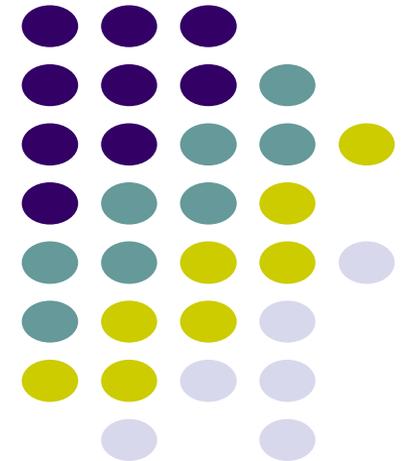
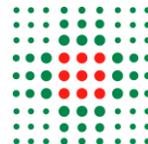


Citofluorimetria

Prof. Gian Matteo Rigolin
Ematologia
Azienda Ospedaliero Universitaria
Arcispedale S. Anna Ferrara



università di ferrara
DA SEICENTO ANNI GUARDIAMO AVANTI.



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Ferrara

Definizione



- la FCM è una metodica di laboratorio che misura le caratteristiche fisico/chimiche delle cellule o di altre particelle biologiche.
- Consiste nell'analisi delle caratteristiche fisiche (dimensioni, complessità strutturale, etc) e di espressione di antigeni di superficie, citoplasmatici o nucleari mediante il legame con anticorpi coniugati con marcatori fluorescenti
- tali misurazioni vengono eseguite su cellule/particelle mentre passano attraverso un apparato di misurazione sospese in un liquido fluidico.

Anticorpi monoclonali



- I progressi della FCM non sarebbero possibili senza lo sviluppo degli **anticorpi monoclonali**.
- Anticorpi monoclonali: anticorpi identici fra loro in grado di legare specificamente un determinato antigene.
- Vengono prodotti con la tecnologia degli **ibridomi** sviluppata nel 1975 da Köhler e Milstein e che ha portato all'assegnazione del Premio Nobel

Ibridomi e anticorpi monoclonali



- Un ibridoma si ottiene unendo 2 cellule:
 - Una cellula del sistema immune che ha la capacità di secernere anticorpi
 - Una cellula immortalizzata di solito appartenente a una linea cellulare neoplastica
- La cellule che si ottiene può essere clonata all'infinito producendo infinite cellule figlie, ciascuna in grado di produrre lo stesso anticorpo monoclonale

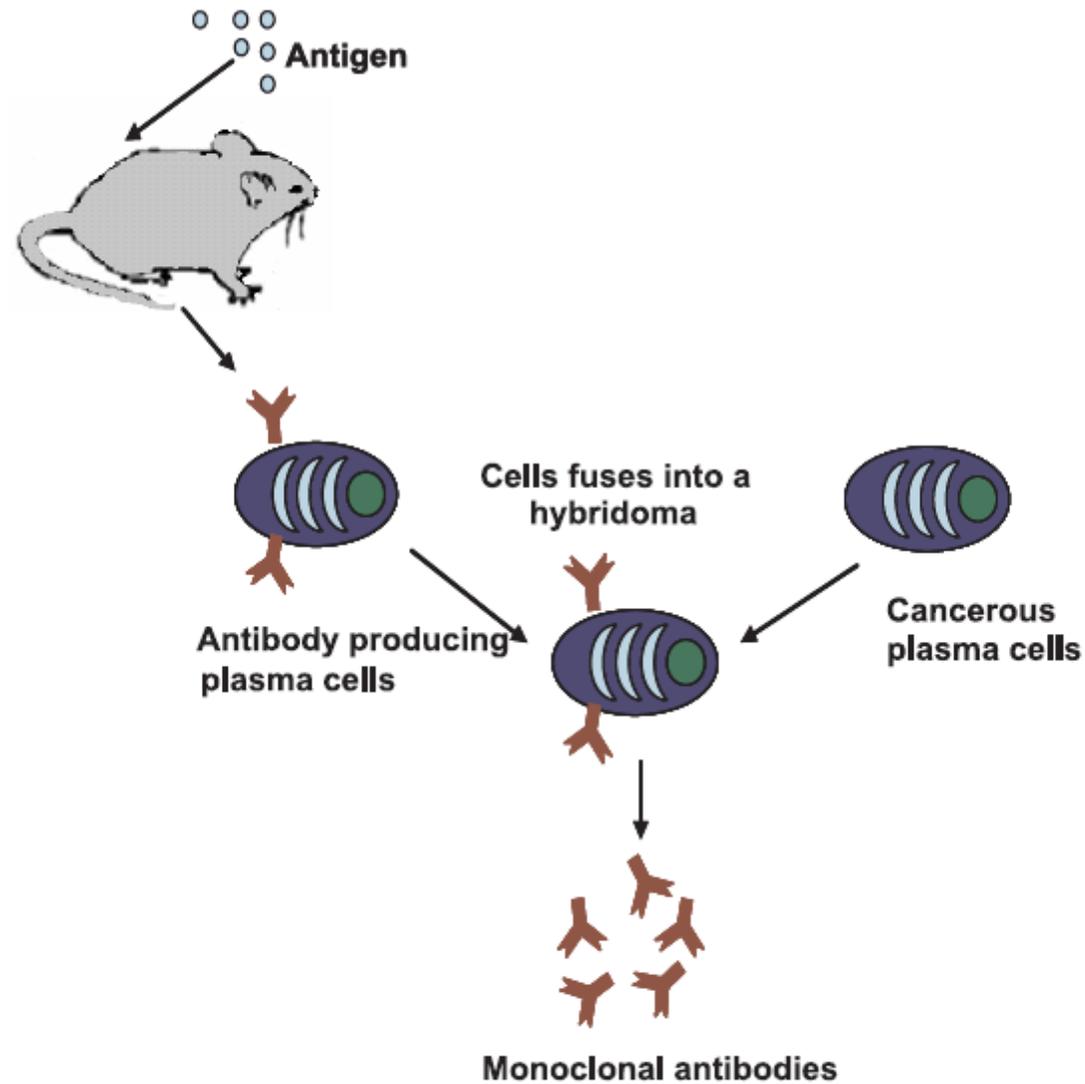
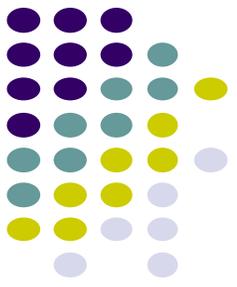
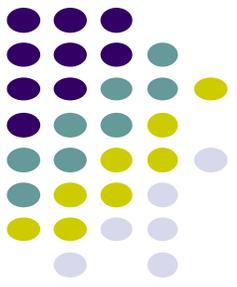
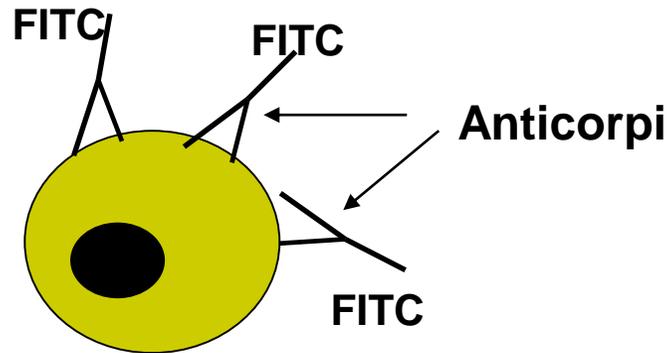


Figure 15.2 Principles of hybridoma technology.

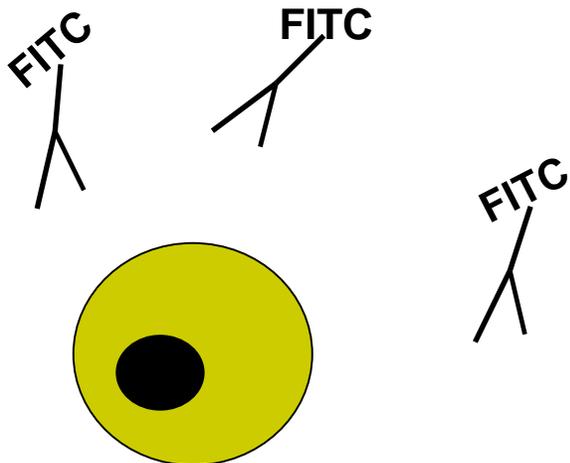
Immunofluorescenza



Gli anticorpi sono coniugati artificialmente ai fluorocromi (FITC, PE etc)



Gli anticorpi riconoscono molecole (antigeni) specifiche nella superficie cellulare



Quando vengono analizzate, le cellule che esprimono l'antigene per cui l'anticorpo è specifico manifesteranno fluorescenza.

Le cellule prive dell'antigene non manifesteranno fluorescenza



Punti di forza della FCM

La forza di questa tecnologia sta nel

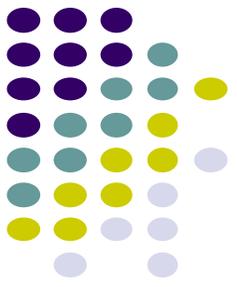
- **il suo alto rendimento**

- misurazione di un elevato numero di cellule in breve tempo

- **di essere multiparametrica**

- capacità di acquisire molti parametri per cellula, valutandoli singolarmente

Parametri Cellulari Misurati con la FCM



Intrinseci

- Non sono richiesti reagenti
 - **Strutturali**
 - Dimensione cellulare (Forward Light Scatter)
 - Granularità citoplasmatica (90 degree Light Scatter)

Estrinseci

- Sono richiesti reagenti.
 - **Strutturali**
 - Contenuto di DNA
 - DNA base ratios
 - Contenuto di RNA
 - **Funzionali**
 - Recettori di superficie o intracellulari.
 - Sintesi del DNA
 - Degradazione del DNA (apoptosi)
 - Ca⁺⁺ Citoplasmatico
 - Gene expression

Vantaggi della FCM



Maggiore precisione.

L'uso di un gran numero di anticorpi e fluorocromi è associato ad un aumento esponenziale delle informazioni ottenute da una singola combinazione di anticorpi nella stessa provetta, consentendo un'identificazione più affidabile.

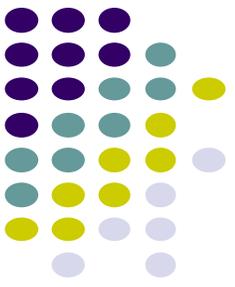
Vantaggi della FCM



Dimensione del campione inferiore.

Un numero maggiore di anticorpi per provetta significa meno provette e meno campioni necessari con conseguente riduzione dei coefficienti di variazione e maggiore precisione dei dati.

Ciò è di particolare rilevanza per campioni paucicellulari come liquido cerebrospinale (CSF) e aspirati con ago sottile (FNA) e anche campioni pediatrici.



Vantaggi della FCM

- **Cost effectiveness.**
 - Minore utilizzo di anticorpi di backbone o per il gating.
- **Maggiore efficienza.**
 - Per l'elaborazione e l'acquisizione dei campioni è necessario meno tempo.
- **Maggiore sensibilità per il monitoraggio minimo della malattia residua.**

FACSCanto



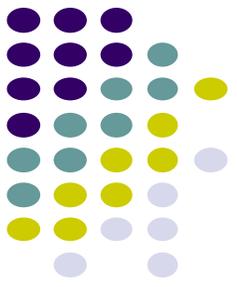
The optics of the BD FACSCanto system consist of an excitation source with three lasers: blue (488-nm, air-cooled, 20-mW solid state), red (640-nm, 40-mW solid state), and violet (405-nm, 30-mW solid state) with a 10 color assay capability



Svantaggi della FCM

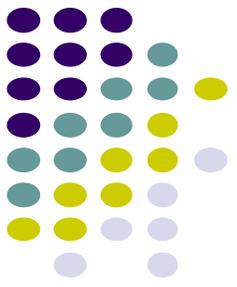
- **Maggiore complessità dell'analisi (sptt compensazione).**
 - Una compensazione imprecisa è probabilmente la principale fonte di dati errati.
 - Ciò può essere risolto applicando matrici di compensazione, ma ciò richiede competenza.

Svantaggi della FCM



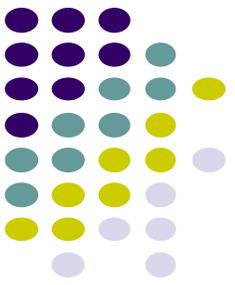
- **Convalida del pannello di anticorpi.**
 - È fondamentale eseguire controlli per tutte le nuove combinazioni di anticorpi e verificare la presenza di impedimenti sterici tra gli anticorpi utilizzati per gli antigeni che si trovano nelle immediate vicinanze della cellula.

Svantaggi della FCM



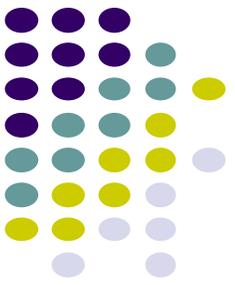
- **Problemi relativi ai coniugati di coloranti tandem.**
 - I coloranti tandem sono coniugati di due fluorocromi, ma ciò può portare a problemi nel trasferimento dell'eccitazione di risonanza se esposto alla luce.
 - Idealmente una matrice di compensazione dovrebbe essere eseguita per ogni nuovo lotto di coniugato colorante tandem.

Svantaggi della FCM



- **Maggiore necessità di competenza nell'analisi e nell'interpretazione dei dati.**
- Errore umano associato al pipettaggio di un elevato numero di anticorpi in una singola provetta.
 - Questo può essere superato preparando cocktail anticorpi interni, che si sono dimostrati stabili fino a 4 settimane o usando cocktail commerciali

Applicazioni della FCM



- Immunofluorescenza
- Ciclo cellulare
- Genetica
- Biologia molecolare
- Microbiologia
- Biologia Oceanografica
- Parassitologia
- etc

FCM in Ematologia



l'immunofenotipizzazione mediante FCM facilita:

- L'identificazione e la quantificazione delle popolazioni cellulari all'interno di un campione
- La differenziazione delle cellule normali da quelle anormali
- La differenziazione dei quadri reattivi da quelli neoplastici
- L'identificazione della fase di differenziazione o maturazione di una popolazione cellulare
- La quantificazione dell'infiltrazione tumorale.



FCM in Ematologia

Per poter fare tutto ciò è necessario:

- Conoscere le caratteristiche fisiche / espressione dell'antigene su cellule normali
- distinguere tra diversi modelli di espressione degli antigeni
- identificare l'espressione aberrante dell'antigene
- Identificare un immunofenotipo robusto associato alla leucemia (LAIP).