



Società Italiana di Citometria

Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

**DIAGNOSTICA CITOMETRICA  
DELLE NEOPLASIE  
DEI LINFOCITI MATURI**

Giovanni D'Arena

*a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini*

**QUADERNI DI CITOMETRIA**

**DIAGNOSTICA CITOMETRICA DELLE NEOPLASIE DEI LINFOCITI MATURI**

Copyright © GIC Società Italiana di Citometria

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,  
di riproduzione, e di adattamento totale o parziale con qualsiasi mezzo  
(compresi i microfilm, le copie fotostatiche e copie informatiche)  
sono riservati per tutti i paesi.

Supplemento n. 1 a "Lettere GIC"  
Periodico della Società Italiana di Citometria  
Autorizz. del Trib. di Roma n. 512/92 del 17/09/1992  
ISSN 2280-8663  
Vol. 27, n. 3 dicembre 2018  
Direttore Responsabile  
Raffaele De Vita

Segreteria GIC:  
Società Italiana di Citometria  
c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute  
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016  
☎ 06/30484671  
e-mail: [gic@enea.it](mailto:gic@enea.it) - <http://www.citometriagic.it>

Stampa:

**CSP-STAMPA DI CARLO PIGNANI**

Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)  
[csp.stampa@virgilio.it](mailto:csp.stampa@virgilio.it)

*A Luigi Del Vecchio  
indimenticabile ed indimenticato  
Amico e Maestro*

La medicina è una scienza in perenne evoluzione e ciò è frutto della ricerca costante in tutti i settori di questa disciplina, inclusa l'immunologia e l'ematologia. Il contenuto di questo testo riflette le conoscenze acquisite al momento in cui esso è stato scritto.

L'autore sarà grato al lettore che desidera far pervenire commenti e suggerimenti ([giovannidarena@libero.it](mailto:giovannidarena@libero.it)).

Si ringraziano il prof. Renato Zambello (Università di Padova) e le dott.sse Fiorella D'Auria, Luciana Valvano e Teodora Statuto (IRCCS CROB, Rionero in Vulture) per alcune delle immagini citofluorimetriche presenti nel testo.

# INDICE

PRESENTAZIONE	pag.	5
INTRODUZIONE		7
<b>PRINCIPI CLASSIFICATIVI ED ETEROGENEITÀ DELLE NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE</b>		9
<i>Linfopoiesi</i>		
<i>Linfopoiesi B</i>		
<i>Linfopoiesi T</i>		
<i>Ontogenesi delle cellule Natural Killer (NK)</i>		
<i>Eterogeneità delle neoplasie linfoproliferative</i>		
<b>IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE NEOPLASTICHE</b>		11
<i>Strategia di gating</i>		
<i>Aberrazioni fenotipiche</i>		
<b>ANALISI DI CLONALITÀ IN CITOMETRIA A FLUSSO</b>		11
<i>Clonalità B</i>		
<i>Clonalità T</i>		
<i>Clonalità NK</i>		
<b>LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA</b>		12
<i>La LLC: cellula di origine e caratteristiche biologiche</i>		
<i>Caratteristiche cliniche e criteri diagnostici</i>		
<i>Immunofenotipo</i>		
<i>Linfocitosi B monoclonale</i>		
<b>ALTRE NEOPLASIE DEI LINFOCITI B MATURI</b>		14
<i>Leucemia prolinfocitica</i>		
<i>Linfoma splenico della zona marginale</i>		
<i>Hairy Cell Leukemia (HCL)</i>		
<i>Linfoma mantellare</i>		
<i>Linfoma follicolare</i>		
<b>NEOPLASIE DEI LINFOCITI T MATURI E DELLE CELLULE NK</b>		15
<i>Leucemia Prolinfocitica T</i>		
<i>Sindrome di Sezary e Micosi Fungoide</i>		
<i>Leucemia a grandi linfociti granulari T (T-LGL)</i>		
<i>Neoplasie linfoproliferative croniche delle cellule NK (NK-LGL)</i>		
<b>PANELS ANTICORPALI E DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE</b>		16
TABELLE		18
FIGURE		24
APPENDICE		35
BIBLIOGRAFIA		36
4		

# PRESENTAZIONE

Prof. Giovanni Pizzolo

Ho trovato strano che il caro amico Giovanni D'Arena abbia chiesto a me di scrivere una breve presentazione a questa sua bella monografia sulla diagnostica citofluorimetrica delle neoplasie dei linfociti maturi. Il motivo della mia sorpresa è rappresentato dal fatto che Giovanni sa bene che io non ho mai "guidato" la macchina citofluorimetro e quindi non conosco approfonditamente i sofisticati tecnicismi invece ben noti e usati nella quotidianità dai citofluorimetristi. E come i lettori di questi "quaderni" ben sanno, in Italia esistono straordinari esperti di citofluorimetria che meglio di me avrebbero potuto introdurre il tema oggetto di questo quaderno. Dopo il primo iniziale impulso di declinare (cortesemente, si intende!) l'invito di Giovanni, ho deciso di accettare per almeno 2 ragioni. La prima perché ho visto la dedica a Luigi Del Vecchio, bella persona e professionista straordinario, amico indimenticabile da moltissimi anni e ho pensato che accettando avrei potuto chiedere a Giovanni di includere una intensa foto di Luigi e Rossella che io avevo scattato a Napoli nel Settembre 2006 in occasione del Congresso Nazionale SIES.



La seconda ragione che mi ha indotto ad accettare l'invito è stata la consapevolezza che, dopotutto, mi sono sempre occupato di immunofenotipo, dando anche qualche contributo al nascere e allo svilupparsi di questo straordinario strumento diagnostico, a partire dalla fine degli anni '70, grazie all'esperienza maturata presso il laboratorio di immunologia di George Janossy al Royal Free Hospital di Londra.

L'approccio diagnostico immunofenotipico in quegli anni era basato sull'impiego delle "rosette E" per il riconoscimento dei linfociti T, delle "rosette "Mouse" per il riconoscimento dei linfociti B della leucemia linfatica cronica, di anticorpi policlonali contro le immunoglobuline di superficie dei linfociti B. Solo pochi centri disponevano di un microscopio a fluorescenza e i citofluorimetri erano ancora in faticosa gestazione. E io, a Londra, ho potuto utilizzare (con tecniche rudimentali), i primi anticorpi monoclonali ancor prima che diventassero commercialmente disponibili, quando non esistevano i CD (neanche quelli musicali!), quando i monoclonali si chiamavano con sigle piuttosto fantasiose, quando bisognava testarli senza sapere quali popolazioni (figuriamoci quali antigeni!) erano in grado di riconoscere, quando le provettine con i monoclonali da testare ti arrivavano da Peter Beverley piuttosto che da Cesar Milstein (poi insignito del Nobel proprio per aver scoperto con Georges Kohler e Niels Jerne gli anticorpi monoclonali). Periodo esaltante e fruttuoso: il riconoscimento immunofenotipico delle linee T e B, delle principali sottopopolazioni linfocitarie normali circolanti e tissutali, l'identificazione degli step della linfopoiesi T e B, l'applicazione di queste conoscenze per la caratterizzazione immunofenotipica delle leucemie (rigorosamente al microscopio a fluorescenza)

Ovviamente questa esperienza londinese ha rappresentato un viatico prezioso per lo sviluppo dei miei successivi interessi di ricerca applicata alla fisiopatologia e alla diagnostica delle malattie linfoproliferative. Ed è così che ho potuto arricchire negli anni l'esperienza in questo settore, grazie soprattutto al fortunato incontro con persone straordinarie (in particolare Carlo Vincenzi, Marco Chilosi, Omar Perbellini) che in tanti anni di collaborazione hanno sviluppato a Verona tecnologie e conoscenze di eccellenza. Ecco le mie giustificazioni per aver accettato di presentare, da non citometrista, la monografia di Giovanni D'Arena.

Come avrete modo di vedere, sarete portati per mano con chiarezza, anche se non in modo esaustivo (per questo servirebbe un trattato!), lungo il filo logico che si dipana a partire dai principi classificativi ed eterogeneità dei disordini linfoproliferativi inquadrati alla luce delle conoscenze sulla linfopoiesi delle varie linee cellulari. Risulta così facile il passo successivo verso l'identificazione delle cellule neoplastiche attraverso le strategie di "gating", il riconoscimento delle aberrazioni fenotipiche, l'analisi di clonalità. E poi la descrizione dei profili immunofenotipici citofluorimetrici delle popolazioni neoplastiche delle varie forme linfoproliferative, inquadrata, seppur sinteticamente, nel contesto dei quadri clinici e morfologici.

Ricche e particolarmente utili e fruibili sono le tabelle che schematizzano e arricchiscono i contenuti del testo, le figure con i quadri morfologici caratteristici di ciascuna forma e i relativi quadri citofluorimetrici che ne esemplificano e definiscono il profilo immunofenotipico. Il tutto corredato da una bibliografia ben selezionata e aggiornata.

Grazie Giovanni!

*Gianni Pizzolo*



# INTRODUZIONE

L'immunofenotipizzazione delle cellule neoplastiche non è altro che la loro caratterizzazione antigenica finalizzata alla diagnosi e alla classificazione delle patologie tumorali che deve sempre essere il frutto di un **processo integrato** in cui vari operatori, esperti di determinati settori, forniscono il loro contributo (informazioni cliniche, quadro morfologico, immunofenotipo, citogenetica, biologia molecolare). Tre sono le tecniche generalmente utilizzate per tale scopo. L'**immunoistochimica**, applicata alla caratterizzazione immunofenotipica su sezioni istologiche di tessuti valutata nel contesto della morfologia delle cellule e dell'architettura tissutale. L'**immunocitochimica**, applicata alla caratterizzazione immunofenotipica delle cellule strisciate o citocentrifugate su vetrino, è idonea alla contemporanea valutazione morfologica e strutturale. Tutte e due queste tecniche, tuttavia, mal si adattano alle sospensioni cellulari, quali il sangue circolante, il materiale midollare, il materiale derivante da un agoaspirato e posto in sospensione. E' la **citofluorimetria** la metodica di elezione per il loro studio, consentendoci, tra l'altro, non solo di fare diagnosi ma anche di caratterizzare le neoplasie. Infatti, con la citometria a flusso non solo è possibile identificare contemporaneamente più antigeni a livello di singola cellula ma anche di valutarne la loro intensità di espressione.

La citofluorimetria ha conquistato oramai un ruolo ben definito nel campo delle neoplasie ematologiche. Inizialmente esso era limitato alla classificazione delle leucemie acute e croniche. In seguito la sua utilità si è allargata alla valutazione della prognosi e del follow-up di varie patologie (per esempio con lo studio della malattia minima residua).

A fronte della pleora di anticorpi monoclonali di cui oramai disponiamo, valgono, tuttavia, dei semplici principi di base che hanno le loro fondamenta nello studio dell'ontogenesi delle cellule normali. Infatti, il loro assetto antigenico nei vari momenti differenziativi, si ritrova sulle cellule delle varie forme neoplastiche che possono così essere riconosciute e classificate come entità ben definite. Tutto ciò, accanto all'acquisizione di sempre maggiori conoscenze biologiche dei meccanismi patogenetici delle malattie e allo sviluppo delle tecnologie (si pensi alla quantità di fluorocromi disponibili e quindi alla possibilità di combinazioni antigeniche sempre più numerose), ha consentito grandi progressi nel campo della diagnostica e della valutazione della risposta alla terapia.

Questa monografia va intesa come una riaffermazione dei principi di base per lo studio citofluorimetrico delle neoplasie dei linfociti maturi con la speranza che incontri il favore non solo di coloro che da poco hanno iniziato il cammino nello studio della disciplina citofluorimetrica ma anche di coloro che, già esperti, hanno il desiderio o il bisogno di rinverdire alcune conoscenze di base.

*Giovanni D'Arena, MD, PhD  
Presidente della Società Italiana di Citometria (GIC)*