

# LETTERE GIC

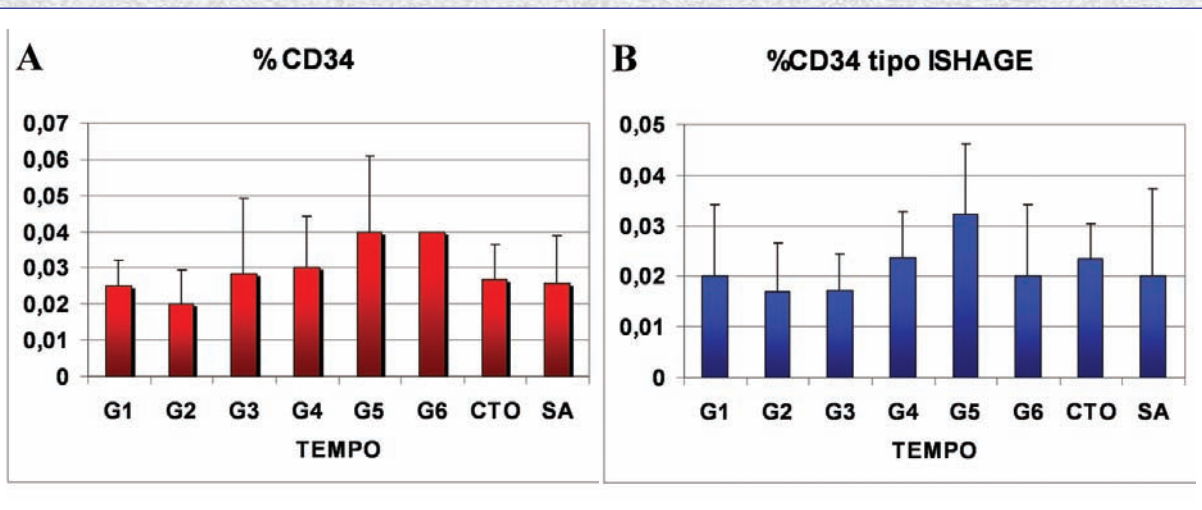
Periodico della Società Italiana di Citometria

*Studio dei progenitori emopoietici circolanti in pazienti con infarto del miocardio*

*Progenitori endoteliali circolanti nelle patologie neoplastiche e cardiovascolari*

*La Citometria a flusso nell'analisi di immunociti di mitilo*

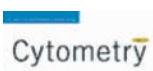
*Impiego del gene PIG-A come gene sentinella per la valutazione delle mutazioni indotte da raggi X su cellule congelate mediante Citometria a flusso*





ficare i pazienti con un maggiore rischio di ricaduta per i quali si possono adottare regimi di trattamento più intensi. Bisogna però sottolineare il fatto che allo stato attuale non vi sono sufficienti conoscenze su come prevenire le ricadute di malattia, che sono il principale ostacolo per il successo dell' HSCT. Diversi approcci per migliorare l'esito dei trapianti dovrebbero includere strategie pre- e post-trapianto quali una addizionale terapia citoriduttiva prima del trapianto, l'uso di anticorpi monoclonali quali imatinib prima e dopo HSCT in caso di ALL Philadelphia-positiva, nuovi analoghi della purina e protocolli di HSCT che favoriscano l'effetto graft-versus-leukemia.

**Francesco Lanza e Anna Lisa Pasini**  
[f.lanza@ospedale.cremona.it](mailto:f.lanza@ospedale.cremona.it)



**Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in Multiple Myeloma: the diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology.**

**Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, Hasserjian RP, Ferry JA, Dorn ME, Sadowski C, Bucci JJ, Carulli G and Preffer F.**

*Cytometry part B 2010, 78B,231-238*

In questo articolo viene proposto un nuovo metodo per definire le caratteristiche citofluorimetriche di normalità di plasmacellule policlonali normali (PCs) rispetto a PCs patologiche monoclonali in Mieloma; questa informazione risulta molto utile per discriminare tra PCs neoplastiche e PCs normali e reattive quando i risultati di clonalità della catena leggera delle immunoglobuline prodotte da PCs non sono chiari. La metodica tradizionale, descritta in letteratura, prevede che se il 20% delle cellule analizzate esprimono un marker di interesse, questo è considerato un valore soglia per definire un antigene come positivo o negativo ma, a questo proposito, in letteratura ci sono discrepanze su quale sia l'esatto fenotipo di PCs normali e neoplastiche; inoltre un rapporto  $\kappa/\lambda$  delle catene leggere delle immunoglobuline tra 0.5 e 3 definisce una PCs policlonale. La metodica citofluorimetrica, tra le varie metodiche di laboratorio per la valutazione del Mieloma a plasmacellule (PCM), consente di discriminare tra PCs normali, reattive e maligne, di valutare il rischio di progressione da MGUS (gammopatia monoclonale di incerto significato) a PCM, di fornire informazioni di natura prognostica, di valutare la malattia minima residua (MRD) e di identificare nuovi target terapeutici. Sono stati utilizzati 15 campioni di midollo da pazienti normali come controllo in cui sono state identificate PCs policlonali (CD19<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>) e sono stati raccolti invece i midolli di 46 pazienti con PCM. Per identificare le plasmacellule è stata usata la combinazione CD45-AmCyan-A, CD38-FITC, CD138PE.

% DI ESPRESSIONI DI ANTIGENI IN CAMPIONI DI CONTROLLO		
Antigeni	%	Range
CD19	86.6 ± 8.9	61-96
CD56	23.7 ± 11.1	2-45
CD27	93 ± 6.8	66-98
CD28	13.1 ± 8.3	0-27
CD33	9.3 ± 6.9	2-34
CD10	24.5 ± 18.6	0-55
CD20	56 ± 19.8	17-95
CD81	97.4 ± 3	87-100
Cyto- $\kappa$	48.1 ± 10.4	28-68
Cyto- $\lambda$	39.6 ± 11.8	16-63

In accordo con precedenti pubblicazioni, la maggior parte delle PCs normali esprimono CD19 e CD27 ma non CD33 né CD56; è stato comunque determinato un range variabile di espressione delle PCs normali tra gli antigeni studiati. Si è determinato se il range di espressione definito normale come criterio per valutare la presenza /assenza di malattia, sia correlato con l'analisi immunostochimica e si è osservato che CD19 e CD81 correlano meglio con i risultati istologici rispetto alla metodica tradizionale. I due metodi presentano circa la stessa correlazione con l'analisi istologica per CD27, CD56, CD28, CD20, CD33 e cyto- $\lambda$ . La metodica tradizionale sembra correlare meglio con l'istologia per cyto- $\kappa$  e CD10. Rispetto alla nuova metodica, cyto- $\lambda$ , CD19 e cyto- $\kappa$  concordano meglio con l'istologia, mentre CD27 e CD56 mostrano una simile moderata concordanza. Si è confermato che le catene leggere dell'immunoglobulina sono il principale antigene per determinare la presenza o l'assenza di malattia in PCM e il rapporto  $\lambda/\kappa$  compreso tra 0.5 e 3, rimane la metodica migliore per definire PCs normali. Dal punto di vista degli antigeni, la mancanza di espressione del CD19, antigene presente già negli stadi precoci di differenziazione della linea B, è utile per determinare la presenza di PCs neoplastiche. Il CD27 ha lo stesso ruolo del CD56 nel determinare la presenza di malattia e può essere considerato un antigene addizionale utile a questo proposito. CD56, che è una molecola di adesione coinvolta nell'ancoraggio delle PCs del mieloma allo stroma midollare, presenta un ampio range di espressione normale (0-47%) e la sua assenza è associata a infiltrati di PC extramidollari, malattia più aggressiva e prognosi sfavorevole.

L'espressione di CD20 risulta costante nei controlli con un ampio range di normalità (19-91%): CD20 sembra essere un antigene non significativo nel distinguere tra presenza e assenza di malattia.

Si può concludere che il nuovo metodo di espressione del "range di normalità" non risulta superiore al metodo tradizionale con soglia del 20% al fine di determinare la presenza di malattia in PCM: in particolare però, l'espressione del CD19 mostra una buona correlazione con la presenza di malattia con il metodo nuovo, per cui l'analisi citofluorimetrica potrebbe essere considerata

come un buon test di screening per determinare la presenza di plasmacellule neoplastiche.

**Francesco Lanza e Anna Lisa Pasini**  
[f.lanza@ospedale.cremona.it](mailto:f.lanza@ospedale.cremona.it)

### **Enumeration of the Absolute CD4 T-Lymphocyte Count by Cell-Bead Assay**

**Duangdao Nantakomol, Pornlada Nuchnoi, Egarit Noulsri, Surada Lerdwana, Sririma Krisin, Supantitra Chanprasert and Kovit Pattanapanyasat**  
*Cytometry Part B 78B:260-266, 2010*

Questo articolo del gruppo thailandese propone un metodo alternativo per il conteggio del numero assoluto dei linfociti CD4+, essenziale per il monitoraggio clinico del paziente HIV-positivo. Il gruppo mette a confronto il suo metodo con altri due approcci "commerciali": 1° metodo "lyse no wash" in tubi contenenti un numero noto di biglie liofilizzate (CLB); 2° metodo definito "flow rate-based calibration" (FR), si tratta di un approccio volumetrico che considera il volume di campione acquisito dallo strumento in 120 secondi e prevede l'utilizzo di biglie commerciali acquisite prima e dopo il campione. La strategia proposta dagli autori si ispira allo stesso principio del metodo FR, ma, anziché utilizzare biglie commerciali, impiega una preparazione di "cell bead", ovvero una sospensione di globuli rossi a concentrazione definita, che viene acquisita prima e dopo il campione in esame (FCB). Per confrontare l'approccio proposto con i metodi convenzionali di quantificazione dei linfociti TCD4+, il gruppo thailandese ha testato 20 campioni di soggetti sani e 80 campioni di pazienti HIV+, a diversi livelli di deplezione dei linfociti TCD4+, con le 3 diverse metodiche. Gli autori sostengono la validità del proprio sistema mostrando la mancanza di differenze statisticamente significative nelle determinazioni ottenute e soprattutto un'elevata correlazione tra i risultati ottenuti con FCB e le analisi con CLB. I vantaggi della proposta in esame sono di carattere squisitamente tecnico ed economico, infatti: a) l'utilizzo del metodo FCB rispetto a quello FB ha il vantaggio di non risentire delle differenze di viscosità che inevitabilmente sono da considerare nell'acquisizione di un campione biologico e della sospensione di biglie; b) rispetto all'approccio CLB la strategia proposta risulta meno laboriosa e meno costosa, in quanto le "cell bead" non vengono aggiunte in tutti i tubi. Il commento finale a questo lavoro metodologico, considerando l'importanza della determinazione dei linfociti CD4+ nei soggetti HIV-sieropositivi ai fini del management dell'infezione, è che l'utilizzo delle biglie commerciali risulta più laborioso e più costoso, ma le preparazioni di biglie godono della certificazione CE.

**Daniela Fenoglio**  
[daniela.fenoglio@unige.it](mailto:daniela.fenoglio@unige.it)

### **Godd cell, bad cell flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease**

**Pratip K. Chattopadhyay, Mario Roederer**  
*Cytometry Part A 77A:614-622, 2010*

Poche sono le malattie che hanno prodotto una mole di lavori scientifici quanto l'infezione da virus HIV-1, e la maggior parte di questi studi è profondamente legata allo sviluppo della citometria a flusso. In questa review Roederer e coll. rivedono la letteratura fiorita intorno ai dati citometrici sull'argomento ed analizzano in modo critico i numerosi markers proposti per l'analisi della componente linfocitaria T, dai marcatori di attivazione, a quelli di differenziazione, a quelli di senescenza, per terminare con le misure funzionali. I primi studi sull'argomento che impiegavano misure citometriche erano mirati a confermare la deplezione dei linfociti TCD4+, successivamente con il miglioramento tecnologico e l'ampliamento dei protocolli di indagine e dei reagenti a disposizione, i ricercatori hanno cercato di andare oltre per capire la biologia dell'infezione, e soprattutto per analizzare quali siano i cambiamenti che possono indicare la progressione della malattia. A questo scopo concordo con gli autori sull'importanza di inserire nel pannello dell'immunofenotipo marcatori utili per definire i livelli di attivazione dei linfociti T, in quanto l'"up-regolazione" di molecole come HLA-DR e CD38, può fornire la misura dei linfociti T attivati in vivo, chiara evidenza della progressione della malattia. Sicuramente meno indicativo è l'analisi dell'espressione di CD69, in quanto si tratta di un marker precoce e ad espressione transiente rispetto ad HLA-DR. Durante un'infezione cronica come quella da HIV occorre considerare anche il ruolo delle molecole costimolatorie molto importanti nel fornire il secondo segnale, che condiziona l'esito della risposta immune. Uno di questi marcatori è appunto la molecola CD28, la cui mancata espressione sui linfociti TCD8+ indica una popolazione senescente, con caratteristiche di anergia e con potenzialità regolatorie sulla funzione di altre cellule T, come è stato dimostrato da diversi lavori anche prodotti dal nostro gruppo. Meno chiarito è il ruolo dei segnali costimolatori negativi forniti dalle molecole PD-1 e CTLA-4, per i quali la letteratura a supporto è ancora scarsa.

Altro punto di discussione affrontato nel lavoro riguarda la difficoltà di definire dei marcatori di superficie idonei a discriminare i subsets T naive e memory, per i quali pare non esserci un consenso sull'espressione di particolari combinazioni di molecole che "fittino" con la definizione degli stati di maturazione (naive, central memory, effector memory, senescent/terminal), in quanto i marcatori proposti presentano un'espressione alquanto eterogenea. A questo riguardo l'unica osservazione comune ai diversi reports consiste nell'evidenza di una maggiore perdita di linfociti meno maturi ed un accumulo di cellule altamente differenziate durante l'infezione da HIV non-trattata, per cui gli autori propongono in modo minimale l'associazione di uno dei due classici markers di cellule T "antigen-experienced" (CD45RA o CD45RO), con due molecole chiave, quali CD127 (recettore per IL-7) e CD57 (marcatore di senescenza), per descrivere in modo strategico lo stato maturazionale del comparto T periferico. Coerentemente con le ultime conoscenze acquisite nel