

## LA CITOMETRIA A FLUSSO

Maurizio Bove, Paola Refoni



La citometria a flusso (o citofluorimetria) è una tecnica multiparametrica di laboratorio capace di analizzare, quantificare e separare cellule o microparticelle in una sospensione liquida. Negli ultimi anni questa tecnologia ha vissuto un'importante crescita nella diagnostica di laboratorio grazie a una continua innovazione tecnologica e alle molteplici applicazioni sia nella ricerca che nella diagnostica clinica (fig.1).

L'introduzione della citometria a flusso nella pratica clinica avvenne negli anni '70 e sin dall'inizio lo scopo dei ricercatori era quello di costruire un sistema capace di valutare più parametri cellulari contemporaneamente, superando quelli che erano i limiti della microscopia ottica. Il primo contatore di cellule fu

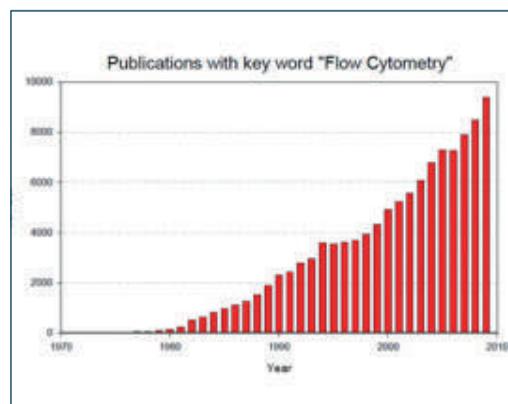


Fig.1: diagramma dell'interesse della ricerca scientifica per la citometria a flusso. Da J.Paul Robinson, Purdue University BMS 631 - LECTURE1.PPT

sviluppato da Moldovan nel 1934 e consisteva in un tubo capillare montato sotto un microscopio ottico con un rilevatore fotoelettrico che registrava la variazione della luce al passaggio di cellule colorate.

Nei successivi anni molti ricercatori si adoperarono per migliorare gli strumenti e, verso la fine degli anni '60, vide la luce il primo FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) capace di identificare e separare specifiche cellule. Negli anni '80 la metodica subì una importante implementazione tramite l'uso di anticorpi monoclonali capaci di "marcare", cioè identificare i linfociti T e i linfociti B. Sempre negli anni '80 la citofluorimetria fu utilizzata per lo studio del DNA da nuclei conservati in paraffina. (fig.2)

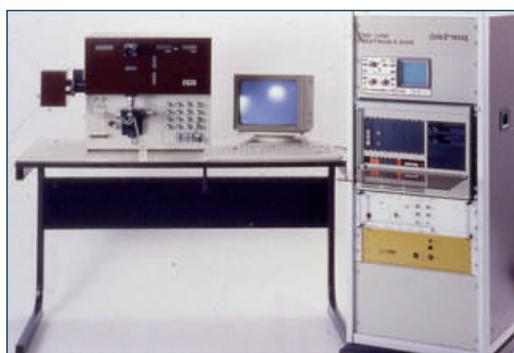


Fig. 2: il Partec PASII del 1979, uno dei primi citometri commercializzati. Da [www.cyto.purdue.edu](http://www.cyto.purdue.edu)

Nelle ultime decadi i progressi tecnologici e scientifici hanno portato alla creazione di strumenti sempre più piccoli e precisi, capaci di essere utilizzati anche in laboratori di base per esami routinari. Se in passato, infatti, era possibile identificare fino a 4 marcatori immunologici sulla stessa cellula, attualmente tramite citofluorimetri altamente complessi si possono individuare più di 10 antigeni in contemporanea. (fig.3) Oltre a strumenti capaci di riconoscere così tanti antigeni insieme, aumentando in modo significativo la sensibilità e specificità della metodica, negli ultimi 2 anni sono stati messi in commercio



Fig. 3: il citofluorimetro in uso presso la Bios SpA capace di valutare fino a 10 fluorescenze in contemporanea. Da [www.beckman.com](http://www.beckman.com)

strumenti completamente automatizzati per lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie che rendono possibile l'esecuzione di esami complessi e specialistici.

L'architettura di un citofluorimetro può essere, semplificando, paragonata a quella di un microscopio.

Le operazioni che vengono eseguite durante una analisi al microscopio (messa a fuoco, scelta dell'ingrandimento, tipo di sorgente luminosa, etc.) mirano a identificare la visione delle differenze morfologiche e di colorazione inter e intracellulari.

La citofluorimetria si differenzia dalla microscopia per l'elevato numero di cellule processabili in ogni sessione analitica, nonché per la tipologia di campione che deve essere una sospensione cellulare monodispersa (sono processabili anche tessuti solidi purchè le cellule che li compongono vengano portate in sospensione). La moderna citometria a flusso utilizza anticorpi monoclonali legati a fluorocromi che interagiscono con precise molecole sulla superficie o all'interno delle cellule bersaglio, dette antigeni. Sfruttando questo legame è possibile individuare se una determinata cellula abbia o meno un preciso antigene e quindi caratterizzarla.

All'interno del citofluorimetro le cellule marcate (sangue, midollo o altre sospensioni) sono trasportate in un condotto al cui interno vi è un liquido capace di separarle e ordinarle in una singola fila in modo da consentire a uno o più raggi laser di colpirne una alla volta. Dall'interazione delle cellule con il raggio luminoso vengono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche e dalla presenza di marcatori fluorescenti sulla superficie, nel citoplasma o nel nucleo della cellula.

I due segnali che permettono di identificare le caratteristiche fisiche delle popolazioni cellulari sono correlabili alle dimensioni e alla complessità delle cellule. Se si osserva una cellula "in controluce", si misura un segnale legato alla diffrazione (scatter) che è in relazione al diametro cellulare (Forward Scatter o FCS). Se ci si pone ortogonalmente al fascio, si misura un segnale legato sostanzialmente alla riflessione e alla rifrazione (Side Scatter o SSC) dovute alla granulosità cellulare, al rapporto nucleo/citoplasma e alla irregolarità della superficie cellulare.

Da questi due semplici parametri, analizzando un campione di sangue, la citometria a flusso permette di distinguere già le tre maggiori popolazioni leucocitarie come se le si guardasse a un microscopio (fig.4): i linfociti, che hanno piccole dimensioni e quasi assenza di complessità citoplasmatica; i monociti, che sono più grandi e hanno una complessità citoplasmatica intermedia; i granulociti (neutrofili ed eosinofili) che hanno dimensioni lievemente superiori ai monociti e una grande complessità citoplasmatica dovuta alle numerose granulazioni.

I marcatori legati a fluorocromi possono

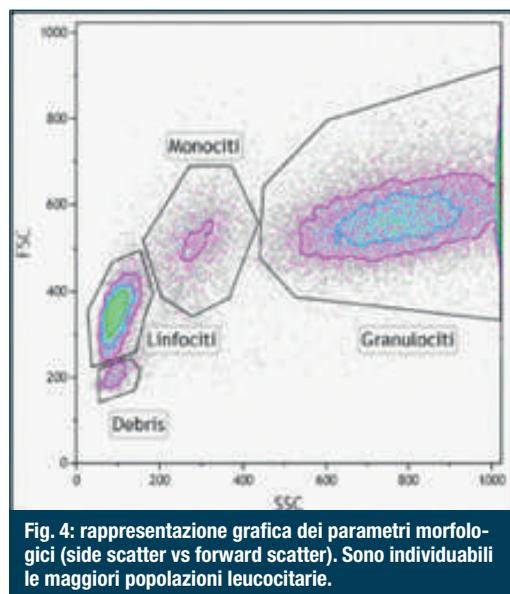


Fig. 4: rappresentazione grafica dei parametri morfologici (side scatter vs forward scatter). Sono individuabili le maggiori popolazioni leucocitarie.

dare ulteriori informazioni sul tipo cellulare sia nell'individuare fenotipi normali che patologici. La maggior parte degli anticorpi monoclonali utilizzati nella pratica clinica è rivolta verso antigeni conosciuti che rientrano in una nomenclatura adottata dal primo International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (Parigi, 1982) e definita "Cluster of Differentiation" o CD. Dal 1982 ad oggi sono state definite e studiate oltre 360 molecole che rientrano in questa nomenclatura. Uno dei più importanti antigeni utilizzati quotidianamente per studiare le cellule del sangue è il CD45, definito anche antigene "panleucocitario". Questa complessa molecola è presente su tutti i globuli bianchi con diverse intensità di espressione, cioè con diversa densità antigenica sulla superficie. Possiamo così distinguere ancor di più tutta una serie di popolazioni schematizzate in figura 4. Tramite un "dot plot" - rappresentazione grafica che confronta 2 parametri diversi - che paragona il CD45 al Side Scatter, il citometrista esperto può separare le popolazioni del

sangue e del midollo e arrivare a individuare una serie complessa di cellule anche patologiche come quelle che sono tipiche delle leucemie o dei linfomi. (fig. 5)

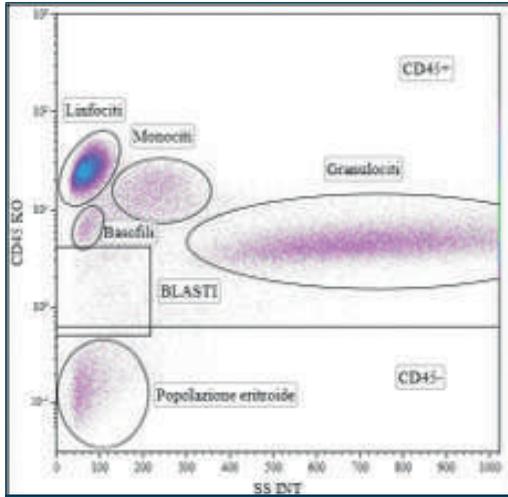


Fig. 5: rappresentazione grafica della correlazione tra CD45 e side scatter.

Proprio in ambito onco-ematologico la citometria a flusso ha visto la sua più grande espressione. Le ultime classificazioni internazionali delle neoplasie ematologiche (leucemie, linfomi, etc) hanno posto l'accento sull'importanza dello studio dell'immunofenotipo tramite citometria a flusso sia di cellule patologiche che normali nel percorso diagnostico multidisciplinare e integrato di queste

patologie. Il grande vantaggio della citofluorimetria, infatti, è quello di essere una tecnologia relativamente economica e dai tempi estremamente brevi rispetto ad altre metodiche, come la biologia molecolare, che hanno costi molto più alti e tempi decisamente più lunghi.

La maggior parte dei laboratori di analisi (pubblici e privati) utilizzano citofluorimetri con 2 laser e quindi capaci di individuare massimo 6 marcatori immunologici contemporaneamente sulla stessa cellula.

**La sezione di citofluorimetria della Bios SpA ha in uso un recente citofluorimetro con 3 laser capace di evidenziare sulla stessa cellula fino a 10 antigeni diversi.** La possibilità di analizzare così tanti antigeni insieme consente un aumento della sensibilità della metodica (paragonabile alla biologia molecolare) e una riduzione importante dei tempi lavorativi.

Questa mole di informazioni richiede personale con una solida esperienza generale riguardante le possibilità e i limiti della metodica, nonché una conoscenza approfondita delle caratteristiche clinico-biologiche delle malattie che si accinge a studiare. ■

Presso la Bios SpA di via Domenico Chelini 39, dal lunedì al venerdì, nella sezione di citofluorimetria si svolgono tutti gli esami citometrici.

**Per informazioni e prenotazioni: CUP 06 809641**