. Nicholson J.K.A.: Immunophenotyping specimens from HIV-infected persons: laboratory guidelines from the centers for disease control and prevention. *Cytometry (Communication in Clinical Cytometry)*, 1994; 18: 55.
84. O'Rourke A.M., Mescher M.F.: The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function. *Immunology Today*, 1993; 14: 183.
85. Osmond D.G.: The turnover of B-cell population. *Immunology Today*, 1993; 14: 34.
86. Palutke M., Tabaczka P., Gingrieh D.: CD11c expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 1992; 76: 123.
87. Prenna G., Leiva S., Mazzini G.: Quantification of DNA by cytofluorometry of the conventional Feulgen reaction. *Histochem.*, 1974; 6: 467.
88. Prince H.E., Arens L., Kleinman S.H.: CD4 and CD8 subsets defined by dual-color cytofluorometry which distinguish symptomatic from asymptomatic blood donors seropositive for human immunodeficiency virus. *Diagnost Immunol.*, 1987; 5: 188.

89. Reichert T., De Bruyere M., Deneys V., Totterman T., et al.: Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1991; 60: 190.
90. Robbins B.A., Douglas J.E., et al.: Diagnostic application of two-color cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood*, 1993; 82: 1277.
91. Rozman M., Cervantes F., Urbano-Ispizua A., Feliu E., et al.: Sequential study of myeloid differentiation antigens of neutrophil granulocytes in different phase of chronic myeloid leukemia: natural history and prognostic significance. *Leukemia*, 1993; 7: 80.
92. Shapiro H.M.: *Practical Flow Cytometry*. Alan R., Liss, Inc. New York, 1985.
93. Smith B.R., Weinberg D.S., Robert N.J., et al.: Circulating monoclonal B Lymphocytes in non-Hodgki's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 1984; 311: 1476.
94. Smith D.K., Neal J.J., Holmberg S.D.: Unexplained opportunistic infections and CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection. An investigation of cases in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 328: 373.
95. Spira T.J., Jones B.M., Nicholson J.K.A., Lal R.B., et al.: Idiopathic CD4 T-lymphocytopenia. An analysis of five patients with unexplained opportunist infection. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 328: 386.
96. Steinkamp J.A.: Flow cytometry. *Rev. Sci. Instrum.*, 1984; 55: 1375.
97. Taylor J.M.G., Fahey J.L., Detels R., Giorgi J.: CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection wich to choose and how to use. *J. AIDS*; 1989; 2: 114.
98. Traversi E., Riccardi A., Montecucco C.M., Mazzini G.: Cytokinetic studies in acute leukemia during early induction therapy. *Tumori*; 1985; 71: 69.
99. Ucci G., Petrini M., Riccardi A., Invernizzi R., et al.: Expression of p170 multidrug resistance protein in multiple myeloma. In press, 1991.
100. Van Dilla M.A., Dean P.N., Laerum O.D., Melamed M.R.: *Flow cytometry: instrumentation and data analysis*. Academic Press, Londra 1985.

## Indice

Editoriale .....	pag.	3
Cenni storici .....	»	5
Citometria .....	»	6
Confronto fra CFM e ICM .....	»	8
I Citometri a flusso .....	»	9
Componenti di un citometro a flusso .....	»	10
Il sistema fluidico .....	»	10
Sorgenti luminose .....	»	12
Parametri fisici .....	»	14
Segnali di fluorescenza e Compensazione .....	»	16
Rilevazione dei dati citometrici .....	»	17
Rappresentazione dei dati .....	»	18
Gate .....	»	20
La CFM per lo studio della ploidia e della proliferazione cellulare ....	»	20
Analisi del ciclo cellulare .....	»	21
Analisi Multiparametrica .....	»	23
La CFM in ematologia .....	»	24
Cinetica cellulare/ploidia in oncoematologia .....	»	24
Immunofenotipo cellulare in CFM .....	»	25
L'IFT in soggetti con infezione da HIV 12 .....	»	26
IFT nelle malattie clonali dei leucociti .....	»	27
Leucemie acute .....	»	30
Leucemia mieloide cronica (LMC) .....	»	32
Leucemie linfatiche acute (LLA) .....	»	32
Disordini linfoproliferativi cronici (LLC) .....	»	34
Analisi dei dati .....	»	37
Materiali e metodi .....	»	43
Risultati .....	»	51
Conclusioni .....	»	51
Bibliografia .....	»	52
Indice .....	»	59

# Caleidoscopio

Italiano

1. Rasso S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rasso S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rasso S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rasso S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rasso S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico ed immunologico ed immunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rasso S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.

27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterinina nella pratica clinica*. Aprile '91.

61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatore biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.



91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P., Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G.M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.
106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurlé C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.



**Rivista mensile di Medicina**  
anno 15, numero 113

**Direttore Responsabile**

Sergio Rassu  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
Tel.-Fax 079 270464  
Tel. mobile 0338 2202502  
E-mail: rassu@mbox.vol.it

**EDITORE**

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**

Letizia Cuccuru

**Responsabile Commerciale**

Alessandra Pater

**Servizio Abbonamenti**

Fina Grandeppieno  
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)  
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);  
Telex 270310 Ideal I.  
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://www.vol.it/pandora> e <http://www.medicalsystems.it>  
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,  
Guida Pratica Immulite<sup>®</sup>, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,  
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**

ALGRAPHY S.n.c.  
Passo Ponte Carrega, 62 R. - GENOVA  
tel. 010/8366272 - Fax 010/8358069

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996  
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Giugno 1997  
Sped. in Abb. Post. 50%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:  
"L'ECO DELLA STAMPA"  
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6  
DPR 627/78



