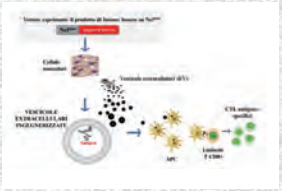
Vol. 33, Num. 3, 2024

LETTERE GIC

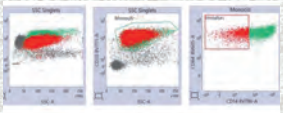
Periodico della Società Italiana di Citometria

Poste italiane spa spedizione in abbonamento postale 70% Roma AUT MP-AT/C/RM/

Un vaccino innovativo contro il cancro della mammella basato su vescicole extracellulari ingegnerizzate endogenamente



La riproducibilitá del dato citofluorimetrico é di grande utilitá nello studio delle patologie mieloidi



PROGRAMMA SCIENTIFICO

Preliminare

43ª CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA

AGGIORNAMENTI E INNOVAZIONI DELLA CITOMETRIA NELLE APPLICAZIONI CLINICHE E DI RICERCA: ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

26-29 maggio 2025 *Web Live Streaming*

11-13 giugno 2025 Pontificia Università Lateranense Roma-Città del Vaticano

CAMPOVERDE
BIOSCIENZE

"LA CHIAVE PER PORTARE LA TUA RICERCA OLTRE OGNI LIMITE"

L'azienda sviluppa e produce sistemi innovativi per la preparazione di campioni, utilizzati in citometria, chirurgia rigenerativa e analisi chimiche.

Medimax 2.0

- Dispositivo per disgregazione meccanica da tessuto solido fresco o congelato.
- Tempo di processamento del campione: 30 secondi
- Classe A IVD
- Compatibile con i tutti i Medicons disponibili con schermi separatori da 35µm, 50µm e 70µm.

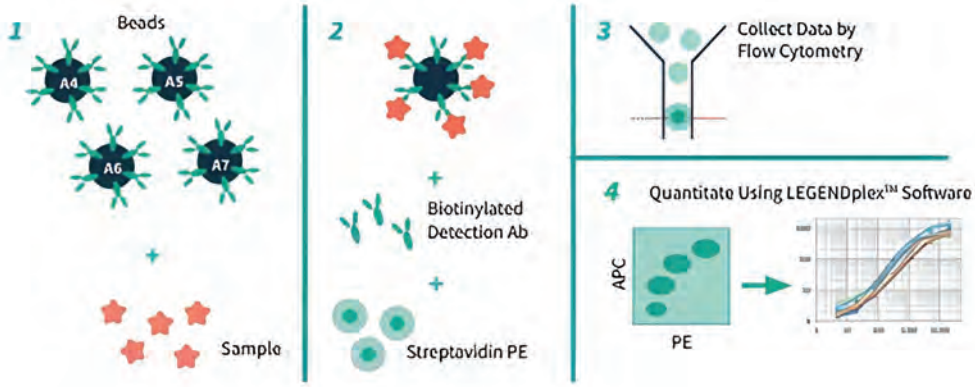
BioLegend®
Enabling Legendary Discovery™

BioLegend è un'azienda all'avanguardia nello sviluppo di nuovi anticorpi e reagenti per la ricerca.

Legendplex

- Scopri i nostri kit per quantificare fino a 14 analiti tramite il citofluorimetro con solo 25 µL di campione!
  Sono disponibili sia pannelli predefiniti che customizzati.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

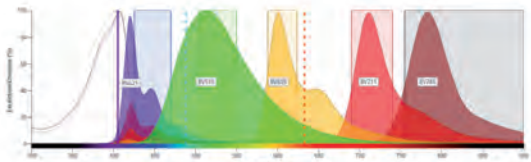


www.campoverde.it
Via Quintiliano, 31 - 20138 Milano
+39 02 58039045
bioscienze@campoverde.it

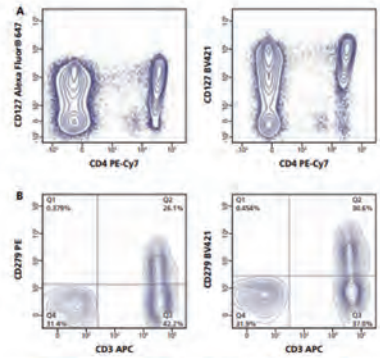
Expand your panel design possibilities with CE-IVD BD single-color reagents

BD Horizon™ Brilliant Violet Antibody Conjugates:

Bright, reliable, and CE-IVD certified reagents for optimized multicolor flow cytometry



Emission spectra of Brilliant Violet (BV) dyes: BV421, BV5120, BV605, BV711 and BV786



Example of improved resolution obtained when using BD Horizon™ Brilliant Dyes

Technology Highlights

- Polymer-based dyes developed with Nobel Prize-winning chemistry
- Provide high-level brightness for detecting dim markers

Performance Benefits

- Low spillover and high stability
- Great resolutions of dim populations

Compatibility

- Use with violet laser equipped flow cytometers (e.g., BD FACSLyric™ 8/10/12-color)

Clinical Use

- CE-IVD certified

Highlights of the Latest Release Include:

CE-IVD reagents are available for CD279, CD152, the markers involved in immunotherapies for PD-1 inhibition and combination therapies.[1,2,3]

CE-IVD reagents are available for the detection of CD123, CD81, the markers recommended in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies.[4,5,6]

Discover the full CE-IVD BD single-color reagent portfolio.

Scan here for details

CE 2797

BD Single Color Reagents are in vitro diagnostic medical device bearing a CE mark and are CE certified by BSI Group The Netherlands B.V.

(Notified Body Number = 2797).

BD Flow Cytometers are Class 1 Laser Product

BD Switzerland Sàrl, Terre-Bonne Park - A4, Route de Crassier -17, 1262 Eysins, Switzerland

bdbiosciences.com

BD, the BD logo, FACSLyric, BD HorizonTM are trademarks of Becton, Dickinson and Company © 2025 BD. All rights reserved. BD-146888 (v 3.0)

References: 1. Moore et. Al, Frontiers of Immunology 2022 ; 2. Iwai et al, Journal of Biomedical Sciences 2017 ; 3. Wei et al, PNAS 2019; 4. Troussard et al, Annual Clinical Updates In Hematological Malignancies 2021; 5. Salem et al, Cytometry Part B: Clinical Cytometry ; 6. Theunissen et al, Blood 2017

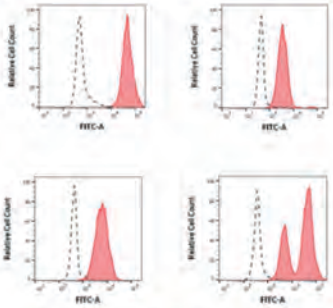
BD

exbio

FagoFlowEx Kit

Cat.# ED7042 **CE-IVD**

The FagoFlowEx Kit is intended for examination of phagocytic activity of neutrophil granulocytes by measuring the respiratory (oxidative) burst after their stimulation with E. coli bacteria in human heparinized whole blood using flow cytometry.

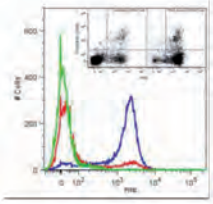


www.sichim.com

IMMUNOLOGICAL SCIENCES

Annexin V Kits Flow Cytometry

Code	Description	Size
IK-90314	Annexin V FITC	100 tests
IK-11150	Annexin V APC	100 tests
IK-11153	Annexin V PE	100 tests



JURKAT cells (human T cell leukemia) were treated with 200 ng/ml TRAIL/Apo2L (bacterially expressed extracellular domain of human TRAIL, corresponding to amino acids 95-281) for 6 hours or left untreated.

Green line untreated and unstained cells.
Red line untreated and stained cells.
Blue line TRAIL treated and stained cells.

Highlights

Immunological Science's Annexin V allows for fluorescent detection of Annexin V bound to apoptotic cells to be used for quantitative determination by flow cytometry.

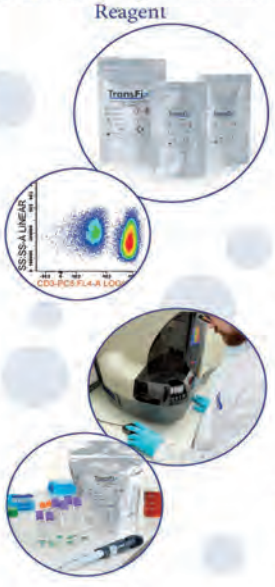
- Normal cells: Annexin V negative and PI negative;
- Early apoptotic cells: Annexin V positive and PI negative;
- Necrotic cells or late apoptotic cells: Annexin V and PI positive

www.immunologicalsciences.com

CYTOMARK
A Cellular Antigen Stabilisation Reagent

TransFix®

TransFix® is a stabilisation reagent preserves cellular surface antigens and prevents cellular degradation in a variety of specimen types for flow cytometric analysis.



Blood Collection

TransFix/EDTA Vacuum Blood Collection Tubes (TVT) for the stabilisation and anticoagulation of blood at the point of collection and For up to 14 days.

Cerebrospinal Fluid

TransFix/EDTA CSF Sample Storage Tubes
Sample storage tubes optimised to stabilise CSF for up to 3 days.

Circulating Tumour Cells

Blood collection tubes prefilled with sufficient TransFix for the collection and stabilisation of circulating tumour cells

Sample Storage

TransFix Sample Storage Tubes

Sample storage tubes for stabilising 1 mL of sample. These tubes do not contain an anti-coagulant, allowing the stabilisation of blood collected with an anticoagulant other than EDTA.

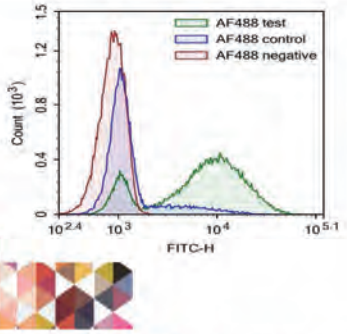
www.sichim.com

IMMUNOLOGICAL SCIENCES

One Step Tunel Apoptosis Kits

Flow Cytometry & Fluorescence Microscopy

Cat. No.	Product Name	Size
IK-9200	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Green,FITC)	50 Assays
IK-11128	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Green,AF488)	50 Assays
IK-9700	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF555)	50 Assays
IK-11129	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF594)	50 Assays
IK-9600	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF647)	50 Assays
IK-9500	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Blue, EV450)	50 Assays



www.immunologicalsciences.com

Via Rio nell'Elba, 140 – Rome / ITALY
Phone +39 06-8818936 / 8800211 – Fax +39 06-8815319
Email info@sichim.com Web-Site www.sichim.com

Periodico della Società Italiana di Citometria

LETTERE GIC

Vol. 33, Num. 3, 2024

DIRETTORE RESPONSABILE
DIRETTORE SCIENTIFICO EDITORIALE
Raffaele De Vita

COMITATO SCIENTIFICO EDITORIALE
Giovanni D'Arena
Ematologia
P.O. "S. Luca"
ASL Salerno

Raffaele De Vita
Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute
ENEA - Centro Ricerche Casaccia
Roma

Giuliano Mazzini
Istochimica & Citometria- IGM-CNR
c/o Dipartimento Biologia L. Spallanzani
Università degli Studi di Pavia

Mariano Rocchi
Dipartimento di Biologia
Campus Universitario
Università degli Studi di Bari

Antonio Russo
Direttore dell'U.O.C di Oncologia Medica
Dipartimento di Oncologia
Policlinico Universitario "P. Giaccone", Palermo

Vol. 33, num. 3 - Dicembre 2024

Lettere GIC
Periodico della Società Italiana di Citometria
Autorizz. del trib. di Roma n° 512/92 del 17/9/92
Edizione quadrimestrale
Spedizione in abbonamento postale

Lettere GIC
Open Access Peer Review
Peer Review Journal
Open Access
ISSN 2280-8663

Grafica: Renato Cafieri
Stampa:
CSP-STAMPA DI CARLO PIGNANI
Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)
csp.stampa@virgilio.it

Redazione:
Società Italiana di Citometria
c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671
e-mail: gic@enea.it
http://www.citometriagic.it

Associato alla Unione Stampa Periodica Italiana

SOMMARIO

Programma Scientifico Preliminare
43ª Conferenza Nazionale di Citometria
Aggiornamenti e Innovazioni della Citometria nelle Applicazioni Cliniche e di Ricerca: analisi, gestione dei dati e loro Interpretazione
26-29 maggio 2025 Web *Live Streaming*
11-13 giugno 2025 Pontificia Università Lateranense Roma-Città del Vaticano 6

Un vaccino innovativo contro il cancro della mammella basato su vescicole extracellulari ingegnerizzate endogenamente 13
Micaela Donnini, Flavia Ferrantelli, Francesco Manfredi, Patrizia Leone, Katherina Pugliese, Eleonora Olivetta, Elisabetta Affabris, Maurizio Federico, Chiara Chiozzini

La riproducibilitá del dato citofluorimetrico é di grande utilitá nello studio delle patologie mieloidi 20
Muccio Vittorio Emanuele, Pautasso Marisa

News in Bibliografia 28
Peer Review Journal

Quaderni GIC ''I Fondamenti della Citometria'' 30

Premio di Studio GIC ''Luigi Del Vecchio'' 2025 31

In copertina: Roma, Pontificia Università Lateranense, sede della 43ª Conferenza Nazionale di Citometria 2025.

Società Italiana di Citometria

43ª CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA

AGGIORNAMENTI E INNOVAZIONI DELLA CITOMETRIA NELLE APPLICAZIONI CLINICHE E DI RICERCA: ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

22-29 maggio / 5 giugno 2025 Web Live Streaming

11-13 giugno 2025 Residenziale
Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano

PROGRAMMA SCIENTIFICO

PRELIMINARE

Giovedì 22 maggio

14:30-17:00 **APERTURA DELLA CONFERENZA**

SESSIONE DI CITOMETRIA MULTIDISCIPLINARE DI IMMUNO-ONCOEMATOLOGIA

Caratterizzazione del Microambiente Immunologico delle Metastasi Epatiche di cancro del Colon: il contributo della Citometria ad alta dimensionalità
Paolo Dellabona (Milano)

Discussione

Profili immunologici nei pazienti con sindrome mielodisplastica: implicazioni nella gestione clinica
Matteo Della Porta (Milano)

Discussione

Leucemie acute mieloidi ad alto rischio: cosa c'è di nuovo
Francesco Lanza (Ravenna)

Discussione

Conclusioni

SESSIONI MULTIDISCIPLINARI
26-29 Maggio

Lunedì 26 maggio

14:30-17:00 **SESSIONE DI EMATOLOGIA**

ANALISI CRITICHE NELLA DIAGNOSTICA CITOMETRICA DELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE E DELLE LEUCEMIE

Introduzione

Problematiche citometriche nella diagnosi dei linfomi T
Valentina Trimarco (Padova)

Problematiche citometriche nella diagnosi delle LAM: l'area monocitica
Daniela Avino (Nocera) & MassimoTriggiani (Salerno)

Pausa caffè con … Azienda

Interferenze dell'immunoterapia nella diagnosi citofluorimetrica delle malattie ematologiche
Antonella Aiello (Milano)

Discussione

Martedì 27 maggio

14:30-17:00 **SESSIONE DI IMMUNOLOGIA**

CITOMETRIA AVANZATA: TECNICHE DI ANALISI NON SUPERVISIONATA E NUOVE FRONTIERE NELL'ANALISI DELL'IMMUNOMETABOLISMO

Introduzione

TECNICHE DI ANALISI NON SUPERVISIONATA

From Data Chaos to Clear Stories: How AI Makes Your Cytometry Analysis Work For You
Guillame Beyrend-Frizon (Ginevra)

Identificare l'inatteso: uso dell'analisi citometrica non supervisionata per identificare profili immunologici protettivi
Veronica Bordoni (Roma)

Discussione

Pausa caffè con … Azienda

NUOVE FRONTIERE NELL'ANALISI DELL'IMMUNOMETABOLISMO

Applicazioni del metodo SCENITH basato sulla Citometria a flusso per stimare il profilo energetico delle cellule cerebrali e tumorali con una risoluzione a singola cellula
Erica Tagliatti (Milano)

Interazioni immunometaboliche nel microambiente tumorale
Sara De Biasi (Modena)

Discussione

Mercoledì 28 maggio

14:30-17:00 **SESSIONE DI ONCOLOGIA**

LE VESCICOLE EXTRACELLULARI: PICCOLI MESSAGGERI CON UNA GRANDE PROSPETTIVA NELLA PROGNOSI E NELLA TERAPIA DEL CANCRO

Introduzione

Le vescicole extracellulari come vettori terapeutici nelle malattie cardiovascolari
Lucio Barile (Lugano, Svizzera)

Proprietà immunomodulatorie delle vescicole extracellulari isolate dal midollo osseo di pazienti con neuroblastoma: ruolo del PD-L1 e di HLA-G
Fabio Morandi (Genova)

Pausa caffè con … Azienda

Nanotecnologie naturali: vescicole extracellulari da cellule di microalga per nuove soluzioni terapeutiche e cosmetiche
Antonella Bongiovanni (Palermo)

Discussione

Giovedì 29 maggio

14:30-17:00 **SESSIONE AMBIENTALE**

LA CITOMETRIA PER L'AMBIENTE E LE BIOTECNOLOGIE

Introduzione

Automated flow cytometry for cell population control
Frank Del Vigne (Liegi, Gembloux - Belgio)

Pausa caffè con … Azienda

Tecniche citometriche in ambito vegetale
Debora Giorgi (Roma)

Discussione

SESSIONE MULTIDISCIPLINARE
5 Giugno

Giovedì 5 giugno

14:30-17:30 **SESSIONE MULTIDISCIPLINARE AVANZAMENTI IN CITOMETRIA**

Introduzione

Citometria in Ematologia
Progressi attuali e traguardi futuri
Silvestro Volpe (Avellino)

Discussione

Citometria in Immunologia
La Citometria a flusso per la caratterizzazione delle cellule mieloidi soppressorie: tecniche e prospettive
Alessandra Battaglia (Roma)

Discussione

Citometria in Oncologia
La Citometria nello studio del microambiente tumorale: opportunità e sfide
Virginia Tirino (Napoli)

Discussione

Citometria Ambientale
Prospettive e applicazioni della Citometria a flusso in campo ambientale
Stefano Amalfitano (Roma)

Discussione

Conclusioni

PROGRAMMA SCIENTIFICO PRELIMINARE
RESIDENZIALE
11-13 giugno 2025
Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano

Mercoledì 11 giugno

12:00 Registrazione e Allestimento Poster

14:00 Apertura della Conferenza (Aula Pio XI)

WORKSHOP GIovani Citometristi
COMUNICAZIONI ORALI

15:15 **SEMINARI DI IMMUNO-ONCO-EMATOLOGIA E METODOLOGIE ANALITICHE**

17:00 **LETTURA MAGISTRALE DI APERTURA**
Franco Locatelli (Roma)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 12 giugno

08:30-10:15 **SESSIONE PARALLELA EMATOLOGIA** (Aula Pio XI)

NUOVE FRONTIERE DELLA CITOMETRIA NELLA DIAGNOSTICA ONCOEMATOLOGICA

Introduzione

Il contributo nella standardizzazione diagnostica della New Generation Flow
Giovanni Rossi (San Giovanni Rotondo)

COMUNICAZIONI ORALI

SESSIONE PARALLELA AMBIENTE (Aula Paolo VI)

LA CITOMETRIA PER L'AMBIENTE E LE BIOTECNOLOGIE

Introduzione

Spectral cytometry for fine-scale phytoplankton analysis
Gerald Gregori (Marsiglia - Francia)

Flow cytometric analysis of microgreens
Carla Sandri (Roma)

COMUNICAZIONI ORALI

10:15- 10:45 *Pausa caffè e visione poster*
"obbligo di presenza di almeno un Autore"

10:45-12:30 **SESSIONE PLENARIA** (Aula Pio XI)

NUOVE FRONTIERE DELLA CITOMETRIA

Introduzione

Cell Sorting: Ottimizzazione del campione per approcci omici e metodologie avanzate
Nicolò Panini (Milano)

Fine-tuning single-cell technologies at the DNA, RNA, and protein levels
Alessio Bava (Roma)

Intelligenza artificiale in Biomedicina

12:30-14:00 *Colazione di lavoro e visione poster*
"obbligo di presenza di almeno un Autore"

14:00-15:15 **SESSIONE PARALLELA MMUNOLOGIA** (Aula Pio XI)

LA CITOMETRIA IN IMMUNOLOGIA TRASLAZIONALE E CLINICA

Introduzione

Utilizzo di tecniche single cell per studiare il ruolo dei linfociti B nella miastenia grave
Raffaele Iorio (Roma)

Ruolo della milza nell'immunità anti virale
Chiara Agrati (Roma)

COMUNICAZIONI ORALI

14:00-15:15 **SESSIONE PARALLELA ONCOLOGIA** (Aula Paolo VI)

L'INTEGRAZIONE DELLA CITOMETRIA NELL'ONCOLOGIA TRASLAZIONALE: NUOVE FRONTIERE E PROSPETTIVE CLINICHE NELLO STUDIO E TRATTAMENTO DEI TUMORI

Introduzione

Nuove prospettive nella medicina traslazione per il Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
Elena Levantini (Pisa)

COMUNICAZIONI ORALI

15:15-15:45 *Pausa caffè e visione poster*
"obbligo di presenza di almeno un Autore"

15:45-17:30 **SESSIONE PLENARIA** (Aula Pio XI)

NUOVE FRONTIERE DELLA CITOMETRIA

Introduzione

Epigenetica del cancro: dal laboratorio alla clinica e vice-versa
Michele Maio (Siena)

Discussione

Lineage switch nella leucemia linfoblastica acuta: implicazioni per il monitoraggio della malattia residua minima in citofluorimetria
Barbara Buldini (Padova)

Discussione

Integrazione tra immunoistochimica e Citometria nella tipizzazione dei linfomi

Discussione

17:30 Assemblea GIC (Aula Pio XI)

Degustazione "Sapere i Sapori … a Km 0"

Venerdì 13 giugno

08:30-10:00 **SESSIONE PARALLELA EMATOLOGIA** (Aula Pio XI)

ATTUALI SFIDE DELLA CITOMETRIA NELLA DIAGNOSTICA ONCOEMATOLOGICA

Introduzione

Analisi citometrica della Malattia Minima Misurabile: valutazione nella Hairy Cell Leukemia e problematiche nell'analisi del Liquido Cefalorachidiano
Iole Cordone (Roma)

COMUNICAZIONI ORALI

08:30-10:00 **SESSIONE PARALLELA IMMUNOLOGIA** (Aula Paolo VI)

LA CITOMETRIA IN IMMUNOLOGIA SPERIMENTALE E TRASLAZIONALE

Introduzione

I modelli murini come prima linea nella ricerca Immuno-Oncologica
Daniela Fenoglio (Genova)

COMUNICAZIONI ORALI

10:00-10:30 *Pausa caffè e visione poster*
"obbligo di presenza di almeno un Autore"

10:30-13:00 **SESSIONE PLENARIA** (Aula Pio XI)

LA CITOMETRIA TRASLAZIONALE DALLA RICERCA ALLA DIAGNOSTICA

Introduzione

Spotlight on technology: open ST spatial omics
Elisabetta Ferretti (Roma)

Discussione

Approcci CAR-T per le patologie oncologiche e autoimmuni: le nuove sfide della terapia genica
Concetta Quintarelli (Roma)

Discussione

Immunoterapia CAR-T nelle neoplasie linfoidi: dalla produzione al monitoraggio post-infusione
Giuseppe Gaipa (Monza)

Discussione

LETTURA MAGISTRALE CONCLUSIVA
Sviluppo di nuove terapie immunologiche contro i tumori solidi
Ruggero De Maria (Roma)

Conclusioni

Premiazione delle Schede di Valutazione della Conferenza

Comitato Organizzatore
Rosa Chianese (*Varese*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Ruggero De Maria (*Roma*)
Giuliano Mazzini (*Pavia*)
Concetta Quintarelli (*Roma*)

Comitato Scientifico
Chiara Agrati (*Roma*)
Stefano Amalfitano (*Roma*)
Rachele Amodeo (*Roma*)
Alessandra Battaglia (*Roma*)
Raffaella Casotti (*Napoli*)
Rosa Chianese (*Varese*)
Giuseppe Coppola (*Salerno*)
Igea D'Agnano (*Milano*)
Giovanni D'Arena (*Salerno*)
Ruggero De Maria (*Roma*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Giuliano Mazzini (*Pavia*)
Claudio Pioli (*Roma*)
Concetta Quintarelli (*Roma*)
Giulia Scalia (*Napoli*)
Virginia Tirino (*Napoli*)
Silvestro Volpe (*Avellino*)

Segreteria Scientifica
Alessandra Battaglia (*Roma*)
Raffaella Casotti (*Napoli*)
Giulia Scalia (*Napoli*)
Virginia Tirino (*Napoli*)

Segreteria Scientifica
Società Italiana di Citometria
associazione scientifica senza fini di lucro
iscritta nell'Elenco delle Società Medico Scientifiche
del Ministero della Salute
c/o Divisione Biotecnologie
ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma
tel. 06 30484671 - e-mail: gic@enea.it
http://**www.citometriagic.it**

Segreteria Organizzativa
ProEventi Srl
Viale Matteotti 36, 71016, San Severo
tel: 0882 242151
e-maill: citometriagic@proeventi.it

www.proeventi.it

INFORMAZIONI GENERALI

http://www.citometriagic.it - www.proeventifad.it

REGISTRAZIONE E ISCRIZIONE NEL SITO:
http://www.conferenzadicitometriagic.it

RIEPILOGO SCADENZE 31 MARZO 2025

- **iscrizione con quota ridotta**
- **invio degli abstract per comuniczioni orali e poster**
- **prenotazione agli eventi previsti nel programma sociale**

❋ Giovedì 22 maggio 14:30-17:00 Web Live Streaming
Sessione di Apertura Multidisciplinare di Citometria

❋ 26-29 maggio 14:30-17:00 Web Live Streaming
- Lunedì 26 maggio14:30-17:00 Sessione di EMATOLOGIA
- Martedì 27 maggio 14:30-17:00 Sessione di IMMUNOLOGIA
- Mercoledì 28 maggio 14:30-17:00 Sessione di ONCOLOGIA
- Giovedì 29 maggio 14:30-17:00 Sessione di AMBIENTE

❋ Giovedì 5 giugno 14:30-17:30 Web Live Streaming
Sessione Multidisciplinare

❋ 11-13 giugno Residenziale
Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano

I contributi scientifici saranno presentati sotto forma di relazioni su invito, comunicazioni orali e poster; gli **abstract** dovranno essere redatti in inglese e dovranno pervenire entro il **31 marzo 2025.**
L'Autore presentante l'abstract, iscritto alla Conferenza, potrà richiedere uno dei Quaderni GIC;
gli abstract accettati saranno pubblicati in una rivista internazionale Peer Review e nella rivista "Lettere GIC".
I Poster saranno esposti per tutta la durata della Conferenza.
Saranno assegnati "Premi Poster GIC" in diverse discipline.

Programma Sociale Preliminare

mercoledì 11 giugno
10:00 *Udienza generale del Santo Padre: Piazza San Pietro*
18:00 *Brindisi di Benvenuto*
giovedì 12 giugno
17:30 *Assemblea dei Soci*
18:00 *Degustazione "Sapere i Sapori … a Km 0"*
venerdì 13 giugno
12:45 *Premiazione schede valutazione Conferenza*
13:00 *Light Lunch di saluto**
14:00 *Evento Culturale**
*è indispensabile la prenotazione entro il 31 marzo 2025.

Quote d'iscrizione

	entro il 31 marzo 2025		**dopo il 31 marzo 2025**
Soci GIC*	**€ 160,00 + IVA 22%**	**Soci GIC***	**€ 200,00 + IVA 22%**
non Soci	**€ 220,00 + IVA 22%**	**non Soci**	**€ 260,00 + IVA 22%**
non strutt Soci GIC*	**€ 90,00 + IVA 22%**	**non strutt Soci GIC***	**€ 140,00 + IVA 22%**
non strutt non Soci	**€ 150,00 + IVA 22%**	**non strutt non Soci**	**€ 190,00 + IVA 22%**

*In regola con la quota associativa 2025
+ Quaderno GIC € 10,00 + IVA 22%
+ 3 Quaderni GIC € 20,00 + IVA 22%
- I Fondamenti della Citometria
- La Citometria a Flusso per lo Studio della Proliferazione Cellulare
- Le Cellule Natural Killer: Biologia, Patologia e Rilevanza della Citometria
- Valutazione Citofluorimetrica della Malattia Minima Residua

Coloro che intendono usufruire della quota ridotta per i giovani "non strutturati" dovranno inviare, insieme alla scheda di iscrizione, una autocertificazione vistata dal Responsabile della Struttura.

SEDE DELLA CONFERENZA
Pontificia Università Lateranense
Piazza San Giovanni in Laterano 4
00184 Roma- Città del Vaticano
https://www.pul.va

Come raggiungere la sede della Conferenza

Come arrivare dalla Stazione Termini a Piazza di San Giovanni in Laterano:
- Metro: *Linea A - fermata San Giovanni*
- Bus: *Linea 714 - Linea 360*
- Auto: *Raccordo Anulare uscita n. 14*
Per ulteriori informazioni turistiche: Turismo Roma: www.turismoroma.it

Un vaccino innovativo contro il cancro della mammella basato su vescicole extracellulari ingegnerizzate endogenamente

Micaela Donnini[1], Flavia Ferrantelli[1], Francesco Manfredi[1], Patrizia Leone[1], Katherina Pugliese[1], Eleonora Olivetta[1], Elisabetta Affabris[2], Maurizio Federico[1], and Chiara Chiozzini[1]

1National Center for Global Health, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy;

2Department of Science, Roma Tre University, 00146 Rome, Italy.

e-mail: micaela.donnini@iss.it e chiara.chiozzini@iss.it

Abstract

We previously developed an innovative strategy to induce CD8+ T lymphocyte-immunity through *in vivo* engineering of extracellular vesicles (EVs). This approach relies on intramuscular injection of DNA expressing antigens of interest fused to a biologically-inactive HIV-1 Nef protein mutant (Nef^{mut}). Nef^{mut} is very efficiently incorporated into EVs, thus conveying large amounts of fusion proteins into EVs released by transfected cells. This platform proved successful against highly immunogenic tumor-specific antigens. Here, we tested whether antigen-specific CD8+ T cell immune responses induced by engineered EVs can counteract the growth of tumors expressing two "self" tumor-associated antigens (TAAs): HOXB7 and HER2. FVB/N mice were injected with DNA vectors expressing Nef^{mut} fused to HOXB7 or HER2, singly and in combination, before subcutaneous implantation of breast carcinoma cells co-expressing HOXB7 and HER2. All mice immunized with the combination vaccine remained tumor-free, whereas groups vaccinated with single Nef^{mut}-fused antigens were only partly protected, with stronger antitumor effects in HER2-immunized mice. These results show the efficacy of EV-based vaccination against two TAAs, and represent the first demonstration that HOXB7 may be targeted in multi-antigen immunotherapy strategies.

INTRODUZIONE

Cancro della mammella e vaccini antitumorali

Il cancro della mammella è, ancora oggi, la principale causa di morte per cancro nella donna, con un numero stimato di 2,3 milioni di nuovi casi e oltre 685.000 decessi causati nel 2020 (Sung et al., 2021). Una delle ultime frontiere nella lotta contro il cancro è l'immunoterapia che agisce stimolando ex-novo, potenziando, o modificando il funzionamento del sistema immunitario in modo da renderlo capace di riconoscere ed attaccare le cellule tumorali (Waldman, Fritz and Lenardo, 2020). Tra le diverse possibili strategie immunoterapiche vi è lo sviluppo di vaccini antitumorali, i quali offrono l'attraente, e forse non più futuristica, prospettiva di fornire un'immunità a lungo termine contro queste patologie (Grimmett et al., 2022). Nonostante i numerosi progressi raggiunti, però, ad oggi nessun vaccino è stato approvato per il trattamento del cancro (Davodabadi et al., 2022). Un vaccino antitumorale efficace deve essere in grado di istruire il sistema immunitario a riconoscere e attaccare le cellule tumorali che esprimono antigeni *non-self o self-derived*, rispettivamente TSA (Tumor Specific Antigen) o TAA (Tumor Associated Antigen), che siano essenziali per la loro sopravvivenza e, possibilmente, assenti o poco espressi nelle cellule normali. Nelle risposte antitumorali il ruolo principale è svolto dall'immunità cellulare mediata dai linfociti T CD4+ e, soprattutto, dall'attivazione di linfociti T CD8+ citotossici funzionali, cioè in grado di avviare una risposta T citotossica (CTL) nei confronti delle cellule tumorali, generando una "memoria" immunitaria. Per queste ragioni, il numero dei CTL nel microambiente tumorale (TME) risulta un marker prognostico critico del cancro (Halle, Halle and Förster, 2017).

Piattaforma vaccinale basata su EV ingegnerizzate con Nef^{mut}

Nel nostro laboratorio è stato isolato un mutante inattivo della proteina Nef di HIV-1 denominato Nef^{mut}, che si incorpora efficientemente nelle vescicole extracellulari (EV), anche quando fuso al suo C-terminale con una proteina esogena (Di Bonito et al., 2009). Le EV sono un gruppo eterogeneo di vescicole, rilasciate da tutte le cellule, che svolgono un ruolo centrale nella comunicazione intercellulare e sono per questo considerate ottimi sistemi di *delivery*, potenzialmente sfruttabili in ambito clinico. Su tali presupposti, è stata sviluppata e brevettata un'originale strategia vaccinale basata su EV ingegnerizzate endogenamente, che si è rivelata efficace, in diversi studi preclinici, sia contro malattie infettive che contro tumori. Nel modello murino di immunizzazione proposto (**Figura 1**), una sospensione di DNA in soluzione fisiologica viene somministrata a livello del quadricipite attraverso un'iniezione intramuscolare (i.m.), a seguito della quale, si effettua un'elettroporazione che favorisce la penetrazione del DNA all'interno delle cellule (Kisakov et al., 2024). Il DNA si esprime nelle cellule muscolari, ma non solo, e il prodotto proteico di fusione viene incorporato nelle EV e rilasciato nell'ambiente extracellulare, raggiungendo anche siti molto distanti da quello di inoculo. Le EV immunogeniche vengono dunque captate dalle APC e, nello specifico, dalle DC convenzionali che, attraverso il meccanismo di cross-presentazione, inducono l'attivazione e l'espansione di cloni di linfociti T CD8+ specifici per quell'immunogeno, generando anche una popolazione di linfociti T CD8+ di memoria (Federico, 2023).

Un vaccino valido contro i tumori

La strategia vaccinale basata su Nef^{mut} si è dimostrata efficace in ambito tumorale, anche contro TAA, come dimostrato contro tumori ortotopici esprimenti l'antigene HER2 in modelli murini che spontaneamente sviluppano tumori mammari multipli. L'immunità T CD8 specifica, indotta nei topi immunizzati contro HER2, è in grado di generare un effetto antitumorale che consente un con-

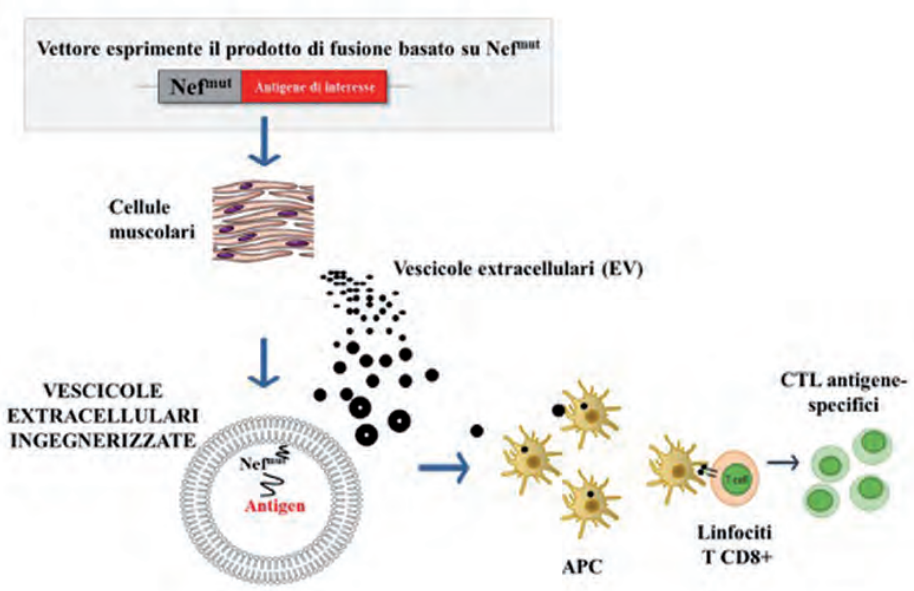


Figura 1. Schema del meccanismo d'azione della piattaforma vaccinale CTL basata su Nef^{mut}. L'iniezione i.m. di un vettore di DNA permette l'espressione dell'immunogeno di interesse fuso al C-terminale della proteina di ancoraggio alle EV Nef^{mut}. Il prodotto di fusione viene incorporato nelle EV e rilasciato ad elevati livelli nell'ambiente extracellulare, raggiungendo anche siti molto distanti. La cattura delle EV ingegnerizzate da parte delle APC consente, attraverso il meccanismo di cross-presentazione, l'attivazione di linfociti T CD8+ specifici per l'immunogeno trasportato, in grado poi di esplicare le proprie funzioni. Da: (Federico, 2023).

trollo della crescita tumorale, ma non la remissione completa (Anticoli et al., 2018). Sicuramente, il meccanismo di *cancer immunoediting* può limitare l'efficacia complessiva di questa strategia terapeutica (Schreiber, Old and Smyth, 2011). Una possibile contromisura potrebbe essere quella di attivare il sistema immunitario contro bersagli multipli. Tale strategia è permessa dalla flessibilità della piattaforma vaccinale CTL basata su Nef^{mut}, che consente di immunizzare efficacemente contro più antigeni contemporaneamente (Ferrantelli et al., 2021a).

Scopo del lavoro

Lo scopo di questo progetto è stato la valutazione dell'efficacia di un vaccino profilattico di combinazione, che sfrutta la piattaforma vaccinale basata sull'inoculo di specifici vettori di DNA e la produzione endogena di EV ingegnerizzate per la generazione di risposte immunitarie CTL dirette contro due TAA espressi dalle cellule tumorali, in un modello preclinico di cancro della mammella. Per la loro rilevanza e per i risultati promettenti ottenuti precedentemente con la vaccinazione singola verso uno dei due antigeni, sono stati considerati i TAA HOXB7 e HER2. Lo scopo ultimo è quello di ottenere importanti informazioni al fine di traslare questa strategia vaccinale nell'ambito delle terapie cliniche contro il cancro.

MATERIALI E METODI

Costrutti molecolari

I costrutti molecolari utilizzati sono stati ottenuti precedentemente e pubblicati in lavori del gruppo (Anticoli et al., 2018; Ferrantelli et al., 2018).

Colture di cellule tumorali 305

Le cellule denominate "305" sono una linea cellulare esprimente entrambi i TAA HOXB7 ed HER2, derivata da tumori della ghiandola mammaria cresciuti spontaneamente in topi FVB/N transgenici per HER2 e HOXB7 (Liu et al., 2015). Questa linea cellulare è stata fornita gentilmente da un gruppo di ricerca dell'Università della Carolina del Sud (USA) che si è occupato anche della sua caratterizzazione (Liu et al., 2015).

Scelta del modello

Gli studi *in vivo* sono stati condotti in topi FVB/N, un ceppo di laboratorio molto utilizzato nella ricerca biomedica, in particolare in ambito oncologico, per la sua suscettibilità allo sviluppo di certi tipi di tumori, che lo rende un ottimo modello per lo studio della biologia del cancro e per valutare le potenzialità di trattamenti antitumorali (https://www.criver.com/products-services/find-model/fvb-mouse?region=27). Topi del ceppo FVB/N sono stati ottenuti da ENVIGO RMS srl, e stabulati presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma, autorizzato dal Ministero della Salute con decreto ministeriale numero 12/2005-A, e rilasciato in data 04/02/2005. Tutte le procedure *in vivo* sono state eseguite come previsto da Decreto legislativo 26/2014 in attuazione della Direttiva Europea 2010/63.

Immunizzazione

Per le procedure di immunizzazione, i topi sono stati sottoposti ad anestesia generale mediante inalazione di isoflurano 1,5% (Isoflo), e successivamente inoculati i.m. (a livello del quadricipite, sia a destra che a sinistra) con 10 µg di DNA in 30 µL di soluzione fisiologica sterile. Nel caso dell'immunizzazione combinata, è stata inoculata la stessa quantità di DNA per ciascuno dei due vettori, sempre risospesi in 30 µL di soluzione fisiologica. Immediatamente dopo l'iniezione, i topi sono stati sottoposti ad elettroporazione nel sito di inoculo, mediante lo strumento Agilpulse IM (BTX, Harvard Bioscience). Ogni ciclo di immunizzazione è consistito in due vaccinazioni a distanza di due settimane.

Inoculo cellule tumorali

Nel modello di efficacia preventiva proposto, a distanza di due settimane dalla seconda immunizzazione, 100 µL di una sospensione di cellule 305 ad una concentrazione di 2 x 10^6 cellule/mL in PBS sono stati inoculati sottocute (s.c.), nel fianco di ogni topo e la crescita tumorale è stata monitorata per i 30 giorni successivi. I volumi sono stati calcolati secondo la formula (diametro maggiore x diametro minore^2)/2. Al sacrificio, è stata valutata l'effettiva presenza di masse tumorali sottocute, a cui è seguito l'espianto, o confermata l'assenza delle stesse.

ATTIVITÀ SCIENTIFICA

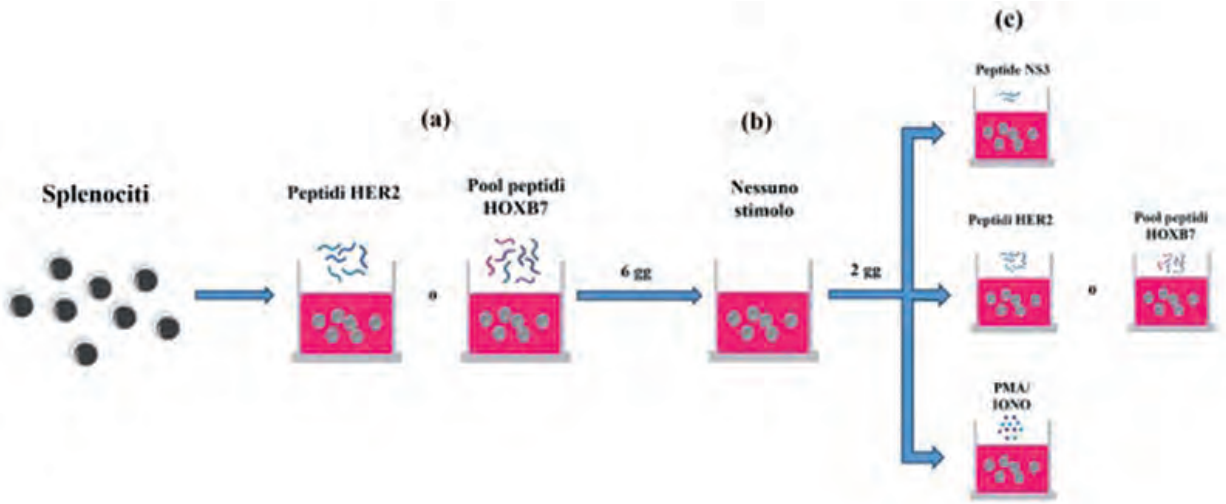


Figura 2. Rappresentazione schematica del saggio di stimolazione delle cellule T e del rilascio di citochine. (a) Campioni di splenociti vengono scongelati e stimolati con peptidi HER2 o con pool di peptidi HOXB7; (b) dopo 6 giorni, gli stimoli vengono rimossi e le cellule coltivate per 2 giorni senza stimoli; (c) ciascuno dei due campioni precedenti viene quindi seminato in 4 condizioni di stimolazione: peptide NS3; peptidi HER2; pool peptidi HOXB7; PMA/ionomicina.

Espianto e processamento delle milze

Per analizzare le risposte immunitarie T specifiche indotte nei topi vaccinati, al sacrificio le milze dei topi sono state espiantate e processate per ottenere colture di splenociti. Ogni milza è stata sminuzzata in una piastrina sterile contenente terreno di coltura (RPMI 1640, Gibco) per liberare la componente cellulare nel terreno di coltura. Il tutto è stato trasferito in un tubo e, atteso qualche minuto, il sovranatante contenente gli splenociti è stato trasferito in un altro tubo e sottoposto ad un lavaggio con terreno senza siero. Le cellule sono state risospese in terreno di coltura RPMI 1640 (Gibco) completo (FBS al 15%, glutammina, penicillina e streptomicina, β-mercaptoetanolo 50 µM), e contate utilizzando il colorante Trypan blue, per escludere le cellule morte. Gli splenociti sono stati crioconservati in terreno di congelamento costituito da FBS con 10% di dimetilsolfossido (DMSO).

Saggio di stimolazione delle cellule T

I campioni di splenociti crioconservati derivati dai topi sono stati scongelati, contati, e seminati alla concentrazione finale di 10 x 10^6 cellule/mL in due condizioni: aggiungendo due peptidi HER2 (PDSLRDLSVF e PYNYLSTEV, GenScript) specifici per i linfociti CD8+, alla concentrazione di 5 µg/mL ciascuno, oppure un pool di peptidi HOXB7 (GenScript), alla concentrazione di 1 µg/mL ciascuno (**Figura 2a**). Le cellule sono state mantenute in coltura per 6 giorni, quindi, dopo aver rimosso gli stimoli, sono state riseminate in terreno completo e coltivate per due giorni (**Figura 2b**). A questo punto, è stato allestito il saggio di stimolazione delle cellule T e del rilascio delle citochine, che prevede la semina di ciascun campione precedente in 4 condizioni di stimolazione (**Figura 2c**): peptidi HER2 (5 µg/mL); pool peptidi HOXB7 (1 µg/mL ciascuno); peptide NS3 di HCV (5 µg/mL) come stimolo scorrelato; PMA (10 ng/mL) e ionomicina (1 µg/mL) come controllo positivo dell'attivazione cellulare. Dopo un'ora di incubazione a 37 °C, è stata aggiunta in tutti i campioni la brefeldina (BFA) alla concentrazione di 1 µg/mL per bloccare la secrezione di IFNγ. La coltura è stata incubata a 37 °C o.n.

Marcatura intracellulare delle citochine (ICS)

Dopo l'incubazione, i campioni cellulari sono stati raccolti in tubi da FACS e centrifugati a 250 x g per 7' a 4 °C. Una volta rimosso il sovranatante, le cellule sono state marcate con il colorante delle cellule morte, FVD-eFluor506 (Invitrogen), e sono state poi incubate con 1 µL di Fc-blocking (anti-CD16/CD32, eBioscience) da *stock* concentrato 500 µg/mL. Dopo l'incubazione, si è proceduto direttamente con la marcatura extracellulare aggiungendo 2 µL di ciascuno degli anticorpi di superficie coniugati ad un differente fluorocromo (**Tabella1**). L'incubazione è stata effettuata al buio per 1 h a 4 °C, ed è stato poi eseguito un lavaggio con 1 mL di PBS. A questo punto, le cellule sono state fissate e permeabilizzate con l'agente Cytofix/Cytoperm (BD), e si è passati al protocollo di marcatura intracellulare, aggiungendo 2 µL dell'anticorpo anti-IFNγ (**Tabella1**) e incubando le cellule come sopra. Infine, dopo un lavaggio con PBS, le cellule sono state fissate con 200 L di PBS con PFA 1% e analizzate mediante un citofluorimetro Cytoflex LX (Beckman Coulter).

Anticorpo	Fluorocromo	Codice	Clone	µL/campione	Ditta
CD3	FITC	555274	17A2	2	BD
CD8a	APC-Cy7	557654	53-6.7	2	BD
CD4	PerCPCy5.5	561115	RM4-5	2	BD
CD44	BUV395	740215	IM7	2	BD
IFNγ	PE-Cy7	25-7311-82	XMG1.2	2	Thermo Fisher

Tabella 1. Pannello anticorpi per marcatura extra- e intra-cellulare. Elenco degli anticorpi con i rispettivi fluorocromi utilizzati per campione risospeso in 100 µL di PBS 2% FBS.

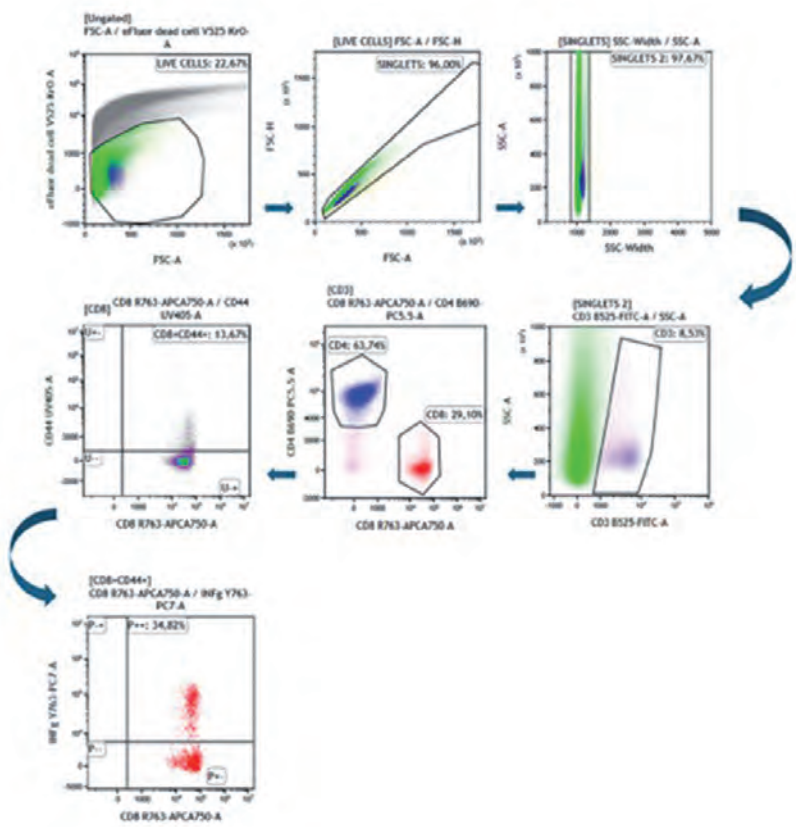


Figura 3. Strategia di gating delle popolazioni cellulari. Sono state separate le cellule vive dalle cellule morte confrontando il parametro morfologico forward scatter (FSC-A) con il segnale fluorescente dell'eFluor506. Nella popolazione di cellule vive, è stata valutata la presenza di doppietti, confrontando due parametri morfologici, sia in base alle dimensioni cellulari (FSC-A e FSC-H) che alla granulosità (SSC-A e SSC-W); le cellule singole (singlets) si distribuiscono in maniera omogenea lungo una retta in quanto, in forma singola, presentano valori di area, altezza e larghezza simili. Sono state quindi selezionate, nell'ordine, le cellule T CD3+, separate poi in cellule T CD8+ e CD4+; quindi, sono state identificate le cellule T CD8+ CD44+ e, al loro interno, selezionate le cellule esprimenti IFNγ.

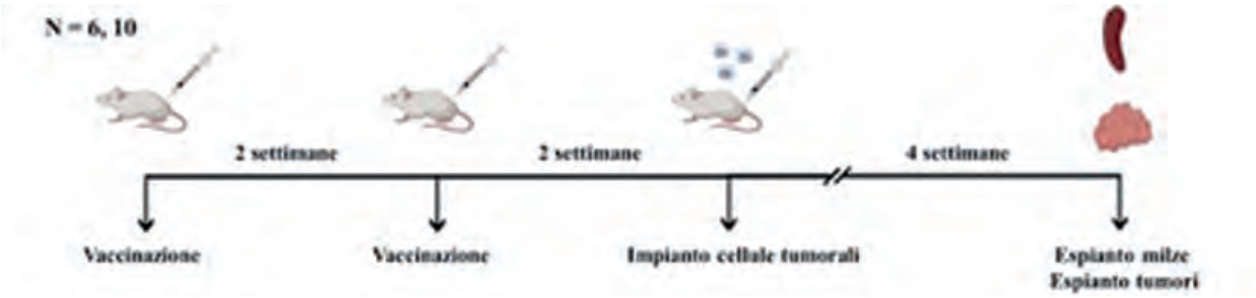


Figura 4. Schema dello studio di efficacia preventiva che mostra la sequenza temporale delle procedure effettuate in un modello murino basato sul ceppo FVB/N. I topi sono stati vaccinati 2 volte a distanza di 2 settimane, secondo il protocollo ottimizzato nel laboratorio e, a distanza di 2 settimane dalla seconda immunizzazione, sono stati inoculati s.c. con 2 x 10^5 cellule 305. La crescita tumorale è stata monitorata per 30 giorni. Al termine del follow-up è stato eseguito l'espianto delle milze (e dei tumori). Nello schema è indicato il numero di topi arruolati per gruppo: 10 per tutti i gruppi, ad eccezione del gruppo di controllo Nef^{mut} (6).

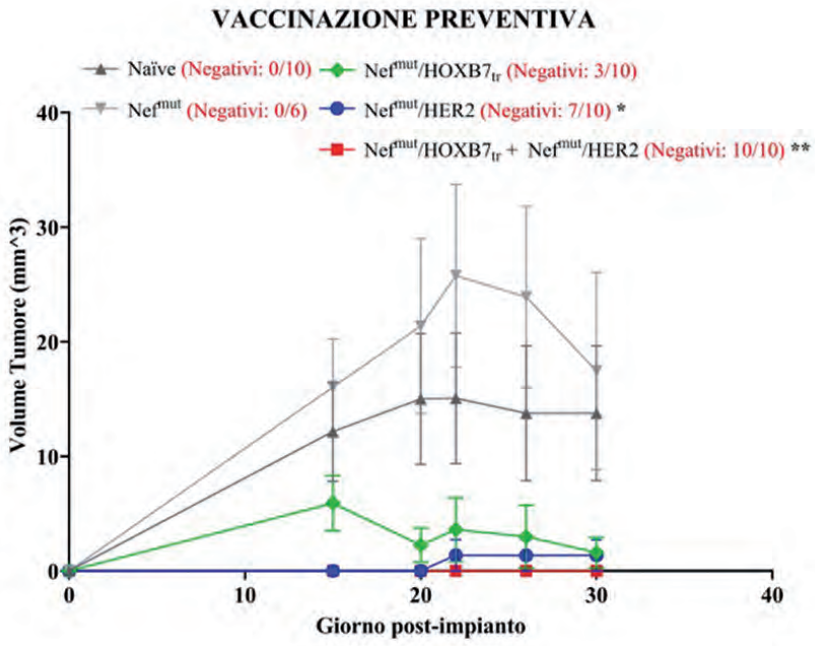


Figura 5. Grafico della cinetica di crescita dei tumori nel modello di efficacia preventiva. Dati riportati come volumi medi (±ES) delle masse tumorali misurati per ciascun gruppo ad ogni time point di osservazione. Il monitoraggio è stato condotto per 30 giorni dall'impianto delle cellule tumorali e i volumi calcolati secondo la formula (diametro maggiore x diametro minore^2)/2. In alto è riportata la legenda con i vari gruppi sperimentali e di controllo, e la frequenza di topi negativi per il tumore riscontrata in ciascun gruppo; la significatività statistica dei risultati rispetto al controllo Nef^{mut}, ove presente, è indicata di seguito al nome del gruppo; p-values: * < 0,05; ** < 0,01.

Analisi citofluorimetrica e strategia di "gating" delle popolazioni cellulari

I parametri di acquisizione sono stati settati per acquisire 1.000.000 di cellule per ciascun campione. La strategia di *gating* delle popolazioni cellulari è stata ottimizzata per questo tipo di analisi, ed è descritta nella **Figura 3**. La soglia di positività è stata settata sulla base dei risultati ottenuti nei campioni trattati con peptide scorrelato. Tutte le analisi sono state condotte con software Kaluza (Beckman Coulter).

Analisi statistiche

Quando appropriato, i dati sono stati presentati come media con l'errore standard (±ES). I confronti dei tempi di crescita tumorale tra i gruppi sperimentali e di controllo, negli esperimenti di efficacia preventiva, sono stati eseguiti utilizzando il test non parametrico per misure ripetute di Friedman, con correzione per confronti multipli mediante test di Dunn. L'analisi statistica delle risposte T CD8 specifiche è stata condotta, invece, applicando il test non parametrico di Kruskal-Wallis con correzione per confronti multipli (test di Dunn). Per le analisi di correlazione è stato usato il test di correlazione non parametrico di Spearman Rank; *p-values* (p) < 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi; p < 0,01 sono stati considerati statisticamente molto significativi. Nelle figure, la *Star scale* è stata assegnata come segue: * < 0,05; ** < 0,01. Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il software GraphPad Prism 9.

una doppia immunizzazione contro i due TAA, HOXB7 ed HER2, rispetto a quella singola contro HER2 (Anticoli et al., 2018), sono stati condotti studi preclinici di efficacia in un modello murino di vaccinazione antitumorale preventiva. Come schematizzato nella **Figura 4**, gruppi di 10 topi (Naïve; $Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$; Nef^{mut}/HER2; $Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$ + Nef^{mut}/HER2) o di 6 topi (Nef^{mut}) sono stati immunizzati mediante inoculo di DNA i.m., secondo il protocollo di vaccinazione descritto nella sezione "materiali e metodi". Dai risultati ottenuti (**Figura 5**) si evidenzia come l'immunità T CD8 specifica indotta dall'inoculo di vettori di DNA singoli esprimenti $Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$ o Nef^{mut}/HER2 è abbastanza forte da generare un effetto antitumorale specifico che si è tradotto in un 30% di topi protetti dallo sviluppo di masse tumorali nel primo caso, e in un 70% nel secondo caso, dove questo effetto generato è significativo rispetto al controllo. La vaccinazione con la combinazione degli stessi due vettori ($Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$ + Nef^{mut}/HER2) è stata invece in grado di proteggere il 100% dei topi dallo sviluppo di tumori, generando un effetto antitumorale statisticamente molto significativo.

Dal momento che, in ambito oncologico, l'induzione di linfociti T CD8+ specifici contro antigeni tumorali correla con una prognosi migliore e una maggiore probabilità di sopravvivenza, e con l'obiettivo di valutare la presenza di eventuali correlati di protezione, per ciascun topo (N = 5), sono state analizzate le risposte T CD8 specifiche verso entrambi gli antigeni, HOXB7 e HER2

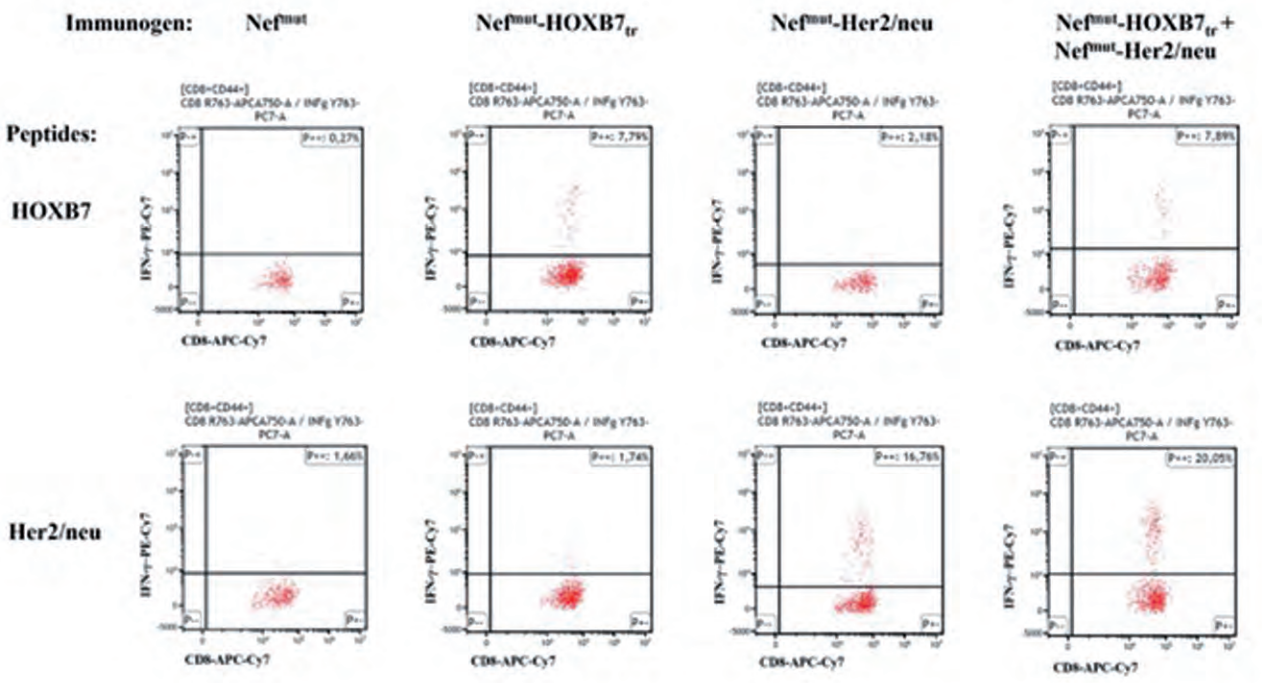


Figura 6. Rilevamento mediante analisi ICS/citofluorimetrica di cellule T CD8+ specifiche per HOXB7 e HER2. Campioni derivati da splenociti isolati da topi FVB/N (N = 5) immunizzati per via i.m. con vettori di DNA Nef^{mut}, $Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$, Nef^{mut}/HER2, o $Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$ + Nef^{mut}/HER2. Sono presentati dati RAW presi da un'analisi rappresentativa di linfociti T CD8+ esprimenti IFNγ.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Efficacia in modello di vaccinazione antitumorale

Per verificare se le risposte immunitarie T specifiche, indotte nei topi immunizzati per HOXB7 (dati non mostrati), siano in grado di generare un effetto antitumorale, e per valutare i possibili effetti positivi derivati da (**Figura 6, 7**), mediante saggi di stimolazione dei linfociti T con peptidi specifici, seguiti da marcatura ICS e analisi FACS. Per quanto riguarda HOXB7 (**Figura 7A**), emergono risposte T CD8 specifiche e statisticamente significative in entrambi i gruppi di immunizzazione per questo antigene, sia singolarmente che nella combinazio-

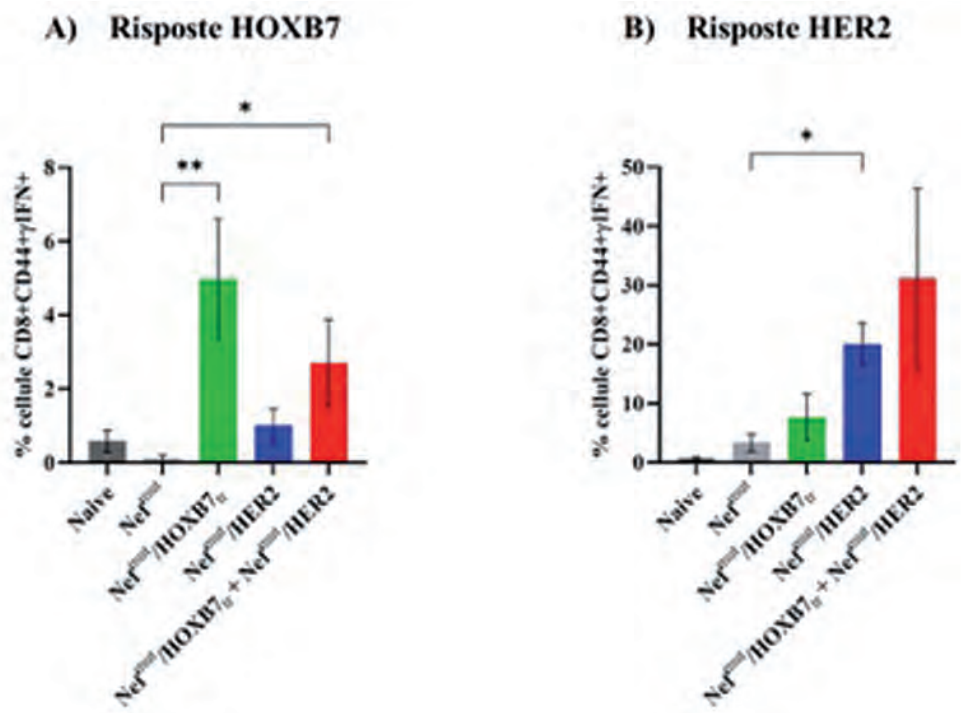


Figura 7. Risposte T CD8+ specifiche contro gli antigeni HOXB7 ed HER2, analizzate tramite ICS e l'ausilio di un citofluorimetro a flusso. Percentuale media (±ES) di cellule che esprimono IFNγ, rispetto alla popolazione di linfociti T CD8+ CD44+ specifici per HOXB7 (A) o HER2 (B) in ciascun gruppo di immunizzazione (N = 5); p-values: * < 0,05; ** < 0,01.

ne. Anche per quanto riguarda HER2 (**Figura 7B**), si riscontrano risposte T CD8 specifiche nei gruppi vaccinati per HER2 e per la combinazione di entrambi gli antigeni, con il primo che raggiunge la significatività statistica. Per valutare se l'immunizzazione abbia avuto effetto anche sull'attivazione dei linfociti T CD4+, nell'analisi delle risposte HOXB7, è stato verificato il rilascio di IFNγ da parte di questa sottopopolazione di linfociti, ma non è stato riscontrato alcun segnale degno di nota (dati non mostrati). Le analisi di correlazione, condotte tra i volumi delle masse tumorali registrate al sacrificio e le risposte riscontrate nelle milze verso i due antigeni, hanno identificato come correlati di protezione le risposte T CD8 specifiche dirette sia contro HOXB7 che HER2.

Nel complesso, quello che emerge chiaramente è il contributo significativo apportato dall'immunizzazione verso HOXB7 nella vaccinazione combinata verso i due antigeni, che consente di generare un effetto antitumorale sufficiente a prevenire lo sviluppo delle masse tumorali in tutti i topi vaccinati con i vettori $Nef^{mut}/HOXB7_{tr}$ e Nef^{mut}/HER2. Questi dati confermano l'ipotesi secondo cui una possibile contromisura per contrastare il fenomeno di *escape*, consiste nell'utilizzo di strategie che agiscano su target tumorali multipli, tagliando le vie di fuga alle cellule tumorali, e consentendone quindi l'eliminazione.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nonostante l'impegno costante e l'apporto di conoscenze sempre più dettagliate riguardo la biologia e i meccanismi alla base di sviluppo ed evoluzione del cancro della mammella, la sua cura rimane tutt'oggi una sfida ardua (Nolan, Lindeman and Visvader, 2023) e nessun vaccino si è rivelato sufficientemente efficace da essere approvato per il trattamento di questa patologia (Davodabadi et al., 2022). In questo lavoro è stata presentata un'innovativa e originale strategia vaccinale, basata su EV ingegnerizzate endogenamente, contro il cancro della mammella che offre numerosi vantaggi rispetto agli attuali limiti delle immunoterapie antitumorali. Possiamo concludere che:

- ✓ L'immunità T CD8 specifica indotta nei confronti dei singoli antigeni, HOXB7 o HER2, è sufficientemente forte da generare un effetto antitumorale specifico in un modello di efficacia preventiva.
- ✓ La combinazione di vettori di DNA esprimenti HOXB7 o HER2, fusi a Nef^{mut}, è abbastanza potente da proteggere i topi dallo sviluppo dei tumori, quando somministrata come vaccino preventivo.

Nell'ottica di un possibile sviluppo di questa piattaforma vaccinale in ambito clinico, sarà comunque necessario indagare, in studi futuri, la biodistribuzione e i potenziali effetti *off-target* delle EV ingegnerizzate con Nef^{mut}, per confermarne o, eventualmente, migliorarne il profilo di sicurezza. Uno dei principali ostacoli alla cura del cancro consiste nello sviluppo di resistenza nei confronti della terapia da parte delle cellule tumorali, con conseguente recidiva nel malato. In tale senso, sarebbe utile approfondire la durata dell'effetto protettivo indotto dalla vaccinazione nel modello di efficacia preventiva valutato, effettuando esperimenti che prevedano il reinoculo delle cellule tumorali a diversi tempi dal termine del ciclo di immunizzazione, per verificare se l'immunità CTL stimolata sia sufficientemente potente e durevole nel tempo. La capacità della strategia vaccinale basata su EV ingegnerizzate endogenamente di indurre una protezione sostenuta nel tempo è stata dimostrata nei confronti di tumori esprimenti TSA (Ferrantelli et al., 2021b) e di infezioni respiratorie (Manfredi et al., 2023).

Dunque, grazie alla sua specificità, flessibilità (ad es. vaccinare contro antigeni multipli), semplicità, e bassi costi, questa piattaforma vaccinale basata su EV ingegnerizzate endogenamente potrebbe rendere

possibile quello che oggi è considerato uno degli approcci potenzialmente più efficaci contro il cancro.

BIBLIOGRAFIA

1. Anticoli, S., Aricò, E., Arenaccio, C., Manfredi, F., Chiozzini, C., Olivetta, E., Ferrantelli, F., Lattanzi, L., D'Urso, M.T., Proietti, E. and Federico, M., 2018. Engineered exosomes emerging from muscle cells break immune tolerance to HER2 in transgenic mice and induce antigen-specific CTLs upon challenge by human dendritic cells. *Journal of Molecular Medicine*, 96(2), pp.211–221. https://doi.org/10.1007/s00109-017-1617-2.
2. Davodabadi, F., Sarhadi, M., Arabpour, J., Sargazi, S., Rahdar, A. and Díez-Pascual, A.M., 2022. Breast cancer vaccines: New insights into immunomodulatory and nano-therapeutic approaches. *Journal of Controlled Release*, 349, pp.844–875. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.07.036.
3. Di Bonito, P., Grasso, F., Mochi, S., Petrone, L., Fanales-Belasio, E., Mei, A., Cesolini, A., Laconi, G., Conrad, H., Bernhard, H., Dembek, C.J., Cosma, A., Santini, S.M., Lapenta, C., Donati, S., Muratori, C., Giorgi, C. and Federico, M., 2009. Anti-tumor CD8+ T cell immunity elicited by HIV-1-based virus-like particles incorporating HPV-16 E7 protein. *Virology*, 395(1), pp.45–55. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.012.
4. Federico, M., 2023. The Limitations of Current T Cell-Driven Anticancer Immunotherapies Can Be Overcome with an Original Extracellular-Vesicle-Based Vaccine Strategy. *Vaccines*, 11(12), p.1847. https://doi.org/10.3390/vaccines11121847.
5. Ferrantelli, F., Chiozzini, C., Manfredi, F., Giovannelli, A., Leone, P. and Federico, M., 2021a. Simultaneous CD8+ T-Cell Immune Response against SARS-Cov-2 S, M, and N Induced by Endogenously Engineered Extracellular Vesicles in Both Spleen and Lungs. *Vaccines*, 9(3), p.240. https://doi.org/10.3390/vaccines9030240.
6. Ferrantelli, F., Manfredi, F., Chiozzini, C., Anticoli, S., Olivetta, E., Arenaccio, C. and Federico, M., 2018. DNA Vectors Generating Engineered Exosomes Potential CTL Vaccine Candidates Against AIDS, Hepatitis B, and Tumors. *Molecular Biotechnology*, 60(11), pp.773–782. https://doi.org/10.1007/s12033-018-0114-3.
7. Ferrantelli, F., Manfredi, F., Chiozzini, C., Leone, P., Giovannelli, A., Olivetta, E. and Federico, M., 2021b. Long-Term Antitumor CD8+ T Cell Immunity Induced by Endogenously Engineered Extracellular Vesicles. *Cancers*, 13(9), p.2263. https://doi.org/10.3390/cancers13092263.
8. Kisakov, D., Belyakov, I., Kisakova, L., Yakovlev, V., Tigeeva, E. and Karpenko, L., 2024. The use of electroporation to deliver DNA-based vaccines. *Expert review of vaccines*, [online] 23(1). https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2292772.
9. Liu, S., Jin, K., Hui, Y., Fu, J., Jie, C., Feng, S., Reisman, D., Wang, Q., Fan, D., Sukumar, S. and Chen, H., 2015. HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGFβ signaling pathway. *Cancer research*, [online] 75(4). https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3100.
10. Manfredi, F., Chiozzini, C., Ferrantelli, F., Leone, P., Pugliese, K., Spada, M., Di Virgilio, A., Giovannelli, A., Valeri, M., Cara, A., Michelini, Z., Andreotti, M. and Federico, M., 2023. Antiviral effect of SARS-CoV-2 N-specific CD8+ T cells induced in lungs by engineered extracellular vesicles. *npj Vaccines*, 8(1), p.83. https://doi.org/10.1038/s41541-023-00686-y.
11. Nolan, E., Lindeman, G.J. and Visvader, J.E., 2023. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, 186(8), pp.1708–1728. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.040.
12. Schreiber, R., Old, L. and Smyth, M., 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, [online] 331(6024). https://doi.org/10.1126/science.1203486.
13. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp.209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660.
14. Waldman, A.D., Fritz, J.M. and Lenardo, M.J., 2020. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 20(11), pp.651–668. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5.

QUOTA ASSOCIATIVA GIC 2025... E QUELLE ARRETRATE

Carissimo Socio, come sai, la quota sociale, oltre ad essere la principale fonte di finanziamento per il funzionamento della nostra Società, è anche un segno annuale di adesione e partecipazione.

La quota sociale, attualmente ad un livello minimo, è un dovere che ogni Socio deve assolvere entro il 31 marzo di ogni anno, onde evitare che la gestione delle quote con relativi solleciti e verifiche abbia un costo superiore alla stessa quota.

La quota per il 2024 e per il 2025 è di € 25,00 annuale e potrà essere versata tramite assegno circolare o bancario, non trasferibile, intestato a Società Italiana di Citometria oppure tramite versamento in contanti alla Segreteria oppure mediante bonifico bancario: c/c n. 4350 c/o Banca Nazionale del Lavoro 6385 Roma Casaccia, Via Anguillarese 301 - 00123 Roma.

Coordinate bancarie IBAN: IT 04B0100503385000000004350 indicando nella causale: Cognome e Nome del Socio e quota associativa GIC: (anno).

Con l'intento di favorire i cosidetti "non strutturati" (studenti, borsisti, etc.) la quota sociale è ridotta a € 15,00, chi si trova in questa condizione dovrà esplicitamente dichiararlo mediante autocertificazione contestualmente all'invio della quota annuale.

Fiduciosi della tua collaborazione e partecipazione, cogliamo l'occasione per inviarti i nostri più cari saluti.

LA SEGRETERIA

La riproducibilitá del dato citofluorimetrico é di grande utilitá nello studio delle patologie mieloidi

Muccio Vittorio Emanuele, Pautasso Marisa
Laboratorio di Citofluorimetria
S.C.D.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Mucrobiologiche
A.O.U. San Luigi Gonzaga Orbassano (Torino)

e-mail: v.muccio@sanluigi.piemonte.it

Abstract
Despite the last international classifications of myeloid diseases and acute myeloid leukemias give a primary role to the genetic abnormalities in the diagnosis and monitoring, the flow cytometry represents a useful tool because is fast and well consolidated. Most of flow cytometric abnormalities observed in the pathological population are characterized by the abnormal expression of surface antigens that presents a lower or higher intensity than normal counterpart. The increase of the reproducibility of the flow cytometric results is needed to better discriminate the differences between normal and abnormal populations, in particular in the monitoring of MRD. Here are presented the strategies adopted in our laboratory to try to obtain the best performances over the time to perform an effective study of myeloid diseases.

Introduzione
Le sindromi mielodisplastiche (MDS) o neoplasie mieloproliferative (MPN) sono un gruppo eterogeneo di patologie che coinvolgono una o più linee cellulari mieloidi del midollo osseo. Tali patologie sono caratterizzate da displasia morfologica, che porta ad una ematopoiesi inefficace o da una proliferazione incontrollata (in particolare per le forme croniche) e presentano un rischio elevato di evoluzione a leucemia acuta mieloide (LAM) (Fontana D. et al. 2023). Le LAM sono patologie caratterizzate dalla proliferazione incontrollata e clonale di un precursore staminale della linea mieloide (Shimony S. et al. 2023). Per la definizione di queste patologie, nel 2022 sono state pubblicate due diverse classificazioni da parte della World Health Organization (Khoury J. D. et al. 2022) e dell'International Consensus Classification (Arber D. A. et al. 2022). Al di là delle differenze più o meno marcate che emergono tra questi due criteri classificativi, ciò che condividono è il ruolo preponderante assunto dalle alterazioni citogenetiche e molecolari nella caratterizzazione di queste patologie. Recentemente, l'International Consortium for Myelodisplastic Syndromes, classificando retrospettivamente i pazienti con entrambi i sistemi, ha individuato quelle che sono le alterazioni molecolari che comportano variazioni significative in termini di sopravvivenza e proposto un algoritmo che armonizzasse e semplificasse la classificazione delle MPN in cui solo in ultima istanza si tiene conto della percentuale di blasti presenti nel midollo osseo (Komrokji R. S. et al. 2024).
La citofluorimetria è sempre stata un utile strumento diagnostico nella valutazione delle neoplasie mieloproliferaive in quanto permette di valutare molti aspetti, in termine di espressione di marcatori di superficie, delle varie linee cellulari coinvolte in questo tipo di patologie. Malgrado la rilevanza riservata alle aberrazioni molecolari e citogenetiche, la citofluorimetria riveste un ruolo essenziale nella diagnosi differenziale delle citopenie, nel loro follow up, in tutte quelle situazioni in cui non sia possibile studiare integralmente tutte le alterazioni genetiche e in quei casi in cui ci si trovi di fronte a una percentuale di blasti superiore al 10% in assenza di alterazioni molecolari (Verigou E. et al. 2024).

La citofluorimetria nelle patologie mieloidi
Le recenti indicazioni dell'European LeukemiaNet e dell'International Myelodysplastic Syndrome Flow Cytometry Working Group, riassunte nella Tabella 1, possono essere considerate un validissimo punto di riferimento e raccolgono le variazioni di espressione dei marcatori di superficie sulle diverse popolazioni cellulari coinvolte (Porwit A. et al. 2023).
Le alterazioni caratteristiche dei progenitori mieloidi consistono in un incremento della percentuale sia come cellule CD34 positive che come cellule CD45 debolmente positive. Generalmente nelle MDS/MPN si riscontra un valore >2%, mentre un valore >3% è considerato un cut-off critico oltre il quale la probabilità di essere in un contesto di MDS/MPN è molto alta. In genere questo incremento si accompagna ad una riduzione dei precursori linfoidi B CD34 positivi. Inoltre, si puó osservare un aumento dei precursori che esprimono il CD117 e perdono il CD34 (che sono la causa piú frequente della sottostima della percentuale di blasti citofluorimetrica rispetto alla morfologica), e delle cellule che coesprimono CD34 e CD123, una perdita di espressione di marcatori normalmente espressi come CD38, CD13, CD33, HLA-DR, l`espressione di marcatori aberranti come CD2, CD4, CD5, CD7, CD56 o l`espressione asincrona del CD11b (Kriegsman K. et al. 2018).
Bisogna considerare, però, che, talvolta, nei midolli rigeneranti si può osservare una piccola popolazione positiva per CD34, CD7 e CD13 a bassa intensità di fluorescenza e che l`espressione del CD11b può verificarsi nel midollo di pazienti trattati con fattori di crescita.
Le alterazioni citofluorimetriche della popolazione granulocitaria sono tra quelle piú indicative di patologia mielodisplastica. In genere i granulociti presentano una riduzione del loro side scatter dovuto ad ipogranularitá, che spesso è rapportato a quello dei linfociti per avere un dato che possa essere utilizzato indipendentemente da piattaforma o metodo usato per la determinazione, ed una riduzione in termini percentuali sul totale delle cellule. Inoltre, si puó verificare la perdita o ridotta espressione del CD33, CD15 e del CD10, l`acquisizione

Popolazione in esame	Alterazione
Precursori mieloidi	Incremento della popolazione CD45dim
	Incremento percentuale nel midollo osseo delle cellule positive per CD34
	Aumento dell'intensità del CD34
	Diminuzione della popolazione CD34+/CD117+ con aumento dei blasti CD34-/CD117+
	Aumento delle cellule CD34+ con espressione ridotta o negativa del CD38
	Aumento delle cellule CD34+ negative per CD45
	Aumento delle cellule CD34+/CD123+
	Ridotta proporzione dei progenitori linfoidi CD34+/CD19+ nel totale delle cellule CD34+
	Maggiore proporzione delle cellule CD34+ con espressione ridotta o negativa per HLA-DR
	Alterata espressione di marcatori mieloidi CD13+/CD33- o CD13-/CD33+
	Espressione aberrante di: CD2, CD4, CD5, CD7, CD56
	Elevata espressione del CD11b
Granulociti	Ridotto rapporto di SSC dei granulociti rispetto ai linfociti
	Ridotta percentuale della popolazione granulocitaria
	Espressione asincrona sui granulociti maturi del CD34
	Espressione aberrante di CD5, CD7, CD56
	Formazione di pattern aberranti dovuti ad alterata espressione di CD13, CD16 e CD11b mediante dot plot con CD11b/CD16 e CD13/CD16
	Espressione anomala di CD15 e CD10
	Ridotta intensità di espressione del CD33
Monociti	Ridotta espressione di CD13, CD14, CD15, CD36, CD64, HLA-DR, CD11b, CD11c
	Espressione aberrante di CD56 e CD2
	Monociti classici (CD16-/CD14+) che rappresentano ≥ 94% dei monociti totali
	Ridotto SSC
Eritroidi	Aumento percentuale della popolazione eritroide
	Aumentata o diminuita percentuale degli elementi eritroidi che esprimono il CD117
	Aumentato CV ed MFI del CD71
	Aumento del CV del CD36
	Aumento o riduzione del CD105 in termini percentuali e di MFI
	Alterato rapporto tra CD235a e CD71

Tabella 1.
Alterazioni citofluorimetriche caratteristiche delle diverse popolazioni cellulari in un contesto di MDS/MPN.

dell`espressione asincrona del CD34 o l`espressione aberrante di marcatori quali CD5, CD7, CD56. Di notevole aiuto per lo studio dei granulociti é la valutazione di tutti gli elementi in fase di maturazione (promielociti, mielociti/metamielociti, band cells/maturi) tramite dot plot che valutano in contemporanea l`espressione di CD11b/CD16, CD13/CD16 e CD11b/CD66b. Infatti, in caso di mielodisplasia l`espressione di questi antigeni risulta alterata e anche le popolazioni in fase di maturazione presentano delle proporzioni anomale (Figura 1).
Nella valutazione di queste caratteristiche, peró, é necessario prestare attenzione al contesto clinico del paziente o alla qualitá del campione. Infatti, il side scatter puó essere ridotto a causa del deterioramento del campione, il CD10 puó essere ipoespresso in caso di malattie autoimmuni, il CD33 puó essere ipoespresso a causa di alcuni polimorfismi genetici, il CD56 puó essere iperespresso in contesti infiammatori cosí come, in questi casi, puó esserci un aumento delle forme immature. Inoltre, l`espressione del CD16 e del CD66b é ridotta nel caso di presenza di un clone di emoglobinuria parossistica notturna.
Anche la linea monocitaria puó assumere delle caratteristiche peculiari in caso di mielodisplasia. Infatti, i monociti possono presentare una ridotta espressione di CD13, CD14, CD15, CD36, CD64, HLA-DR, CD11b, CD11c, o un`espressione aberrante di CD56 e CD2 o avere un ridotto side scatter. Inoltre, bisogna prestare attenzione

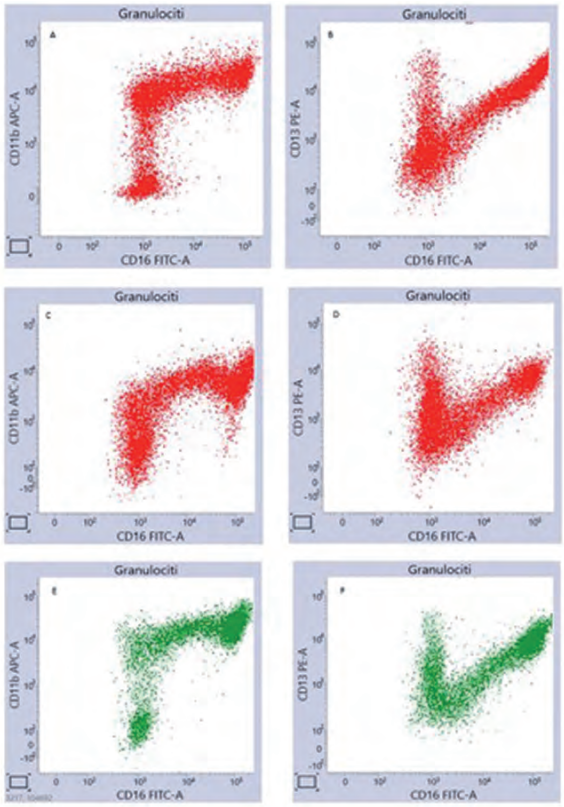


Figura 1.
Alterata distribuzione delle forme immature granulocitarie (A, B, C, D) e regolare maturazione (E, F).

alle forme immature come i promonociti, che esprimono il CD64, il CD33 e non esprimono il CD14 poiché sono considerati "blasti equivalenti" in termini di importanza clinica (Figura 2). Infine, in caso di patologia mieloproliferative, i monociti sono costituiti per una elevata percentuale (≥ 94%) da monociti classici (CD16-/CD14+) con una ridotta presenza di monociti intermedi (CD16+/CD14+) e non classici (CD16+/CD14-) (Döhner H. et al. 2022) .

Anche la linea eritroide puó essere di aiuto nell`identificare situazioni patologiche sebbene mostri alterazioni citofluorimetriche meno definite. In genere nelle mielodisplasie la popolazione eritroide é maggiormente rappresentata in termini percentuali e mostra un aumento del CV dei CD36 e CD71, un alterato rapporto tra CD235a e CD71, una ridotta intensitá di espressione del CD71, un`alterata percentuale di elementi positivi per CD117 e CD105 (Porwit A. et al. 2023). Senza dubbio le evidenze più robuste sono quelle ottenute dal CD71 e il CD36 che hanno dimostrato maggiore capacità di discriminare tra pazienti sani e con MDS anche su un'ampia coorte di pazienti (Westers T. M. et al. 2017) sebbene rimangano delle zone grigie tra pazienti sani e malati. Inoltre, il CD71 e il CD36 risultano ridotti in termini di intensità media di fluorescenza anche in pazienti con anemia o in midolli rigeneranti (Stetler-Stevenson M. et al. 2001). Inoltre, a causa della labilità delle cellule eritroidi, in particolare quelle più mature, ci sono numerosi studi che ritengono che lo studio della linea eritroide sarebbe inficiato dal processo di lisi (Mathis S. et al. 2013). Questo argomento, però, è ancora controverso e, comunque, usare una modalità di preparazione dedicata per un tubo specifico rende difficile il suo utilizzo in una routine consolidata.

Scores citofluorimetrici adottati nelle patologie mieloidi

Alcuni dei parametri menzionati sopra, combinati in maniera differente, hanno rivelato una certa utilità nel comporre svariati sistemi per calcolare la probabilità di trovarsi di fronte ad una MDS/MPN (Tabella 2)

Uno degli score più diffusi è quello di Ogata del 2009 che si basa sulla valutazione di pochi parametri essenziali ottenibili in maniera semplice. È prevista l'assegnazione di un punto se si verifica una di queste condizioni:

1. Mieloblasti > 2%
2. % precursori B sulla totalitá delle CD34+ ≤ 5%
3. Rapporto MFI del CD45 dei linfociti/ MFI CD45 dei mieloblasti ≤ 4 o ≥ 7.5
4. Rapporto SSC dei granulociti/SSC dei linfociti ≤ 6

Nel 2018 c'è stato un aggiornamento da parte del gruppo di Ogata dello score, riducendo i parametri da considerare e modificandone il loro peso.

1. Se i mieloblasti > 2% sono assegnati 2 punti
2. Se il rapporto SSC dei granulociti/SSC dei linfociti ≤ 6 si assegna 1 punto
3. Se il rapporto MFI del CD33 sui granulociti/MFI del CD33 sulle cellule CD34+ ≤ 2.5 si assegna un punto

In entrambi i casi uno score ≥ 2 é fortemente indicativo di patologia mielodisplastica (Ogata K. et al. 2018).

Uno degli score più recenti è il cosiddetto MDS-PB13. Questo score si basa su 13 parametri, riportati in Tabella 3, valutati su sangue periferico: un valore ≥3 è fortemen-

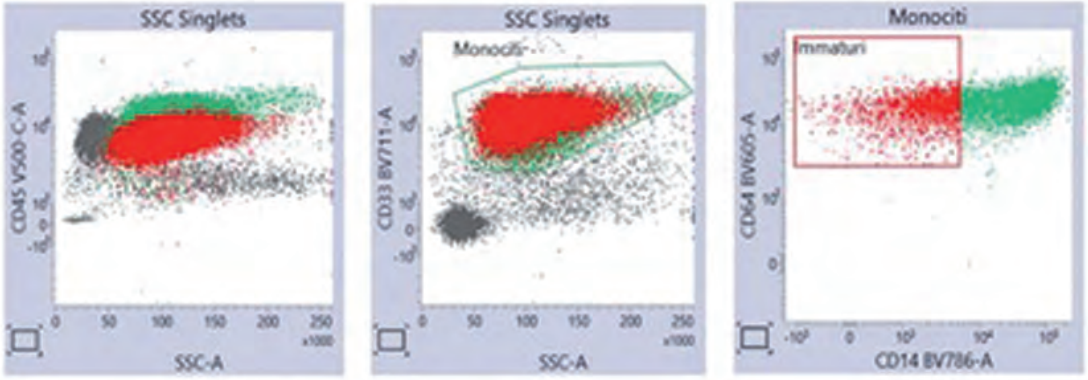


Figura 2. Dot plot che mostrano la presenza di monociti immaturi.

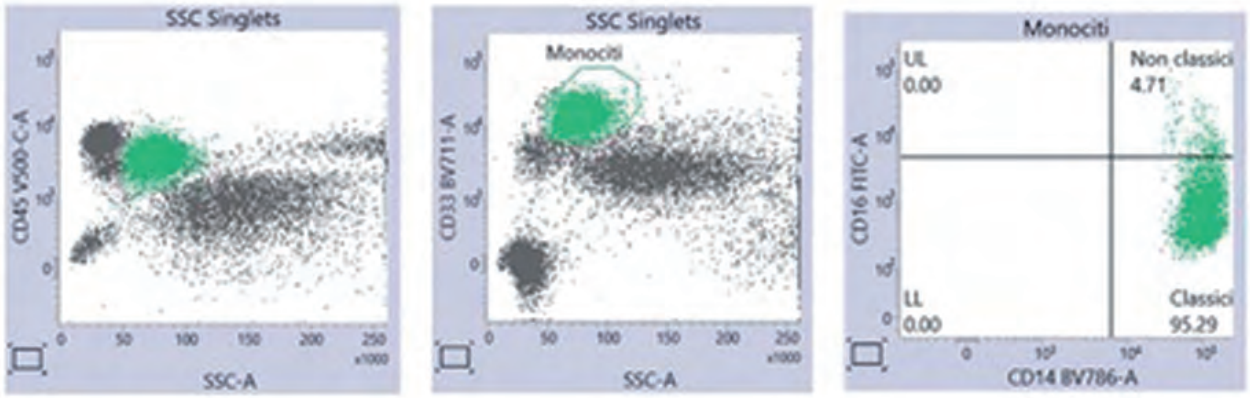


Figura 3. Dot plot che mostrano la prevalenza di monociti classici di un caso di Leucemia mielomonocitica cronica.

Primo autore e anno di pubblicazione dello score	Campioni valutati
Cherian S. et al. 2005	Sangue periferico
Ogata K. et al. 2009	Sangue midollare
Rashidi H.H. et al. 2012	Sangue periferico
Meyerson H.J. et al. 2013	Sangue periferico e midollare
Cremers E. L. P. et al. 2017	Sangue midollare
Aires A. et al. 2018	Sangue periferico
Ogata K. et al. 2018	Sangue midollare
Alayed K. et al. 2020	Sangue midollare
Wagner-Ballon O. et al. 2023	Sangue periferico e midollare
Oelschlaegel U. et al. 2024	Sangue periferico
Mathis S. et al. 2013	Sangue midollare
Westers T.M. et al. 2017	Sangue midollare

Tabella 2. Alcuni dei più diffusi metodi usati per calcolare un punteggio basato su parametri citofluorimetrici che aiutano ad individuare i pazienti con MDS/MPN.

te indicativo di MDS. Questo è uno score veloce e non invasivo, su sangue periferico, per individuare quei pazienti che necessitano con maggiore urgenza di ulteriori indagini su un campione di aspirato midollare (Oelschlaegel U. et al. 2024)

Anche per la linea eritroide sono stati elaborati degli score. Uno di questi è il cosiddetto RED score (Mathis S. et al. 2013) in cui un aumento del CV del CD71 ≥80 dà 3 punti, un aumento del CV del CD36 ≥65 dà 2 punti ed un valore di emoglobina più basso di 1,5 g/dL rispetto al limite minimo di normalità dà 2 punti; un punteggio ≥3 è indicativo di MDS. Un altro score è quello elaborato dall'IMDSFlow working group (Westers T. M. et al. 2017) in cui un aumento del CV del CD36 ≥145 dà 1 punto, un aumento del CV del CD71 ≥133 dà 1 punto, una riduzione dell'MFI del CD71 ≤46 dà 1 punto, un'alterata percentuale di progenitori eritroidi CD117+, individuati nell'ambito della popolazione eritroide, ≤36 o ≥212 dà 1 punto; un punteggio ≥2 è indicativo di MDS. Questi valori, però, sono da intendere come relativi rispetto ad una popolazione di almeno 10 soggetti sani testati con i propri anticorpi ed i propri settings strumentali.

La citofluorimetria nelle LAM

Nelle leucemie acute mieloidi (LAM), invece, con le nuove classificazioni ha preso ampio spazio la biologia molecolare. Infatti, é stato ridotto il limite finora adottato del 20% di blasti nel sangue midollare al 10% purché siano presenti determinate alterazioni molecolari. Tale sistema classificativo è adottato anche nella classificazione fatta dall'European LeukemiaNet (Döhner H. et al. 2022).

La citofluorimetria mantiene comunque un ruolo importante per la diagnosi rapida, la caratterizzazione delle LAM, di cui riesce ad individuare il lineage, misto o no, anche in assenza di determinate alterazioni genetiche e citogenetiche, la valutazione del grado di maturazione del compartimento midollare e la valutazione della malattia minima residua.

Parametro	Cut-off	Punteggio assegnato
SSC ratio Granulociti/Linfociti	<5	1
MFI CD11b sui Granulociti	<8000	1
MFI CD13 sui Granulociti	<15000	1
MFI CD16 sui Granulociti	<1000	1
CD10 % sui Granulociti	<90	1
CD34 % sui Granulociti	>5	1
CD56 % sui Granulociti	>5	1
% di Monociti classici/non classici	>94/<2.5	1
CD56% sui Monociti	>5	1
Progenitori mieloidi	>0.1	1
Rapporto SSC dei Precursori mieloidi/SSC dei Linfociti	<0.9 o >1.4	1
Rapporto MFI CD45 Linfociti/ Precursori mieloidi	<4 o >7.2	1
%CD56	>20	1

Tabella 3. Parametri valutati dall'MDS-PB13 score (Oelschlaegel U. et al. 2024).

Numerosi studi sono stati fatti per cercare una correlazione tra alterazioni molecolari e citofluorimetriche. Una delle alterazioni piú frequenti é la mutazione di NPM1 e, in alcuni casi, puó essere associato a DNMT3A, FLT3, TET2, IDH1 e IDH2. In concomitanza con la mutazione di NPM1, in citofluorimetria osserviamo blasti negativi o con bassa espressione del CD34, CD13, HLA-DR, CD15, CD64 ed espressione aumentata di CD117, CD33, CD123. In particolare la negativitá per CD34 e HLA-DR può indurre la diagnosi errata di leucemia acuta promielocitica in cui, però, nei casi classici i parametri fisici ed in particolare la granulosità dei blasti può aiutare. La presenza di mutazioni di FLT3, sia ITD che TDK, sono associate ad un fenotipo che esprime CD34, CD123, CD25, CD99 ed elevata espressione del CD33. Invece, pazienti con mutazione di DNMT3A presentano alta espressione di HLA-DR e bassa espressione di CD34. La presenza della traslocazione PML-RARA della leucemia acuta promielocitica negativa per CD34 e HLA-DR, positiva per CD33 che risulta omogeneo e per CD13 che risulta eterogeneo (Pessoa F. M. C. P. et al. 2023).

Le anomalie 11q23 (MLL) presentano l'espressione di CD34, CD117, CD56, NG2 e di alcuni marcatori monocitari quali CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36 e Lisozima.

La traslocazione 8;21 (RUNX1), invece, si presenta con blasti positivi per CD34, HLA-DR, MPO, CD13 ed espressione asincrona o aberrante di CD15, CD19, CD56, cyCD79a e TdT.

Malgrado questi studi, però, è difficile trovare una relazione univoca tra fenotipo ed alterazione molecolare o citogenetica.

Oltre alla classificazione, alcune mutazioni rivestono anche un ruolo prognostico favorevole o sfavorevole e cosí anche alcune alterazioni citofluorimetriche. É stato dimostrato, infatti, che l`espressione del CD34 combinata ad un incremento del CD117 e una riduzione del CD38 e/o dell`HLA-DR é correlata ad una prognosi peggiore. Anche l`espressione del CD123, che generalmente si accompagna a riarrangiamenti di KMT2A e mutazioni di FLT3-ITD, ha un valore prognostico negativo (Lucas F. et al. 2023).

Infine, la citometria, di concerto con la biologia molecolare, consente di valutare la malattia residua misurabile (MRD) dopo terapia. La strategia per lo studio della MRD é duplice: da un lato si puó sfruttare l`espressione dei marcatori aberranti, cosiddetti fenotipi associati a leucemia (LAIP), e dall`altro si valutano le anomalie in termini di intensitá di espressione di alcuni marcatori normalmente espressi dai blasti, cosiddetta strategia "different from normal". In entrambi i casi é necessario avere un campione alla diagnosi e prestare attenzione alle popolazioni con fenotipo simile a quello patologico che in condizioni normali possono avere marcatori espressi in maniera transiente da progenitori non leucemici rigeneranti. In questi ultimi casi sarebbe opportuno aggiungere alla MRD un commento che indichi la transitorietá della popolazione rinvenuta (Heuser L. et al. 2021).

In queste condizioni é inevitabile che ci sia un peggioramento nella valutazione della MRD in termini di Limite di identificazione (LOD) e di quantificazione (LOQ). In condizioni normali, si considera sufficiente l'acquisizione di 500000 eventi per ottenere un livello di sensibilità clinicamente significativo.

Il nostro approccio nello studio delle patologie mieloidi

Appare chiaro da quanto descritto finora che spesso l`individuzione di una patologia mieloide si basi soprattutto sulla distinzione dell`intensitá di espressione di molteplici marcatori e alterazione di parametri fisici nelle diverse popolazioni cellulari implicate. Per fronteggiare al meglio questo tipo di studio, é necessario adottare tutta una serie di strategie che facciano in modo che nel tempo i risultati ottenuti siano confrontabili e riproducibili.

Nel nostro laboratorio abbiamo cercato di ottimizzare tutte le fasi di lavorazione del campione. Innanzitutto, tutti i campioni sono preparati con la metodica lisi-lavaggio-marcatura-lavaggio che consente un confronto ottimale dei parametri ottenuti tra diagnosi e valutazione della MRD (Muccio V. E. et al. 2018). La lisi, il lavaggio e l`incubazione delle provette sono tutte effettuate tramite BD FACS Lyse Wash Assistant (Becton Dickinson™) che consente di impostare programmi con quantitá di reattivi e tempi di reazione definiti.

Per cercare di ridurre al minimo errori di marcatura, abbiamo adottato un pannello a dodici colori composto da due tubi liofili ad otto colori disegnati dall`Euroflow (van Dongen J. J. et al. 2012) integrati ognuno con 4 anticorpi liquidi, riportati nella Tabella 4. Questi ultimi, inoltre, sono usati per preparare una miscela per dieci test in modo da ridurre sia i tempi di marcatura che la possibilitá di errore.

Nel caso in cui fossimo di fronte ad un sospetto di LAM, invece, allestiamo in aggiunta un tubo a dodici colori di anticorpi liquidi e tre tubi per la valutazione degli antigeni intracitoplasmatici (il primo dei quali é il tubo liofilo disegnato dall`Euroflow BD OneFlow™ ALOT) riportati in Tabella 5.

Come si puó evincere dalle tabelle, abbiamo cercato di avere un "bakbone" di anticorpi (CD45, CD117, CD34, HLA-DR) negli stessi colori in piú tubi per poter avere una strategia ripetibile e riproducibile per identificare i blasti in tutti i tubi allestiti.

Dal punto di vista strumentale, il FACSLyric (BD sfrutta la tecnologia BD FACS™ QC Cytometer Setup & Tracking che consente la valutazione delle performances strumentali ed il loro monitoragigo nel tempo. Il sistema fa uso di un modulo software e di biglie dedicate, le CS&T beads. Queste biglie consentono di impostare dei setting strumentali capaci di modificarsi automaticamente ad ogni Performance Quality Control, che eseguiamo quotidianemente, in modo da riposizionare la mean fluorescence delle popolazioni da rilevare, sempre nello stesso canale medio.

Tutti questi accorgimenti permettono una elevata standardizzazione dei risultati ottenuti nel tempo e di poter discriminare con un buon grado di sicurezza tutte quelle alterazioni immunofenotipiche che caratterizzano le patologie mieloidi. Infatti, con questo sistema, i discostamenti della popolazione cellulare patologica sono evidenti rispetto alla medesima popolazione sana e sono riproducibili nel tempo. Queste condizioni consentono, quindi, di poter aiutare il clinico nell'ottenere una diagnosi in tempi brevi, di evidenziare tempestivamente delle evoluzioni della patologia in esame e di effettuare un'efficiente valutazione della malattia residua misurabile, sebbene con le limitazioni riportate in precedenza. Inoltre, in questo modo è possibile notare eventuali cambiamenti immunofenotipici che si possono verificare in caso di recidiva post terapia e, quindi, possono rappresentare la base per la successiva valutazione della risposta ad una seconda linea terapeutica. Sicuramente l'aumento delle conoscenze nel campo delle alterazioni genetiche e molecolari di queste patologie continuerà ad aumentare il peso della diagnostica molecolare in queste patologie ma, malgrado ciò, la citofluorimetria può continuare a rivestire un ruolo di primaria importanza sia per la rapidità di esecuzione che per la capacità di identificare il lineage di appartenenza della popolazione blastica e dare una valutazione dell'intero contesto midollare.

FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500	APC-R700	BV605	BV711	BV786
CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	HLA-DR	CD45	CD56	CD64	CD33	CD14
CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	HLA-DR	CD45	CD38	CD45RO	CD15	CD45RA

Tabella 4. Pannello per lo screening delle MDS/MPD e LAM.

FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500	APC-R700	BV605	BV711	BV786
CD61+CD42a	CD19	CD34	CD117	CD33	CD9	HLA-DR	CD45	CD11a	CD2	CD7	CD11c
MPOcy	CD79α cy	CD34	CD19	CD7	CD3s	CD3cy	CD45				
TdTcy	CD22cy	CD34	CD19	IgM cy		CD45					
Lys cy		CD34		CD33			CD45				

Tabella 5. Pannello per lo studio delle LAM.

Bibliografia

1. Aires A, Teixeira MDA, Lau C, Moreira C, Spínola A, Mota A, Freitas I, Coutinho J, Lima M. A pilot study on the usefulness of peripheral blood flow cytometry for the diagnosis of lower risk myelodysplastic syndromes: the «MDS thermometer». BMC Hematol. 2018 Mar 13;18:6. doi: 10.1186/s12878-018-0101-8. PMID: 29564138; PMCID: PMC5850915.
2. Alayed K, Meyerson JB, Osei ES, Blidaru G, Schlegelmilch J, Johnson M, Meyerson HJ. CD177 Enhances the Detection of Myelodysplastic Syndrome by Flow Cytometry. Am J Clin Pathol. 2020 Mar 9;153(4):554-565. doi: 10.1093/ajcp/aqz196. PMID: 32011681.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, Wang SA, Bagg A, Barbui T, Branford S, Bueso-Ramos CE, Cortes JE, Dal Cin P, DiNardo CD, Dombret H, Duncavage EJ, Ebert BL, Estey EH, Facchetti F, Foucar K, Gangat

N, Gianelli U, Godley LA, Gökbuget N, Gotlib J, Hellström-Lindberg E, Hobbs GS, Hoffman R, Jabbour EJ, Kiladjian JJ, Larson RA, Le Beau MM, Loh ML, Löwenberg B, Macintyre E, Malcovati L, Mullighan CG, Niemeyer C, Odenike OM, Ogawa S, Orfao A, Papaemmanuil E, Passamonti F, Porkka K, Pui CH, Radich JP, Reiter A, Rozman M, Rudelius M, Savona MR, Schiffer CA, Schmitt-Graeff A, Shimamura A, Sierra J, Stock WA, Stone RM, Tallman MS, Thiele J, Tien HF, Tzankov A, Vannucchi AM, Vyas P, Wei AH, Weinberg OK, Wierzbowska A, Cazzola M, Döhner H, Tefferi A. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. Blood. 2022 Sep 15;140(11):1200-1228. doi: 10.1182/blood.2022015850. PMID: 35767897; PMCID: PMC9479031.

4. Cherian S, Moore J, Bantly A, Vergilio JA, Klein P, Luger S, Bagg A. Peripheral blood MDS score: a new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. Cytometry B Clin Cytom. 2005 Mar;64(1):9-17. doi: 10.1002/cyto.b.20041. PMID: 15668954.
5. Cremers EM, Westers TM, Alhan C, Cali C, Visser-Wisselaar HA, Chitu DA, van der Velden VH, Te Marvelde JG, Klein SK, Muus P, Vellenga E, de Greef GE, Legdeur MC, Wijermans PW, Stevens-Kroef MJ, Silva-Coelho PD, Jansen JH, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA; A study on behalf of the HOVON89 study group. Implementation of erythroid lineage analysis by flow cytometry in diagnostic models for myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2017 Feb;102(2):320-326. doi: 10.3324/haematol.2016.147843. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27658438; PMCID: PMC5286939.
6. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, Di Nardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. Blood. 2022 Sep 22;140(12):1345-1377. doi: 10.1182/blood.2022016867. PMID: 35797463.
7. Fontana D, Elli EM, Pagni F, Piazza R. Myelodysplastic Syndromes/Myeloproliferative Overlap Neoplasms and Differential Diagnosis in the WHO and ICC 2022 Era: A Focused Review. Cancers (Basel). 2023 Jun 13;15(12):3175. doi: 10.3390/cancers15123175. PMID: 37370785; PMCID: PMC10296742.
8. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, Tettero JM, Bachas C, Baer C, Béné MC, Bücklein V, Czyz A, Denys B, Dillon R, Feuring-Buske M, Guzman ML, Haferlach T, Han L, Herzig JK, Jorgensen JL, Kern W, Konopleva MY, Lacombe F, Libura M, Majchrzak A, Maurillo L, Ofran Y, Philippe J, Plesa A, Preudhomme C, Ravandi F, Roumier C, Subklewe M, Thol F, van de Loosdrecht AA, van der Reijden BA, Venditti A, Wierzbowska A, Valk PJM, Wood BL, Walter RB, Thiede C, Döhner K, Roboz GJ, Cloos J. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood. 2021 Dec 30;138(26):2753-2767. doi: 10.1182/blood.2021013626. PMID: 34724563; PMCID: PMC8718623.
9. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia. 2022 Jul;36(7):1703-1719. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1. Epub 2022 Jun 22. PMID: 35732831; PMCID: PMC9252913.
10. Komrokji RS, Lanino L, Ball S, Bewersdorf JP, Marchetti M, Maggioni G, Travaglino E, Al Ali NH, Fenaux P, Platzbecker U, Santini V, Diez-Campelo M, Singh A, Jain AG, Aguirre LE, Tinsley-Vance SM, Schwabkey ZI, Chan O, Xie Z, Brunner AM, Kuykendall AT, Bennett JM, Buckstein R, Bejar R, Carraway HE, DeZern AE, Griffiths EA, Halene S, Hasserjian RP, Lancet J, List AF, Loghavi S, Odenike O, Padron E, Patnaik MM, Roboz GJ, Stahl M, Sekeres MA, Steensma DP, Savona MR, Taylor J, Xu ML, Sweet K, Sallman DA, Nimer SD, Hourigan CS, Wei AH, Sauta E, D'Amico S, Asti G, Castellani G, Delleani M, Campagna A, Borate UM, Sanz G, Efficace F, Gore SD, Kim TK, Daver N, Garcia-Manero G, Rozman M, Orfao A, Wang SA, Foucar MK, Germing U, Haferlach T, Scheinberg P, Miyazaki Y, Iastrebner M, Kulasekararaj A, Cluzeau T, Kordasti S, van de Loosdrecht AA, Ades L, Zeidan AM, Della Porta MG; International Consortium on Myelodysplastic Syndromes. Data-driven, harmonised classification system for myelodysplastic syndromes: a consensus paper from the International Consortium for Myelodysplastic Syndromes. Lancet Haematol. 2024 Nov;11(11):e862-e872. doi: 10.1016/S2352-3026(24)00251-5. Epub 2024 Oct 9. Erratum in: Lancet Haematol. 2024 Dec;11(12):e886. Doi: 10.1016/S2352-3026(24)00339-9. PMID: 39393368.
11. Kriegsmann K, Löffler H, Eckstein V, Schulz R, Kräker S, Braun U, Luft T, Hegenbart U, Schönland S, Dreger P, Krämer A, Ho AD, Müller-Tidow C, Hundemer M. CD7 is expressed on a subset of normal CD34-positive myeloid precursors. Eur J Haematol. 2018 Sep;101(3):318-325. doi: 10.1111/ejh.13100. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29797671.
12. Lucas F, Hergott CB. Advances in Acute Myeloid Leukemia Classification, Prognostication and Monitoring by Flow Cytometry. Clin Lab Med. 2023 Sep;43(3):377-398. doi: 10.1016/j.cll.2023.04.005. Epub 2023 Jun 11. PMID: 37481318.
13. Meyerson HJ, Osei E, Schweitzer K, Blidaru G, Edinger A, Balog A. CD177 expression on neutrophils: in search of a clonal assay for myeloid neoplasia by flow cytometry. Am J Clin Pathol. 2013 Nov;140(5):658-69. doi: 10.1309/AJCPDFBEBQZW1OI7. PMID: 24124144.
14. Mathis S, Chapuis N, Debord C, Rouquette A, Radford-Weiss I, Park S, Dreyfus F, Lacombe C, Béné MC, Kosmider O, Fontenay M, Bardet V. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2013 Oct;27(10):1981-7. doi: 10.1038/leu.2013.178. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23765225.
15. Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, Oddolo D, Ruggeri M, Caltagirone S, Bruno B, Boccadoro M, Omedè P. Relevance of sample preparation for flow cytometry. Int J Lab Hematol. 2018 Apr;40(2):152-158. doi: 10.1111/ijlh.12755. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28984084.
16. Oelschlaegel U, Winter S, Sockel K, Epp K, Schadt J, Röhnert MA, Krüger T, Ruhnke L, Bornhäuser M, Platzbecker U, Kroschinsky F, von Bonin M. MDS-PB13 Score - Blood based detection of aberrancies by flow cytometry in patients with suspected and confirmed Myelodysplastic Neoplasms. Leukemia. 2024 Feb;38(2):446-450. doi: 10.1038/s41375-024-02141-w. Epub 2024 Jan 16. PMID: 38228682; PMCID: PMC10844065.
17. Ogata K, Della Porta M G, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, Yamashita T, Tamura H, Tsukada J, Dan K. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: A prospective validation study. Haematologica 2009 94(8), 1066–1074. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.008532
18. Ogata K, Sei K, Saft L, Kawahara N, Porta MGD, Chapuis N, Yamamoto Y. Revising flow cytometric mini-panel for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes: Introducing a parameter quantifying CD33 expression on CD34+ cells. Leuk Res. 2018 Aug; 71:75-81. doi: 10.1016/j.leukres.2018.07.009. Epub 2018 Jul 10. PMID: 30025279.
19. Pessoa FMCP, Machado CB, Barreto IV, Sampaio GF, Oliveira DS, Ribeiro RM, Lopes GS, de Moraes MEA, de Moraes Filho MO, de Souza LEB, Khayat AS, Moreira-Nunes CA. Association between Immunophenotypic Parameters and Molecular Alterations in Acute Myeloid Leukemia. Biomedicines. 2023 Apr 5;11(4):1098. doi: 10.3390/biomedicines11041098. PMID: 37189716; PMCID: PMC10135936.
20. Porwit A, Béné MC, Duetz C, Matarraz S, Oelschlaegel U, Westers TM, Wagner-Ballon O, Kordasti S, Valent P, Preijers F, Alhan C, Bellos F, Bettelheim P, Burbury K, Chapuis N, Cremers E, Della Porta MG, Dunlop A, Eidenschink-Brodersen L, Font P, Fontenay M, Hobo W, Ireland R, Johansson U, Loken MR, Ogata K, Orfao A, Psarra K, Saft L, Subira D, Te Marvelde J, Wells DA, van der Velden VHJ, Kern W, van de Loosdrecht AA. Multiparameter flow cytometry in the evaluation of myelodysplasia: Analytical issues: Recommendations from the European LeukemiaNet/International Myelodysplastic Syndrome Flow Cytometry Working Group. Cytometry B Clin Cytom. 2023 Jan;104(1):27-50. doi: 10.1002/cyto.b.22108. Epub 2022 Dec 20. PMID: 36537621; PMCID: PMC10107708.
21. Rashidi HH, Xu X, Wang HY, Shafi NQ, Rameshkumar K, Messer K, Smith BR, Rose MG. Utility of peripheral blood flow cytometry in differentiating low grade versus high grade myelodysplastic syndromes (MDS) and in the evaluation of cytopenias. Int J Clin Exp Pathol. 2012;5(3):224-30. Epub 2012 Mar 25. PMID: 22558477; PMCID: PMC3341683.
22. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023

update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2023 Mar;98(3):502-526. doi: 10.1002/ajh.26822. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36594187.
23. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, Venzon D, Rick ME. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. Blood. 2001 Aug 15;98(4):979-87. doi: 10.1182/blood.v98.4.979. PMID: 11493442.
24. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécrevisse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. 2012 Sep;26(9):1908-75. doi: 10.1038/leu.2012.120. Epub 2012 May 3. PMID: 22552007; PMCID: PMC3437410.
25. Verigou E, Chatzilygeroudi T, Lazaris V, de Lastic AL, Symeonidis A. Immunophenotyping myelodysplastic neoplasms: the role of flow cytometry in the molecular classification era. Front Oncol. 2024 Oct 31;14:1447001. doi: 10.3389/fonc.2024.1447001. PMID: 39544295; PMCID: PMC11560873.
26. Wagner-Ballon O, Bettelheim P, Lauf J, Bellos F, Della Porta M, Travaglino E, Subira D, Lopez IN, Tarfi S, Westers TM, Johansson U, Psarra K, Karathanos S, Matarraz S, Colado E, Gupta M, Ireland R, Kern W, Van De Loosdrecht AA; European LeukemiaNet International MDS-Flow Cytometry Working Group (ELN iMDS-Flow). ELN iMDS flow working group validation of the monocyte assay for chronic myelomonocytic leukemia diagnosis by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2023 Jan;104(1):66-76. doi: 10.1002/cyto.b.22054. Epub 2021 Dec 30. PMID: 34967500.
27. Westers TM, Cremers EM, Oelschlaegel U, Johansson U, Bettelheim P, Matarraz S, Orfao A, Moshaver B, Brodersen LE, Loken MR, Wells DA, Subirá D, Cullen M, Te Marvelde JG, van der Velden VH, Preijers FW, Chu SC, Feuillard J, Guérin E, Psarra K, Porwit A, Saft L, Ireland R, Milne T, Béné MC, Witte BI, Della Porta MG, Kern W, van de Loosdrecht AA; IMDSFlow Working Group. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. Haematologica. 2017 Feb;102(2):308-319. doi: 10.3324/haematol.2016.147835. Epub 2016 Oct 6. PMID: 27758818; PMCID: PMC5286938.

Citometristi Esperti

Elenco dei Citometristi Esperti con struttura di Albo scientifico-professionale

Dal 2013 il GIC ha intrapreso un percorso per il riconoscimento della figura professionale di “Citometrista Esperto” istituendo uno specifico Elenco, con struttura di Albo scientifico-professionale.
La qualifica di “Citometrista Esperto” può essere ottenuta con due diversi profili : Citometrista Esperto “**Livello Base**” e Citometrista Esperto “**Livello Avanzato**”, entrambi i profili vengono ulteriormente articolati in specifiche aree applicative della Citometria: Ematologia, Immunologia, Ricerca e Ambiente/Microbiologia.
L’accesso a ciascun livello avviene mediante la valutazione oggettiva del profilo accademico e professionale del candidato ed il superamento delle prove di esame (uno scritto ed uno orale).
La qualifica di Citometrista Esperto e la conseguente iscrizione all’”Albo” vuole avere il significato di “riconoscimento” delle effettive capacita e conoscenze professionali e non quello di un ulteriore titolo accademico. Intende essere uno strumento da “spendere” nel campo professionale ed allo stesso tempo uno strumento effettivo di formazione ed aggiornamento delle proprie tematiche professionali.

SESSIONE DI AMMISSIONE 2025
http://www.citometriagic.it

News in Bibliografia
Peer Review Journal

Artificial Intelligence in Flow Cytometry

Recommendations for using artificial intelligence in clinical flow cytometry.
Ng DP, Simonson PD, Tarnok A, Lucas F, Kern W, Rolf N, Bogdanoski G, Green C, et al.
Cytometry B Clin Cytom. 2024 Jul;106(4):228-238. doi: 10.1002/cyto.b.22166. Review.

Applications of Artificial Intelligence in Acute Promyelocytic Leukemia: An Avenue of Opportunities? A Systematic Review
Găman MA, Dugăeşescu M, Popescu DC.
J Clin Med. 2025 Mar 1;14(5):1670. doi: 10.3390/jcm14051670.PMID: 40095699 Free PMC article. Review.

Artificial intelligence in clinical multiparameter flow cytometry and mass cytometry-key tools and progress.
Fuda F, Chen M, Chen W, Cox A.
Semin Diagn Pathol.. doi: 10.1053/j.semdp.2023.02.004. Epub 2023 Mar 5.PMID: 36894355 Review.

Artificial intelligence in imaging flow cytometry.
Pozzi P, Candeo A, Paiè P, Bragheri F, Bassi A.
Front Bioinform. 2023 Oct 9;3:1229052. doi: 10.3389/fbinf.2023.1229052. Free PMC article.

Artificial Intelligence for Clinical Flow Cytometry.
Seifert RP, Gorlin DA, Borkowski AA.
Clin Lab Med. 2023 Sep;43(3):485-505. doi: 10.1016/j.cll.2023.04.009. Review.

Artificial Intelligence Enhances Diagnostic Flow Cytometry Workflow in the Detection of Minimal Residual Disease of Chronic Lymphocytic Leukemia.
Salama ME, Otteson GE, et al.
Cancers (Basel). 2022 May 21;14(10):2537. doi: 10.3390/cancers14102537. **Free PMC article.**

Artificial intelligence to empower diagnosis of myelodysplastic syndromes by multiparametric flow cytometry.
Clichet V, Lebon D, Boyer T. et al.
Haematologica. 2023 Sep 1;108(9):2435-2443. doi: 10.3324/haematol.2022.282370. Free PMC article.

From gating to computational flow cytometry: Exploiting artificial intelligence for MRD diagnostics.
Riva G, Luppi M, Tagliafico E.
Br J Haematol. 2023 Aug;202(4):715-717. doi: 10.1111/bjh.18833. Epub 2023 Apr 24.PMID: 37092558

Validation of Artificial Intelligence (AI)-Assisted Flow Cytometry Analysis for Immunological Disorders.
Lu Z, Morita M, Yeager TS, Lyu Y, Wang SY, Wang Z, Fan G.
Diagnostics (Basel). doi: 10.3390/diagnostics14040420.PMID: 38396459 **Free PMC article.**

Computational flow cytometry provides accurate assessment of measurable residual disease in chronic lymphocytic leukaemia.
Nguyen PC, Nguyen V, Baldwin K, Kankanige Y, Blombery P, Came N, Westerman DA.
Br J Haematol. 2023 Aug;202(4):760-770. doi: 10.1111/bjh.18802

Supervised machine learning in microfluidic impedance flow cytometry for improved particle size determination.
de Bruijn DS, Ten Eikelder HRA, Papadimitriou VA, Olthuis W, van den Berg A.
Cytometry A. 2023 Mar;103(3):221-226. doi: 10.1002/cyto.a.24679. Free article.

Artificial intelligence for predictive biomarker discovery in immuno-oncology: a systematic review
Prelaj A, et al.
Ann Oncol. 2024 Jan;35(1):29-65. doi: 10.1016/j.annonc.2023.10.125. Free article. Review.

Spectral Flow Cytometry

Spectral flow cytometry: Fundamentals and future impact.
Paul Robinson J, Rajwa B.
Methods Cell Biol. 2024;186:311-332. doi: 10.1016/bs.mcb.2024.02.022. Epub 2024 Apr 4. Review.

Standardized high-dimensional spectral cytometry protocol and panels for whole blood immune phenotyping in clinical and translational studies.
Dott T, Culina S, Chemali R, Mansour CA, Dubois F, Jagla B, Doisne JM, Rogge L, ET AL.
Cytometry A. 2024 Feb;105(2):124-138. doi: 10.1002/cyto.a.24801. Epub 2023 Oct 12. Free article.

Spectral Flow Cytometry Methods and Pipelines for Comprehensive Immunoprofiling of Human Peripheral Blood and Bone Marrow.
Spasic M, Ogayo ER, Parsons AM, Mittendorf EA, van Galen P, McAllister SS.
Cancer Res Commun. 2024 Mar 25;4(3):895-910. doi: 10.1158/2767-9764.CRC-23-0357.Free PMC article.

Methods and Recommendations

Production and use of antigen tetramers to study antigen-specific B cells.
Phelps A, Pazos-Castro D, Urselli F, Grydziuszko E, Mann-Delany O, Fang A, ET AL.
Nat Protoc. 2024 Mar;19(3):727-751. doi: 10.1038/s41596-023-00930-8. Review

Methods for Isolation of Tumor-Associated Endothelial Cells for Surface Protein Analysis and Sorting by Flowcytometry.
Verhoeven J, Agostinis P, Agrawal M.
Methods Mol Biol. 2023;2572:45-54. doi: 10.1007/978-1-0716-2703-7_3.PMID: 36161406

Multiparameter flow cytometry in the evaluation of myelodysplasia: Analytical issues: Recommendations from the European LeukemiaNet/International Myelodysplastic Syndrome Flow Cytometry Working Group.
Porwit A, Béné MC, Duetz C, Matarraz S, Oelschlaegel U, Orfao A, Psarra K, et al.
Cytometry B Clin Cytom. 2023 Jan;104(1):27-50. doi: 10.1002/cyto.b.22108. Free PMC article. Review.

Analysis of extracellular vesicle DNA at the single-vesicle level by nano-flowcytometry.
Liu H, Tian Y, Xue C, Niu Q, Chen C, Yan X.
J Extracell Vesicles. 2022 Apr;11(4):e12206. doi: 10.1002/jev2.12206. Free PMC article.

Flow Cytometry Instrument Setting as a Crucial Checkpoint for Optimal T-Cell Analysis and Sorting.
Anselmo A, Colombo FS.
Methods Mol Biol. 2021;2325:1-27. doi: 10.1007/978-1-0716-1507-2_1.

Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance.
Spurgeon BEJ, Naseem KM.
Cytometry B Clin Cytom. 2020 Jan;98(1):19-27. doi: 10.1002/cyto.b.21774. Free article. Review.

Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia: Old and New Concepts.
Chea M, Rigolot L, Canali A, Vergez F.
Int J Mol Sci. 2024 Feb 10;25(4):2150. doi: 10.3390/ijms25042150. Free PMC article. Review.

OMIP-101: 27-color flow cytometry panel for immunophenotyping of major leukocyte populations in fixed whole blood.
Imbratta C, Reid TD, Toefy A, Scriba TJ, Nemes E.
Cytometry A. 2024 Mar;105(3):165-170. doi: 10.1002/cyto.a.24827. **Free PMC article.**

Per rimanere sempre aggiornato sulle iniziative del GIC seguici sui nostri canali social

Il GIC promuove un nuovo supporto didattico e di aggiornamento "Quaderni GIC". Analogamente allo storico Manuale, i "Quaderni" rappresentano anche un valido strumento di studio ed approfondimento; nella realizzazione di questa iniziativa è stato dato molto risalto sin dall'inizio alle "conoscenze di base" che un Citometrista Esperto deve conoscere. Questo bagaglio di conoscenze non è inteso semplicemente come valore culturale, ma è prima di tutto una condizione indispensabile, che porta il Citometrista dal semplice livello di operatore esecutivo a quello di protagonista. Egli è infatti responsabile dell'intero ciclo analitico di un campione e deve saper valutare criticamente il risultato del proprio lavoro. Il Quaderno "I fondamenti della Citometria" è dedicato ai concetti di base delle tecniche citometriche e fra questi, particolare rilievo è stato dato ai concetti di interazione fra luce e materia e quindi ai fenomeni di "scattering" e di fluorescenza che stanno veramente alla base di ogni analisi citometrica. L'obiettivo del GIC è infatti anche quello di curare scrupolosamente la formazione delle nuove generazioni di Citometristi a garanzia della qualità dei risultati, con particolare riferimento alle applicazioni citometriche in ambito clinico. I Quaderni sono disponibili per i Soci GIC e per i Partecipanti alla Conferenza e ai Corsi GIC e possono essere richiesti anche contestualmente all'iscrizione:http://www.citometriagic.it// e http://www.conferenzadicitometriagic.it//

Società Italiana di Citometria

Società Italiana di Citometria

PREMIO DI STUDIO
"Luigi Del Vecchio"
La Citometria nelle tesi sperimentali
39ª Edizione 2025

La Società Italiana di Citometria, allo scopo di promuovere la ricerca nel campo della Citometria, indice un concorso per l'assegnazione di **Premi** di Studio a:

- 2 **Tesi di Laurea sperimentale** su argomenti di rilevanza applicativa e di base della Citometria;
- 1 **Tesi di Specializzazione o di Dottorato** su argomenti di rilevanza applicativa e di base della Citometria.

I premi consistono in una borsa di partecipazione alla **43ª Conferenza Nazionale di Citometria** "Aggiornamenti e innovazioni della Citometria nelle applicazioni cliniche e di ricerca: analisi, gestione dei dati e loro interpretazione", **26-29 maggio 2025** in Web Live Streaming, **11-13 giugno 2025** Residenziale, presso la Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano, e ricevere i "Quaderni di Citometria".

I Vincitori saranno ospiti del GIC, dove presenteranno una sintesi del loro Lavoro nella forma di poster e invitati a presentare un articolo per la Rivista Lettere GIC.

Modalità di partecipazione

La domanda dovrà pervenire entro il **15 aprile 2025** alla Segreteria della Società Italiana di Citometria, all'indirizzo e-mail: gic@enea.it, specificando: nome, cognome, indirizzo, recapiti telefonici ed e-mail personali e del laboratorio, e l'impegno a citare il Premio, nell'Articolo che sarà pubblicato.

Alla domanda dovrà essere allegata:

- Un file con la Tesi in originale, **discussa tra il 1 gennaio 2024 e il 15 aprile 2025** e firmata dal Candidato e dal Relatore, completa in tutte le sue parti, in un unico file, in formato pdf, ed un certificato di laurea in carta semplice o copia conforme all'originale, in formato pdf.

Il Segretario
Raffaele De Vita

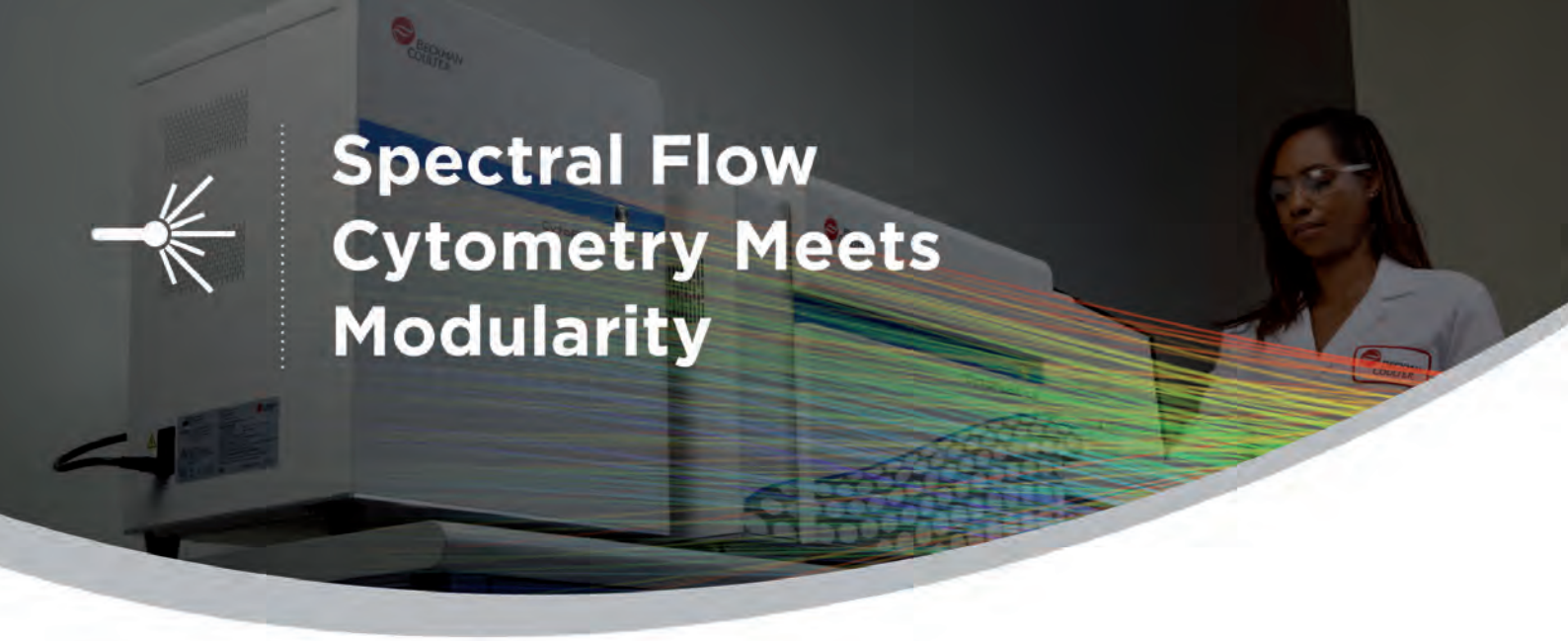
Il Presidente
Rosa Chianese

Per informazioni:
Società Italiana di Citometria
associazione scientifica senza fini di lucro
iscritta nell'Elenco delle Società Medico Scientifiche del Ministero della Salute
c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute - ENEA Centro Ricerche Casaccia
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma - tel: 06 30484671
e-mail: gic@enea.it - http://www.citometriagic.it

Con il patrocinio di:

ENEA

Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile



Spectral Flow Cytometry Meets Modularity

Pair Your CytoFLEX LX/S* Flow Cytometer with the CytoFLEX mosaic Spectral Detection Module to Enable Your Spectral Flow Cytometry Capabilities

The CytoFLEX mosaic Detection Module is the natural evolution of our CytoFLEX Platform. A smart approach to spectral, it connects to your CytoFLEX LX/ S Flow Cytometer, giving you the flexibility to mix and match different detection methods in one instrument.

The Best CytoFLEX You Can Get

CytoFLEX mosaic 88 Detection Module for CytoFLEX LX Flow Cytometer

(88 channels of detection:
1 FSC, 6 SSC, 81 fluorescent)

CytoFLEX mosaic 63 Detection Module for 4-laser CytoFLEX S Flow Cytometer

(63 channels of detection:
1 FSC, 4 SSC, 58 fluorescent)

A flexible approach to spectral flow cytometry

Data you can trust

Makes the complex easy

BECKMAN COULTER
Life Sciences

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
*Only valid for CytoFLEX S (V-B-Y-R) Series Flow Cytometer.

© 2025 Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

For Beckman Coulter's worldwide office locations and phone numbers, please visit Contact Us at beckman.com

2025-GBL-EN-107398-v1

danaher