

## Citometria a flusso ed ematologia oncologica: un matrimonio sempre valido

Claudio Ortolani, Barbara Canonico, Stefano Papa

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino "Carlo Bo", Urbino

### ABSTRACT

**Flow cytometry and oncohematology: a relationship bound to last.** The contribution of flow cytometry to the diagnosis and follow-up of hematological neoplasms is of paramount importance and cannot be overstressed. Today, this relationship is not questioned and it is unlikely that the new molecular techniques will be able to replace it shortly. The reason of this long lasting success relies on the importance of phenotype in the diagnostic work-out, but above all on the flexibility of the technique, which is able to produce clinically relevant information in different situations, using smart fluorescence-based methods.

### INTRODUZIONE

Citometria a flusso ("flow cytometry", FCM) ed ematologia oncologica sono da tempo legate in un reciproco rapporto profondo e strettissimo, che affonda le sue radici nel fatto che la FCM rappresenta il metodo di scelta nella determinazione dell'immunofenotipo. Oggi ci si può chiedere se questo matrimonio è ancora stabile o la sua indissolubilità possa essere messa in dubbio dalle mutevoli condizioni in cui evolve il nostro approccio diagnostico verso le malattie del sangue e degli organi emopoietici. La risposta a questa domanda, che è l'argomento di questo contributo, non può prescindere da un'analisi delle ragioni storiche che hanno condotto a questa convergenza, né dalla consapevolezza degli scenari che stiamo per affrontare sotto la pressione dell'innovazione tecnologica.

### IMMUNOFENOTIPO E NEOPLASIE EMATOLOGICHE

La determinazione dell'immunofenotipo è divenuta parte integrante della classificazione delle neoplasie ematologiche ben prima della diffusione della FCM, quando ancora l'attribuzione di linea si basava sulla reazione alla mieloperossidasi o su esami più esoterici, quali la ricerca in microscopia a fluorescenza delle immunoglobuline di superficie o le tecniche di rosettazione con emazie di montone.

La prima classificazione "immunologica" è stata quella di Lukes e Collins comparsa nel 1974 (1), che

divideva le neoplasie linfoidi in forme derivate dai T o dai B linfociti e ne tentava una sistematizzazione sulla base di questi principi. A differenza di altre classificazioni, più gradite ai clinici ma biologicamente contraddittorie, come quella del "National Cancer Institute" basata su morfologia e comportamento clinico (2), le classificazioni immunologiche mantenevano la loro impostazione pur evolvendo rapidamente con l'accumularsi delle conoscenze. Questa coerenza era fondamentale dovuta al fatto che la valutazione del fenotipo permetteva di migliorare l'identificazione delle singole malattie e concorreva all'identificazione di nuove entità nosografiche non ancora perfettamente distinte da altre forme simili; in questo modo le classificazioni su basi immunologiche si trasformavano da uno strumento finalizzato alla dimostrazione di eventuali varietà biologiche di un processo patologico sostanzialmente omogeneo a un catalogo sempre più accurato di forme radicalmente diverse l'una dall'altra, ciascuna dotata di storia naturale, meccanismi etiopatogenetici e, in ultima analisi, suscettibilità alla terapia del tutto peculiari. Non è un caso che il nome della prima classificazione esplicitamente aderente a questo concetto sia stato REAL, gioco di parole tra l'acronimo di "Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms" e l'omonimo termine di lingua inglese, traducibile come "veramente esistente" (3). A un simile principio si richiamava anche la classificazione WHO, formulata originariamente nel 2001 e attualmente in uso nella sua quarta edizione del 2008 (Tabella 1) (4).

Negli stessi anni, un percorso analogo era seguito nel

Corrispondenza a: Claudio Ortolani, Università di Urbino "Carlo Bo", Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Campus Scientifico Enrico Mattei, via Cà Le Suore 2, 61029 Urbino. Tel. 3358076005, E-mail claudio.ortolani@gmail.com

Ricevuto: 14.02.2016

Revisionato: 17.03.2016

Accettato: 29.03.2016

Pubblicato on-line: 28.07.2016

DOI: 10.19186/BC\_2016.015

**Tabella 1***Classificazione dei linfomi non Hodgkin secondo la WHO (semplificata)*


---

Neoplasie dei precursori linfocitari
Leucemia/linfoma linfoblastico B
Leucemia/linfoma linfoblastico T
Neoplasie dei linfociti B maturi
Leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti
Leucemia a prolinfociti B
Linfoma splenico B della zona marginale
Leucemia a cellule capellute
Linfoma splenico B, inclassificabile
Linfoma linfoplasmacitico
Mieloma plasmacellulare/plasmacitoma
Linfoma extranodale della zona marginale (maltoma)
Linfoma nodale della zona marginale
Linfoma follicolare
Linfoma mantellare
Linfoma diffuso a grandi cellule B
Linfoma diffuso a grandi cellule B associato a infiammazione cronica
Linfoma a grandi cellule B primitivo mediastinico
Linfoma a grandi cellule B intravascolare
Linfoma a grandi cellule B ALK positivo
Linfoma plasmablastico
Linfoma primitivo delle effusioni cavitare
Linfoma di Burkitt
Neoplasie dei linfociti T e NK maturi
Leucemia a prolinfociti T
Leucemia a grandi linfociti granulari T
Disordini linfoproliferativi cronici delle cellule NK
Leucemia aggressiva a cellule NK
Linfoma/leucemia a cellule T dell'adulto
Linfoma extranodale a cellule NK/T "nasal type"
Linfoma a cellule T associato a enteropatia
Linfoma epatosplenico a cellule T
Linfoma sottocutaneo a cellule T "panniculitis-like"
Micosi fungoide e sindrome di Sezary
Disordini linfoproliferativi cutanei a cellule T CD30 positive
Linfoma primitivo cutaneo a cellule T con recettore $\gamma/\delta$
Linfoma periferico a cellule T, non altrimenti specificato
Linfoma angioimmunoblastico a cellule T
Linfoma anaplastico a grandi cellule ALK positivo

---

ALK, "anaplastic lymphoma kinase".

campo delle leucemie acute, che venivano ripensate alla luce delle acquisizioni che via via si accumulavano sull'argomento; a prescindere dalla divisione tra linfoblastiche T e B, la determinazione dell'immunofenotipo e la FCM, suo braccio armato, irrompevano sulla scena nell'identificazione delle

leucemie acute mieloidi con minimi segni di differenziazione, nonché di altre entità nosografiche, le quali, indagate con i soli strumenti della classificazione FAB (Franco-Americano-Britannica), senza la determinazione della loro linea di appartenenza, sarebbero state confuse con le leucemie linfoblastiche e

conseguentemente condannate a un regime terapeutico inappropriato; per non parlare di alcune forme particolari, come le leucemie acute delle cellule plasmacitoidi dendritiche (PDCL), che senza l'approccio fenotipico non sarebbero nemmeno state identificate come malattie distinte.

Con il trascorrere del tempo, la determinazione dell'immunofenotipo è stata rapidamente affiancata da una serie di altre indagini, all'inizio volte principalmente alla dimostrazione di anomalie cromosomiche ricorrenti in grado di concorrere all'identificazione di particolari varietà, e poi da una serie di tecnologie di biologia molecolare dedicate allo studio dei più intimi meccanismi eziopatogenetici. Come effetto di questa lunga evoluzione, nelle attuali classificazioni delle neoplasie del sistema emolinfopoietico la categorizzazione delle varie malattie si basa non solo su morfologia e immunofenotipo, ma anche su esami di citogenetica e di biologia molecolare, ed è stato persino preconizzato che, almeno in un gruppo di esse quale quello delle leucemie acute mieloidi, gli esami molecolari da soli stiano per divenire perfettamente sufficienti alla diagnosi, alla classificazione e al "follow-up" di ogni singolo diverso caso (5, 6).

Dobbiamo quindi considerare la crescente importanza delle tecniche di biologia molecolare come un'anticipazione del fatto che il matrimonio tra FCM ed ematologia oncologica stia per esaurire, o almeno indebolire, la propria ragione di essere? Nonostante l'incalzare delle nuove tecnologie, numerosi argomenti possono confutare questa ipotesi.

Il primo argomento è immediatamente evidente, anche se la sua ovvietà può paradossalmente impedirne il riconoscimento, e si basa sul fatto che genoma e proteoma sono cose diverse. Qualunque informazione possa fornire l'analisi del primo sarà sempre complementare e mai alternativa a quella fornita dall'analisi del secondo. Tipico esempio è la ricerca di eventuali bersagli per la terapia con anticorpi monoclonali: nel caso la loro presenza sia requisito irrinunciabile al trattamento, solamente l'analisi della loro presenza effettiva sarà in grado di consentire l'adozione della terapia. Ancora, solo un approccio "proteomico"

come quello basato sull'integrazione tra citometria multicolore e spettrometria di massa potrà consentire una precisa analisi delle proteine di superficie ("surfaceoma"), capace di identificare configurazioni fenotipiche di significato prognostico o di fungere da fenotipo leucemia-associato (7).

Il secondo argomento è meno palese e si basa sul fatto che le tecniche citometriche sono certamente le tecniche di scelta per l'esecuzione della ricerca dell'immunofenotipo, ma le informazioni che forniscono vanno ben oltre quelle riguardanti la mera espressione dell'antigene e comunque la ricerca dell'immunofenotipo non esaurisce il ventaglio delle applicazioni possibili.

Il terzo argomento è il più sottile e si basa sul fatto che la FCM, per la sua estrema flessibilità, costituisce una tecnica ancillare per eccellenza e come tale individua le ragioni della propria applicazione volta per volta, non tanto in funzione di regole generali che stanno alla base di un sistematico approccio alla patologia indagata, quanto in funzione delle peculiarità espresse da ogni singolo caso.

## FCM E IMMUNOFENOTIPO

Gli anni dell'ultimo ventennio del secolo scorso sono stati l'età d'oro delle tecniche di immunofenotipizzazione in ematologia oncologica. Questo momento di grande crescita è stato reso possibile dalla tumultuosa comparsa di anticorpi monoclonali capaci di identificare oltre 300 molecole di membrana espresse dalle cellule linfopoietiche normali e dalle loro controparti trasformate (8), ma soprattutto dalla scoperta che le varie forme morbose potevano essere associate a specifiche configurazioni fenotipiche in grado spesso di suggerire e talora di permettere la diagnosi definitiva. Questa serie di progressi si è tradotta nella formulazione di una collezione di profili fenotipici malattia-associati, che soprattutto nel caso delle malattie linfoproliferative croniche ritengono tuttora un ruolo diagnostico imprescindibile (Tabelle 2 e 3).

Il fatto che la FCM sia naturalmente in grado di analizzare campioni monodispersi, come quelli costituiti da sangue periferico o midollare, spiega con facilità

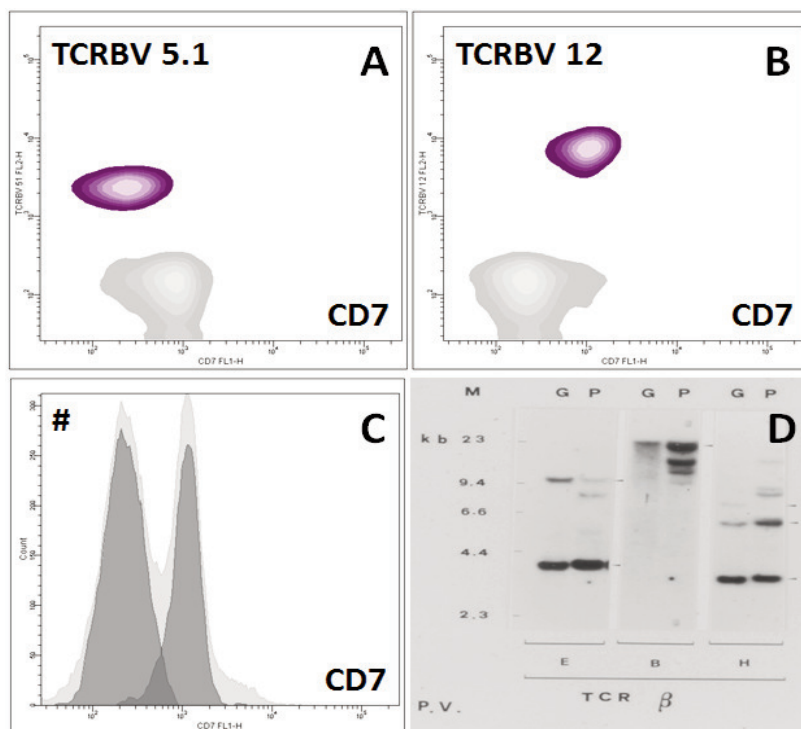
**Tabella 2**

*Fenotipi attesi in alcune neoplasie interessanti i B linfociti maturi*

	CD5	CD10	CD11c	CD20	CD23	CD25	CD38	CD103	CD138
Leukemia linfatica cronica a linfociti B	+	-	+/-	Debole	+	+/-	+/-	-	-
Linfoma linfoplasmacitoide	-	-	-	+	-	-	+	-	+/-
Leucemia linfatica cronica a prolinfociti B	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	-
Leucemia a cellule capellute	-	-	++	++	-	+	-	+	-
Linfoma mantellare	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Linfoma della zona marginale	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
Linfoma follicolare	-	+	-	++	-	-	+	-	-
Leucemia plasmacellulare	-	-	-	+/-	-	-	++	-	+
Linfoma di Burkitt	+/-	+	-	+	-	-	+	-	-

**Tabella 3**  
Fenotipi attesi in alcune neoplasie interessanti i T linfociti maturi

	Recettore	CD2	CD4	CD5	CD7	CD8	CD16	CD56	CD10	CD13	CD25	CD30	CD57	Antigene T intracellulare	Granzyme B	CD158k
Leucemia linfatica cronica a prolinfociti T	$\alpha\beta$	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucemia dei linfociti granulati T	$\alpha\beta$	+	-	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Linfoma intestinale a cellule T associato a enteropatia	$\alpha\beta$	+	-	+/-	+	+/-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Linfoma epatosplenico a cellule T	$\gamma\delta$	+	-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Linfoma simil-panniculifico a cellule T	$\gamma\delta$	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Sezary	$\alpha\beta$	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Linfoma angioimmunoblastico	$\alpha\beta$	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Linfoma anaplastico a grandi cellule	$\alpha\beta$	+/-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	+	+	-
Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto	$\alpha\beta$	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-



**Figura 1**  
 Nel campione di sangue periferico in esame la distribuzione di CD7 si risolve in due mode, ciascuna delle quali appare caratterizzata da un coefficiente di variazione anormalmente basso (riquadro C). Ambedue le mode si riferiscono a "subset" di linfociti ristretti per l'espressione di una diversa regione variabile della catena  $\beta$  del recettore per l'antigene dei T linfociti (riquadri A e B), dato che depone per un'inattesa omogeneità a carico delle popolazioni in oggetto. Un test in "Southern blot" eseguito sullo stesso campione confermava successivamente la clonalità dei due "subset" di T linfociti suggerita dai dati fenotipici (riquadro D).

l'enorme successo di questa tecnologia nello studio delle neoplasie ematologiche. A questo proposito vanno fatte alcune riflessioni.

A prescindere dalle considerazioni valide nello studio dei tessuti solidi, in cui lo stato di monodispersione necessario all'analisi preclude qualsiasi informazione riguardante la struttura del campione o la localizzazione topografica dell'antigene, la FCM non deve essere considerata come la semplice automazione della microscopia a fluorescenza. Ciò che la FCM permette di conoscere in una popolazione analizzata non è tanto l'espressione di un determinato marcatore, ma bensì la distribuzione della sua espressione; ciò permette di acquisire informazioni importantissime riguardanti non solo l'intensità di espressione, ma anche varie caratteristiche della popolazione analizzata, traducibili in informazioni di rilevanza biologica diretta, quali ad esempio la rilevazione di componenti diverse accomunate dalla presenza dello stesso marcatore espresso con diverse densità epitopiche o la presenza di popolazioni cellulari caratterizzate da anomala omogeneità di espressione (Figura 1).

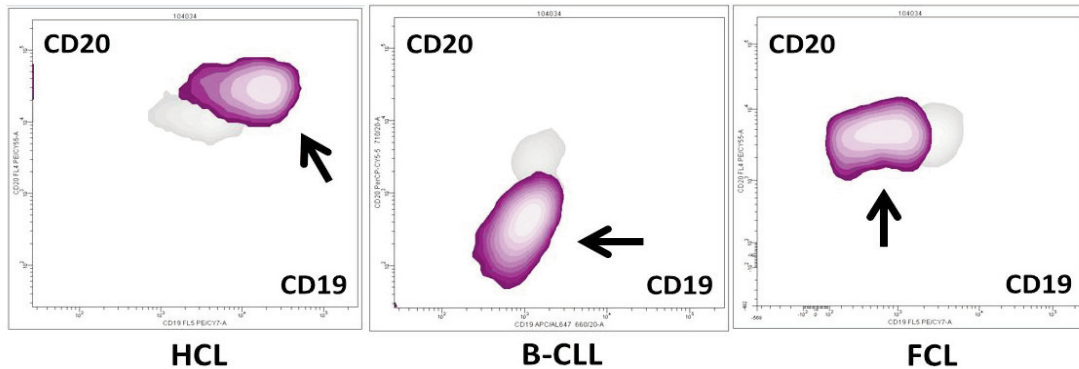
Oltre a questo dato fondamentale va poi considerato che, a differenza di altre tecniche di fenotipizzazione, tra cui segnatamente l'immunoistochimica, la FCM è un'analisi squisitamente multiparametrica, capace di produrre set di dati a elevata dimensionalità,

particolarmente adatti all'analisi multivariata, e come tale è una tecnica particolarmente informativa nello studio di campioni eterogenei e adatta all'implementazione di algoritmi di intelligenza artificiale.

Va infine ricordato che i set di dati in oggetto possono generare "output" grafici le cui caratteristiche sono funzione della distribuzione dei parametri esplorati ovvero dell'entità di espressione degli antigeni per cui il campione ha subito la marcatura. Dato che questi parametri tendono a ripetersi nelle diverse malattie, gli "output" grafici delle corse citometriche effettuate in queste condizioni assumono comportamenti caratteristici e ripetibili ed esprimono un valore informativo che dipende non tanto dalla quantizzazione percentuale dell'espressione dei marcatori, ma dall'analisi del "pattern" della loro presentazione, in modo concettualmente non dissimile a quanto si verifica in diagnostica per immagini nell'interpretazione di un dato radiologico (Figura 2).

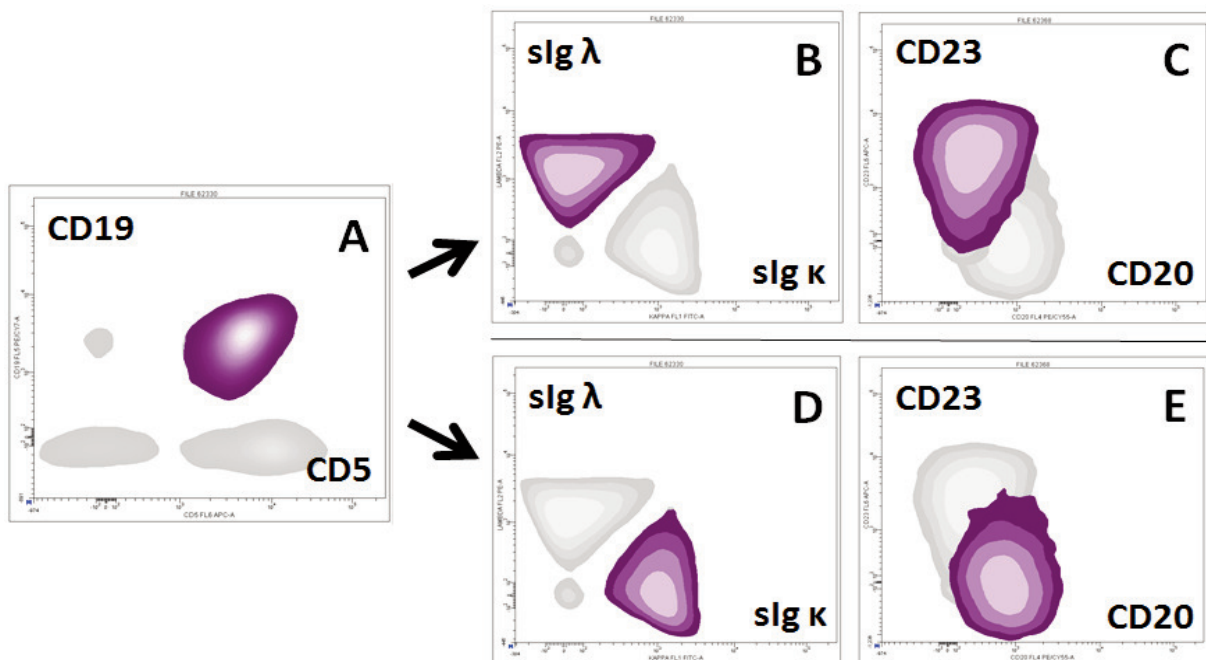
**FCM COME TECNICA ANCILLARE**

Al di là degli argomenti considerati finora, il vero punto di forza e motivo per cui la FCM mantiene e manterrà stretti i propri legami con la diagnostica oncematologica è la propria ancillarità, dove per ancillarità si intende la capacità di completare e integrare altre



**Figura 2**

Le 3 popolazioni patologiche di B linfociti indicate dalle frecce coesprimono tutti gli antigeni B-associati CD19 e CD20, ma si differenziano dai B linfociti normali di riferimento (in grigio nella figura) per le diverse intensità con cui lo fanno. Le 3 diverse posizioni così individuate dai B linfociti neoplastici nei rispettivi "output" grafici sono tipiche delle 3 diverse malattie linfoproliferative a cui appartengono, che nel caso specifico sono la leucemia a cellule capellute (HCL), caratterizzata da aumentata espressione di ambedue gli antigeni, la leucemia linfatica cronica a linfociti B (B-CLL), caratterizzata da ridotta espressione di CD20, e il linfoma follicolare (FCL), caratterizzato da ridotta espressione di CD19.



**Figura 3**

I B linfociti CD5 positivi (in viola nel riquadro A) si dividono in due popolazioni mutuamente esclusive, la prima ristretta per catene leggere  $\kappa$  (in viola nel riquadro D) e la seconda ristretta per catene leggere  $\lambda$  (in viola nel riquadro B). Un'analisi multiparametrica dimostra che la popolazione ristretta per catene  $\kappa$  esprime fenotipo "MCL-like" CD20+, CD23- (riquadro E), mentre quella ristretta per catene  $\lambda$  esprime fenotipo "B-CLL-like" CD20±, CD23+ (riquadro C).

tecniche e di adattarsi a una serie di peculiarità variabili caso per caso. Ciò significa che la FCM è in grado di fornire una serie di informazioni utilissime in situazioni mutevoli e imprevedibili, dipendenti non solo dalla patologia studiata, ma soprattutto dai rapporti tra paziente e malattia. Esempi di tali situazioni possono essere individuati nel contesto di presentazioni o recidive in distretti non canonici o di particolari esigenze di terapia o di monitoraggio, o di singoli casi

caratterizzati da storie naturali dal comportamento inaspettato.

Tipico esempio di grande (e sottoutilizzata) potenzialità della FCM è la sua utilizzazione nello studio dei campioni biologici diversi dal sangue periferico o midollare, con particolare attenzione ai campioni derivati da biopsia o da aspirato cavitario. A questo riguardo esiste ormai diffuso consenso che in questo contesto un uso critico della FCM è in grado di fornire importanti

informazioni, spesso equivalenti o superiori a quelle fornite dalle tecniche tradizionali e a volte non altrimenti attingibili (9-25).

Un altro caso è quello dell'evidenziazione di elementi rappresentativi del tumore troppo rari per essere apprezzati con altre tecniche, perché sommersi in una sproporzionata maggioranza di elementi fisiologici o reattivi. Questa situazione si configura tipicamente nello studio di campioni provenienti da linfomi nodali B ricchi di elementi T e/o istiocitari, in cui la componente B clonale è talora assolutamente minoritaria rispetto agli elementi non neoplastici (26), ma si incontra facilmente anche in tutte quelle situazioni in cui il campione presenti una numerosità così bassa da ostacolare il riconoscimento degli elementi diagnosticamente rilevanti, situazione che si esaspera quando essi siano accompagnati da altri elementi non patologici, ma di morfologia equivoca.

Altro caso classico è quello costituito dai linfomi compositi, in cui spesso la contemporanea presenza di più di una popolazione neoplastica risulta impossibile o estremamente difficile da riconoscere su di una base strettamente morfologica. I linfomi compositi costituiscono una realtà importante, sia perché la loro incidenza si aggira da 1% a ~5% di tutti i linfomi, sia perché la loro diagnosi è difficile da raggiungere con i metodi tradizionali (27-29). Questa situazione è dovuta a una serie di fattori spesso combinati fra di loro, tra cui la bassa numerosità di una delle componenti, non immediatamente in grado di perturbare l'architettura del pezzo in modo significativo, e l'incapacità dell'immunoistochimica di mettere in evidenza differenze nell'intensità di espressione di antigeni eventualmente condivisi da due (o più) popolazioni patologiche. Quest'ultima evenienza è particolarmente vera nei casi che vedono la contemporanea presenza di popolazioni con fenotipo rispettivamente simile a quello atteso nella leucemia linfatica cronica a B linfociti (fenotipo "B-CLL-like") e a quello atteso nel linfoma mantellare (fenotipo

"MCL-like") (Figura 3) (30). In questi casi la disponibilità di trattamenti biologici personalizzati rende molto importante il raggiungimento di una diagnosi corretta (31) ed è stato ampiamente dimostrato che la FCM costituisce una componente insostituibile dell'approccio multidisciplinare necessario al corretto inquadramento del paziente (28, 32-35).

Un altro caso ancora si verifica spesso nello studio del liquido cerebrospinale durante le procedure previste dalla stadiazione e dal "follow-up" delle leucemie linfoblastiche acute. Meno frequente, ma sempre di grande rilevanza, è il caso di liquidi biologici contenenti elementi morfologicamente in grado di entrare in diagnosi differenziale con cellule del sistema emolinfopoietico, ma derivati da neoplasie di altri tessuti, come nel caso dei neuroblastomi o di altri tumori a piccole cellule (36, 37). Ma forse l'esempio più convincente riguardante le capacità sussidiarie delle tecniche citometriche è quello costituito dal loro ruolo nella valutazione della malattia minima residua (MRD), procedura non più confinata alla ricerca, ma parte integrante del trattamento nei soggetti con leucemia linfoblastica acuta (38), a breve destinata a diventare routinaria nei soggetti con mieloma multiplo (39, 40) e B-CLL (41, 42), e suscettibile a essere introdotta quanto prima nei protocolli terapeutici della leucemia mieloide acuta, del linfoma follicolare e del linfoma mantellare (43-49). La MRD può essere esplorata con tecniche sia molecolari che citometriche ed esiste tuttora un dibattito su quale scelta costituisca il miglior compromesso tra vantaggi e svantaggi correlati alle due metodiche in termini di sensibilità, difficoltà di standardizzazione, ripetibilità, difficoltà di esecuzione, tempi tecnici e costi globali (Tabella 4). Il risultato della competizione fra le diverse tecnologie è costantemente influenzato dai progressi tecnologici. Tecniche standard di FCM garantiscono una sensibilità pari a  $10^{-4}$ , con costi e tempi soddisfacenti (50), ma le nuove tecniche di analisi citometrica policromatica accompagnate da adeguate

**Tabella 4**

*Confronto tra citometria multicolore e biologia molecolare nella determinazione della malattia minima residua in onco-ematologia*

	Citometria multicolore	Biologia molecolare
Razionale	Presenza di fenotipi associati alla neoplasia	Presenza di riarrangiamenti o di aberrazioni genetiche associate alla neoplasia
Applicabilità teorica	B-ALL >95%, T-ALL >90%, MM e B-CLL ≈ 100%	ALL e CLPD >95%
Sensibilità	Da 1 su $10^{-4}$ a 1 su $10^{-5}$	Da 1 su $10^{-4}$ a 1 su $10^{-6}$
Costi	Relativamente bassi	Elevati
Tempi di esecuzione	Bassi	Elevati
Difficoltà tecnica	Relativamente bassa	Elevata
Standardizzazione	In atto	Al momento non disponibile
Validazione clinica	In corso	In corso
Possibilità di VEQ	Disponibile	Al momento non disponibile

*B-ALL, leucemia linfoblastica B; T-ALL, leucemia linfoblastica T; MM, mieloma multiplo; B-CLL, leucemia linfatica cronica a linfociti B; ALL, leucemia linfoblastica acuta non ulteriormente specificata; CLPD, malattia linfoproliferativa cronica.*

tecniche di analisi dei dati permettono in questi casi una sensibilità non inferiore a  $10^{-5}$  nei casi più favorevoli (38, 51), sensibilità suscettibile di aumentare ulteriormente con la comparsa di citometri capaci di portare oltre a 10 il numero degli antigeni indagabili contemporaneamente (38).

Sebbene la sensibilità appaia inferiore di una decade rispetto a quella teoricamente ottenibile con le tecniche di biologia molecolare, questo svantaggio appare ampiamente compensato dalle caratteristiche di velocità e praticità della citometria, che, unitamente al costo molto più basso e ai buoni risultati dei tentativi di standardizzazione interlaboratorio, candidano progressivamente questa metodica come tecnica di prima scelta, una posizione che sembra essere messa in pericolo solo dalla recente comparsa delle tecniche di "next-generation sequencing", che si sono già dimostrate particolarmente promettenti nell'uso del riarrangiamento dei geni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline nello studio della MRD dei pazienti con mieloma multiplo (52).

#### FCM OLTRE L'IMMUNOFENOTIPO

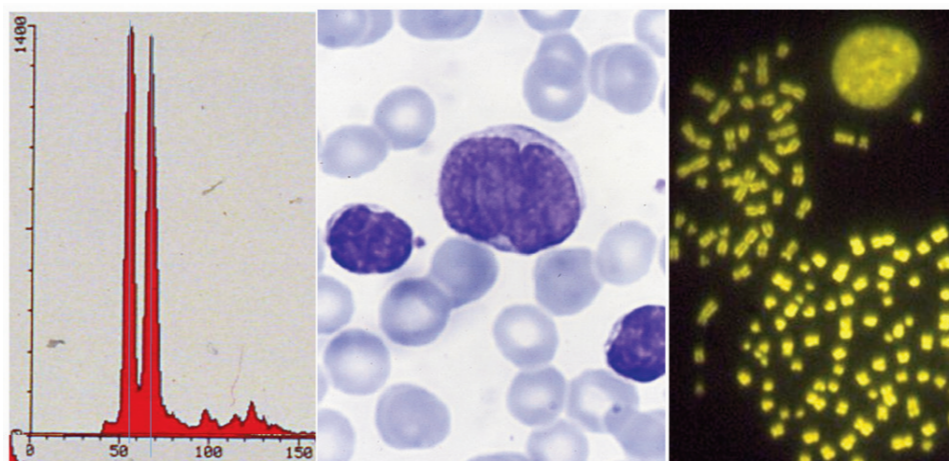
Ancorché rappresenti l'uso principale della metodica, la ricerca dell'immunofenotipo non costituisce l'unico impiego della FCM applicata alla ematologia oncologica. L'estrema flessibilità della citometria permette di utilizzare una serie di sonde diverse, accomunate dalle caratteristiche di emettere un segnale di fluorescenza e dalla capacità di fornire informazioni di rilevanza clinica relative alla patologia indagata (53).

Una funzione ampiamente indagata in passato è

stata la cosiddetta "multi drug resistance" (MDR) ovvero la capacità delle cellule neoplastiche di resistere all'azione terapeutica di un farmaco contrastandone l'ingresso mediante l'azione di pompe di membrana. Nel modello analitico più diffuso, la MDR viene valutata in citometria misurando la capacità di cellule isolate di estrarre alcune particolari molecole, come la rodamina 123 (54). Sebbene la modulazione della MDR *in vivo* non abbia fornito risultati apprezzabili da un punto di vista clinico (55, 56), riducendo quindi l'interesse per lo studio di questo fenomeno biologico (57), lo studio dell'attività delle proteine appartenenti al gruppo dell'"ATP binding cassette (ABC) transporter" sembra in grado di produrre informazioni di valore prognostico in un sottogruppo di soggetti affetti da leucemia mieloide acuta (58, 59).

Un altro parametro di grande importanza è lo studio del contenuto del DNA, utile sia in studi di cinetica cellulare che nella valutazione della ploidia. È interessante notare che la valutazione della ploidia ha conosciuto momenti di grande successo nello studio dei tumori solidi, dove ha dimostrato di essere dotata di valore prognostico in una serie di malattie, tra cui carcinoma dell'endometrio, carcinoma gastrico, carcinoma del colon, carcinoma della prostata, carcinoma del polmone e carcinoma della mammella (60-65).

Passata alquanto in secondo piano nello studio dei tumori solidi perché oscurata dal crescente interesse verso altri marcatori di maggior rilevanza prognostica, la valutazione della ploidia ha mantenuto la sua potenziale utilità nella caratterizzazione delle neoplasie ematologiche e ciò per un duplice motivo, ovvero l'estrema facilità della sua determinazione citometrica e



**Figura 4**

*Determinazione del contenuto di DNA dei linfociti periferici (riquadro a sinistra) di un soggetto affetto da linfoma cutaneo T con grandi cellule circolanti a nucleo convoluto (riquadro centrale). Sono evidenti due picchi, il primo riferibile alla popolazione normale e il secondo riferibile alla popolazione neoplastica. Ancorché il rapporto tra i canali dei due picchi (DNA index) sia caratterizzato da un valore vicino a uno, l'analisi citogenetica convenzionale eseguita sullo stesso campione mette in evidenza la coesistenza di una linea tetraploide (riquadro a destra), che confrontata con la linea diploide dovrebbe per definizione fornire un DNA index pari a due. La discrepanza è probabilmente da imputarsi al fatto che, come apprezzabile nella figura, i cromosomi delle cellule tetraploidi presentano una maggior compattazione cromatinica, suscettibile di modulare negativamente l'assunzione del propidio ioduro usato nella marcatura del DNA.*

la sua utilità nella diagnosi di determinate entità nosografiche, tra cui ad esempio la leucemia B linfoblastica iperdiploide e la leucemia B linfoblastica ipodiploide, che proprio sulla presenza della aneuploidia basano la propria categorizzazione come entità distinte comprese nel gruppo delle leucemie acute caratterizzate da anomalie cromosomiche ricorrenti (66), o i mielomi multipli, in cui spesso è segnalata la presenza di popolazioni aneuploidi (67).

Pur con tutte le riserve dovute alla differenza concettuale tra ploidia citogenetica, che prende in considerazione il numero di cromosomi, e ploidia citometrica, che prende in considerazione la quantità di DNA, non vi è dubbio che quest'ultima possa giocare un ruolo non secondario in casi selezionati, quali la caratterizzazione della leucemia linfoblastica B, la diagnosi differenziale tra neoplasie plasmacellulari e linfomi a basso grado con differenziazione plasmacitica, la diagnosi differenziale tra monocitosi reattive e monocitosi neoplastiche, la caratterizzazione delle neoplasie plasmacellulari e la diagnosi e la stadiazione della malattia di Sézary (66, 68-77).

Va poi ricordato che non solo nei tumori solidi ma anche in ematologia oncologica la determinazione della ploidia citometrica può dimostrare correlazione con particolari significati prognostici, anche al di là dell'ovvia corrispondenza tra iperdiploidia citometrica e iperdiploidia cromosomica. È noto infatti che nella leucemia linfoblastica B la ploidia possiede un buon significato prognostico, tanto migliore quanto maggiore è il DNA index (78-81). Anche nel mieloma multiplo i casi con iperdiploidia citometrica presentano buona prognosi, mentre i casi ipodiploidi presentano prognosi peggiore (67). È importante tener conto del fatto che in questo contesto la validità delle informazioni fornite dallo studio del DNA si basa sulla stechiometricità del legame tra sonda e acido nucleico. Dato che ciò non sempre si verifica, grande attenzione deve essere sempre profusa in questo contesto nella validazione degli studi di ploidia citometrica, che ove possibile dovrebbero essere integrati da studi citogenetici (Figura 4).

Le considerazioni riportate in questo contributo ci dicono che le voci di un divorzio imminente tra FCM e diagnostica onco-ematologica sono infondate e che la FCM continuerà a giocare un ruolo fondamentale nei laboratori clinici che eseguono esami di ematologia di II livello. Independentemente da quali saranno i mutamenti che saremo chiamati ad affrontare, dobbiamo continuare nel nostro impegno quotidiano finalizzato alla formazione e alla standardizzazione di questa affascinante metodologia analitica.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lukes R, Collins R. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974;34:1488-503.
2. National Cancer Institute. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. *Cancer* 1982;49:2112-35.
3. Harris N, Jaffe E, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-92.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: WHO, 2008.
5. Godley LA. Profiles in leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1152-3.
6. Kuhn A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol* 2012;96:153-63.
7. Mirkowska P, Hofmann A, Sedek L, et al. Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features. *Blood* 2013;121:e149-59.
8. Clark G, Engel P, Boumsell L, et al. CD Nomenclature 2015: human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology. *J Immunol* 2015;195:4555-63.
9. Nicol T, Silberman M, Rosenthal D, et al. The accuracy of combined cytopathologic and flow cytometric analysis of fine-needle aspirates of lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 2000;114:18-28.
10. Siebert J, Weeks L, List L, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis and classification of lymphoma in community hospital clinical needle aspiration/biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1792-9.
11. Liu K, Stern R, Rogers R, et al. Diagnosis of hematopoietic processes by fine-needle aspiration in conjunction with flow cytometry: A review of 127 cases. *Diagn Cytopathol* 2001;24:1-10.
12. Zeppa P, Picardi M, Marino G, et al. Fine-needle aspiration biopsy and flow cytometry immunophenotyping of lymphoid and myeloproliferative disorders of the spleen. *Cancer* 2003;99:118-27.
13. Bakker-Jonges L, Lugtenburg P, Van Lom K, et al. Additional role for flow cytometric immunophenotyping in staging of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004;18:230.
14. Ravoyet C, Demartin S, Gerard R, et al. Contribution of flow cytometry to the diagnosis of malignant and non malignant conditions in lymph node biopsies. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1587-93.
15. Zeppa P, Marino G, Troncone G, et al. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2004;102:55-65.
16. Jorgensen J. State of the Art Symposium: Flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration. *Cancer* 2005;105:443-51.
17. El-Sayed AM, El-Borai MH, Bahnassy AA, et al. Flow cytometric immunophenotyping (FCI) of lymphoma: correlation with histopathology and immunohistochemistry. *Diagn Pathol* 2008;3:43.
18. Talaulikar D, Shadbolt B, Dahlstrom JE, et al. Routine use of ancillary investigations in staging diffuse large B-cell lymphoma improves the International Prognostic Index (IPI). *J Hematol Oncol* 2009;2:49.
19. Merli M, Arcaini L, Boveri E, et al. Assessment of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphomas: comparison between histology and flow cytometry. *Eur J Haematol* 2010;85:405-15.
20. Paro MM, Siftar Z, Kardum-Skelin I, et al. Flow cytometry

- immunophenotyping (FCI) of fine needle aspirates (FNAs) of lymph nodes. *Coll Antropol* 2010;34:359-65.
21. Savage EC, Vanderheyden AD, Bell AM, et al. Independent diagnostic accuracy of flow cytometry obtained from fine-needle aspirates: a 10-year experience with 451 cases. *Am J Clin Pathol* 2011;135:304-9.
  22. Tembhare P, Yuan CM, Morris JC, et al. Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by  $v\beta$  repertoire analysis in fine-needle aspirates and cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol* 2012;137:220-6.
  23. Demurtas A, Stacchini A, Aliberti S, et al. Tissue flow cytometry immunophenotyping in the diagnosis and classification of non-Hodgkin's lymphomas: A retrospective evaluation of 1,792 cases. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:82-95.
  24. Stacchini A, Aliberti S, Pacchioni D, et al. Flow cytometry significantly improves the diagnostic value of fine needle aspiration cytology of lymphoproliferative lesions of salivary glands. *Cytopathology* 2014;25:231-40.
  25. Stacchini A, Pacchioni D, Demurtas A, et al. Utility of flow cytometry as ancillary study to improve the cytologic diagnosis of thyroid lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88:320-9.
  26. Caraway N. Strategies to diagnose lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration by using ancillary studies. *Cancer* 2005;105:432-42.
  27. Kim H. Composite lymphoma and related disorders. *Am J Clin Pathol* 1993;99:445-51.
  28. Demurtas A, Aliberti S, Bonello L, et al. Usefulness of multiparametric flow cytometry in detecting composite lymphoma: study of 17 cases in a 12-year period. *Am J Clin Pathol* 2011;135:541-55.
  29. Mahdi T, Rajab A, Porwit A. Frequency of lymphoproliferative disorders with more than one malignant cell population as detected by 10-color flow cytometry. *Cytometry Part B* 2013;84B:414-5.
  30. Hoeller S, Zhou Y, Kanagal-Shamanna R, et al. Composite mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic and molecular study. *Hum Pathol* 2013;44:110-21.
  31. Hussein S, Gill K, Baer LN, et al. Practical diagnostic approaches to composite plasma cell neoplasm and low grade B-cell lymphoma/clonal infiltrates in the bone marrow. *Hematol Oncol* 2015;33:31-41.
  32. Duque R, Everett E, Iturraspe J. Biclinal composite lymphoma. A multiparameter flow cytometric analysis. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:176-9.
  33. Dunphy C, Craver J, Emerson W. Demonstration of composite nodal B-cell lymphoma and subsequent Hodgkin's disease by flow cytometry and immunohistochemistry. Case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:637-40.
  34. Siebert JD, Mulvaney DA, Vukov AM, et al. Utility of flow cytometry in subtyping composite and sequential lymphoma. *J Clin Lab Anal* 1999;13:199-204.
  35. Martinez A, Aymerich M, Castillo M, et al. Routine use of immunophenotype by flow cytometry in tissues with suspected hematological malignancies. *Cytometry* 2003;56B:8-15.
  36. Chang A, Benda P, Wood B, et al. Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2003;119:643-55.
  37. Cornfield D, Liu Z, Gorczyca W, et al. The potential role of flow cytometry in the diagnosis of small cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:461-4.
  38. van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, et al. lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015;125:3996-4009.
  39. Paiva B, Puig N, Garcia-Sanz R, et al. Is this the time to introduce minimal residual disease in multiple myeloma clinical practice? *Clin Cancer Res* 2015;21:2001-8.
  40. Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 2015;125:1932-5.
  41. Stehlikova O, Chovancova J, Tichy B, et al. Detecting minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia using 8-color flow cytometry protocol in routine hematological practice. *Int J Lab Hematol* 2014;36:165-71.
  42. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al. A complementary role of multiparameter flow-cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease (MRD) detection in chronic lymphocytic leukemia (CLL): An European research initiative on CLL (ERIC) study. *Leukemia* 2016;30:929-36.
  43. Ladetto M, Lobetti-Bodoni C, Mantoan B, et al. Persistence of minimal residual disease in bone marrow predicts outcome in follicular lymphomas treated with a rituximab-intensive program. *Blood* 2013;122:3759-66.
  44. Kayser S, Schlenk RF, Grimwade D, et al. Minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 2015;125:2331-5.
  45. Kohnke T, Sauter D, Ringel K, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia* 2015;29:377-86.
  46. Liu HT, Stock W. Is it time to use minimal residual disease to stratify post-remission treatment for acute myeloid leukemia? *Leuk Lymphoma* 2015;56:3005-7.
  47. Araki D, Wood BL, Othus M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: time to move toward a minimal residual disease-based definition of complete remission? *J Clin Oncol* 2016;34:329-36.
  48. Cheminant M, Derriex C, Touzart A, et al. Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA study. *Haematologica* 2016;101:336-45.
  49. Chovancova J, Bernard T, Stehlikova O, et al. Detection of minimal residual disease in mantle cell lymphoma-establishment of novel eight-color flow cytometry approach. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88:92-100.
  50. Fossat C, Roussel M, Arnoux I, et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: A french multicenter study. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88:21-9.
  51. Di Giuseppe JA, Tadmor MD, Pe'er D. Detection of minimal residual disease in B lymphoblastic leukemia using viSNE. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88:294-304.
  52. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123:3073-9.
  53. Zhang P, Zhao N, Zeng Z, et al. Using an RNA aptamer probe for flow cytometry detection of CD30-expressing lymphoma cells. *Lab Invest* 2009;89:1423-32.
  54. Ludescher C, Gatringer C, Drach J, et al. Rapid functional assay for the detection of multidrug-resistant cells using the fluorescent dye rhodamine 123. *Blood* 1991;78:1385-7.
  55. Cripe LD, Uno H, Paietta EM, et al. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute

- myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood* 2010;116:4077-85.
56. Kolitz JE, George SL, Marcucci G, et al. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood* 2010;116:1413-21.
  57. Libby E, Hromas R. Dismounting the MDR horse. *Blood* 2010;116:4037-8.
  58. Kim D, Lee N, Sung W, et al. Multidrug resistance as a potential prognostic indicator in acute myeloid leukemia with normal karyotypes. *Acta Haematol* 2005;114:78-83.
  59. Yuan X, Koehn J, Hogge DE. Identification of prognostic subgroups among acute myeloid leukemia patients with intermediate risk cytogenetics using a flow-cytometry-based assessment of ABC-transporter function. *Leuk Res* 2015;39:689-95.
  60. Susini T, Amunni G, Molino C, et al. Ten-year results of a prospective study on the prognostic role of ploidy in endometrial carcinoma: DNA aneuploidy identifies high-risk cases among the so-called 'low-risk' patients with well and moderately differentiated tumors. *Cancer* 2007;109:882-90.
  61. Abad M, Ciudad J, Rincon M, et al. DNA aneuploidy by flow cytometry is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 1998;16:223-31.
  62. Bauer KD, Bagwell CB, Giaretti W, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 1993;14:486-91.
  63. Schroder F, Tribukait B, Bocking A, et al. Clinical utility of cellular DNA measurements in prostate carcinoma. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. Stockholm, Sweden, May 12-13, 1993. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1994;162:51-63.
  64. Salvati F, Teodori L, Trinca M, et al. The relevance of flow-cytometric DNA content in the evaluation of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994;120:233-9.
  65. Hedley D, Clark G, Cornelisse C, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry* 1993;14:482-5.
  66. Borowitz MJ, Chan JK. B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. Lyon: WHO, 2008:171-5.
  67. San Miguel J, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, et al. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996;23:33-41.
  68. Martin PL, Look AT, Schnell S, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:113-21.
  69. Perez-Vera P, Frias S, Carnevale A, et al. A strategy to detect chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:294-300.
  70. Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, et al. DNA index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *Int J Lab Hematol* 2010;32:288-98.
  71. Rosado FG, Morice WG, He R, et al. Immunophenotypic features by multiparameter flow cytometry can help distinguish low grade B-cell lymphomas with plasmacytic differentiation from plasma cell proliferative disorders with an unrelated clonal B-cell process. *Br J Haematol* 2015;169:368-76.
  72. Azoulay D, Chezaz J, Shaul E, et al. Reactive or malignant monocytosis? The importance of DNA analysis in diagnostic flow cytometry. *Cytometry Part B* 2013;84B:402.
  73. Nowak R, Oelschlagel U, Range U, et al. Flow cytometric DNA quantification in immunophenotyped cells as a sensitive method for determination of aneuploid multiple myeloma cells in peripheral blood stem cell harvests and bone marrow after therapy. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:895-900.
  74. Lima M, Teixeira M, Fonseca S, et al. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:634-45.
  75. Palmer H, Wilson C, Bardales R. Cytology and flow cytometry of malignant effusions of multiple myeloma. *Diagn Cytopathol* 2000;22:147-51.
  76. Bai SX, Pan JL, Xue YQ, et al. Clinical and experimental study of a multiple myeloma case with low hypodiploidy. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012;29:343-6.
  77. Wang S, Li N, Heald P, et al. Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with Sezary syndrome: detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue. *Am J Clin Pathol* 2004;122:774-82.
  78. Look A, Roberson P, Williams D, et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985;65:1079-86.
  79. Trueworthy R, Shuster J, Look T, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10:606-13.
  80. Forestier E, Holmgren G, Roos G. Flow cytometric DNA index and karyotype in childhood lymphoblastic leukemia. *Anal Cell Pathol* 1998;17:145-56.
  81. Dastugue N, Suci S, Plat G, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood* 2013;122:2415-23.