

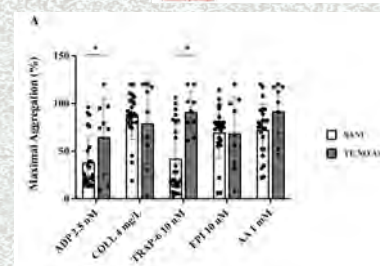
Vol. 34, Num. 3, 2025

LETTERE GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

Identificare l'inatteso: uso dell'analisi citometrica non supervisionata per identificare profili immunologici protettivi

Il ruolo della Citometria a flusso nella identificazione del Fenotipo piastrinico nella Trombocitemia essenziale



44a CONFERENZA DI CITOMETRIA

SCUOLA DI CITOMETRIA

CORSI TEORICO-PRATICI DI FORMAZIONE E AGGIORNAMENTO

LA CITOMETRIA: ANALISI GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

7 maggio-4 giugno 2026 in Web Live Streaming

10-12 giugno 2026 Residenziale

Biotechnologie - Università degli Studi di Napoli - Federico II

PROGRAMMA SCIENTIFICO



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI GIC

I FONDAMENTI DELLA CITOMETRIA

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

LE CELLULE NATURAL KILLER: BIOLOGIA, PATOLOGIA E RILEVANZA DELLA CITOMETRIA

GIOVANNI D'ARENA
LORIS ZAMAI
RENATO ZAMBELLO

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

LA CITOMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

VALUTAZIONE CITOFLUORIMETRICA DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA

Antonella Aiello
Giovanni D'Arena
Giovanna Maisto
Paola Omedè
Livio Ottaviano
Giulia Scalia

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini

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. 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/>

PREMIO DI STUDIO "Luigi Del Vecchio"

La Citometria nelle tesi sperimentali

40^a Edizione 2026

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 **44^a Conferenza e Scuola di Citometria** "La Citometria: analisi, gestione dei dati e loro interpretazione", **7 maggio - 4 giugno 2026** in Web Live Streaming, **10-12 giugno 2026** Residenziale, presso Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II.

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 di Citometria Peer Review "Lettere GIC".

Modalità di partecipazione

La domanda dovrà pervenire entro il **15 aprile 2026** alla Segreteria della Società Italiana di Citometria, all'indirizzo e-mail: gic@citometriagic.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 fra il 1 gennaio 2025 e il 15 aprile 2026** 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

o/o Divisione Biotecnologie - ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016

Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma - tel: 06 30484671

e-mail: gic@citometriagic.it - <http://www.citometriagic.it>

Con il patrocinio di:



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



SOCIETÀ ITALIANA CHIMICI
Life Sciences

**IMMUNOLOGICAL
SCIENCES**



Flow Cytometry Anti-Mouse Antibodies

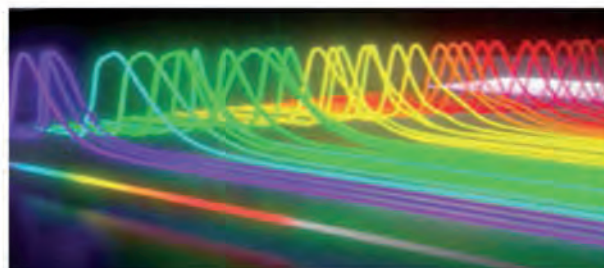
Catalogue 2026

www.immunologicalsciences.com

**IMMUNOLOGICAL
SCIENCES**



Flow Cytometry Anti-Human Antibodies



Catalogue 2026

www.immunologicalsciences.com

**IMMUNOLOGICAL
SCIENCES**



FLOW CYTOMETRY ANTIBODIES

ANTI-HUMAN FLOW CYTOMETRY ANTIBODIES

A brighter solution in
Flow Cytometry.



BROWSE THE HUMAN
LIST IN THE QR CODE

ANTI-MOUSE FLOW CYTOMETRY ANTIBODIES

Find the best combinations of
antibodies and conjugation
ideal for phenotyping.



BROWSE THE MOUSE
LIST IN THE QR CODE

SELECT YOUR FREE SAMPLE!

Send your samples request to info@immunologicalsciences.com

SIC SOCIETÀ ITALIANA CHIMICI
Life Sciences

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

exbio
A Brighter Future in Flow



FLOW CYTOMETRY ANTI-HUMAN CD ANTIGENS

CATALOGUE 2026

www.sichim.com



SOCIETÀ ITALIANA CHIMICI
Life Sciences

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

LETTERE GIC

Vol. 34, Num. 3, 2025

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. 34, num. 3 - 2025

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:



c/o Divisione Biotecnologie
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671
e-mail: gic@citometriagic.it
http://www.citometriagic.it



SOMMARIO

Programma scientifico

44^a Conferenza e Scuola di Citometria

Corsi teorico-pratici di formazione e aggiornamento

"La Citometria: Analisi Gestione dei dati
e loro interpretazione"

7 maggio-4 giugno 2026 in Web Live Streaming,

10-12 giugno 2026 Residenziale,

presso Biotecnologie

Università degli Studi di Napoli Federico II

6

Identificare l'inatteso: uso dell'analisi citometrica
non supervisionata per identificare profili
immunologici protettivi

20

Veronica Bordoni and Chiara Agrati

Invito alla lettura

23

a cura di **Rachele Amodeo**

Il ruolo della Citometria a flusso nella
identificazione del Fenotipo piastrinico nella
Trombocitemia essenziale

24

**Vittorio Emanuele Muccio, Cristina Barale, Marisa Pautasso,
Alessandro Morotti, Isabella Russo**

Elenco dei Citometristi Esperti
con struttura di Albo scientifico-professionale
Sessione di Ammissione 2026

30

News in Bibliografia

31



44^a CONFERENZA DI CITOMETRIA SCUOLA DI CITOMETRIA CORSI TEORICO-PRATICI DI FORMAZIONE E AGGIORNAMENTO LA CITOMETRIA: ANALISI GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

7 maggio - 4 giugno 2026 Web Live Streaming

10-12 giugno 2026 Residenziale

Auditorium Biotechnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II

Direttore della Scuola
Giuliano Mazzini (*Pavia*)

Comitato Scientifico e Organizzatore
Rosa Chianese (*Varese*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Stefania Loffredo (*Napoli*)
Giulia Scalia (*Napoli*)

PROGRAMMA SCIENTIFICO

Corso CB

CORSO BASE DI CITOMETRIA: DAI FONDAMENTI ALL'ANALISI DEI CAMPIONI

Coordinatori: Nicolò Panini (Milano), Claudio Pioli (Roma)

Giovedì 7 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Apertura: Citometria Multidisciplinare

Lettura di Apertura della Conferenza e Scuola

Presentazione Corsi della Scuola di Citometria: Riunione di tutti i Partecipanti con il Comitato Scientifico e Organizzatore e i Coordinatori dei Corsi, informazioni organizzative e chiarimenti

Lunedì 11 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 1: Principi di Base, Strumentazione e Reagenti

Introduzione

Claudio Pioli (*Roma*)

Il Citometro a Flusso: componenti fluidica, ottica, elettronica e loro evoluzione

Nicolò Panini (*Milano*)

Pausa caffè con ... Azienda

La rivoluzione dello spettro: dai dyes classici ai fluorocromi più avanzati

Achille Anselmo (Milano)

Discussione e conclusioni

Martedì 19 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Lunedì 25 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 2: Dalla preparazione del campione all'analisi dei dati

Chi ben comincia è a metà dell'opera: la preparazione del campione

Simona Di Terlizzi (Milano)

Basi di Analisi dei Dati in Citometria a Flusso

Claudia Nastasi (Milano)

Pausa caffè con ... Azienda

Sessione 3: Esempi e problematiche specifiche in diversi campi applicativi

Applicazioni citometriche per l'analisi di matrici ambientali complesse

Stefano Amalfitano (Roma)

Discussione e conclusioni

Giovedì 4 giugno 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Residenziale

Auditorium Biotecnologie

Università degli Studi di Napoli Federico II

Mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

14:00 Registrazione

14:30 **Apertura**

Comitato Scientifico e Organizzatore

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale di Apertura

Immunità innata, infiammazione e cancro

Alberto Mantovani (Milano)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00, 14:00-17:00

Sessione 3: Esempi e problematiche specifiche in diversi Campi Applicativi

La citometria a flusso come strumento analitico per l'enologia e l'agroalimentare

Federico Sizzano (Losanna, CH)

La mia prima analisi multiparametrica: controlli, controlli, controlli

Claudio Pioli (Roma)

Pausa caffè

Pannelli complessi in Citometria convenzionale: progettazione e problematiche

Gabriele Favaretto (Roma)

Pannelli complessi in Citometria spettrale: progettazione e problematiche

Claudia D'Oria (Milano)

Pausa pranzo

Sessione 3: Esempi e problematiche specifiche in diversi Campi Applicativi

Non solo analisi, il cell sorting e quello che gli utenti devono sapere

Nicolò Panini (Milano)

Pausa caffè

Sessione 4: Didattica interattiva ed esercitazioni con Giovani Citometristi

Esempi di analisi citometriche, con file proposti dagli Allievi, di particolare significato interpretativo e di rilevanza analitica in diversi campi applicativi

Coordinatori e Docenti

Discussione e conclusioni

Assemblea GIC Aperta a tutti

Sapere i Saperi a km 0 “degustazioni campane”

Venerdì 12 giugno 08:30-12:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale Conclusiva

Conclusioni

Light Lunch di saluto

**LA CITOMETRIA IN EMATOLOGIA
NUOVE SFIDE DELLA CITOMETRIA CLINICA IN AMBITO EMATOLOGICO
NELL'ERA DELLE TERAPIE AVANZATE**

Coordinatori: Giuseppe Coppola (Salerno), Giulia Scalia (Napoli)

Giovedì 7 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Apertura: Citometria Multidisciplinare

Lettura di Apertura della Conferenza e Scuola

Presentazione Corsi della Scuola di Citometria: Riunione di tutti i Partecipanti con il Comitato Scientifico e Organizzatore e i Coordinatori dei Corsi, informazioni organizzative e chiarimenti

Martedì 12 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 1: Rilevanza della Citometria a flusso quantitativa in ambito ematologico clinico

Il conteggio di elementi rari in Citometria a flusso: il conteggio delle cellule CD34+ alla luce degli attuali programmi di mobilitazione

Giuseppe Coppola (Salerno), Salvatore Giovanni Castaldi (Salerno)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Pausa caffè con ... Azienda

Impatto del conteggio delle cellule CD34+ sulla pianificazione delle raccolte aferetiche

Silvestro Volpe (Avellino)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione e conclusioni

Martedì 19 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Martedì 26 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 2: Stato dell'arte ed evoluzione della Citometria a flusso nelle malattie linfoproliferative croniche

Punti di forza e limiti della Citometria a flusso nella diagnostica differenziale delle malattie linfoproliferative croniche

Antonella Aiello (Milano) Martina Toma (Milano)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Pausa caffè con ... Azienda

Rilevanza della diagnostica integrata nella diagnosi delle malattie linfoproliferative croniche

Silvia Bellesi (Roma)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione e conclusioni

Giovedì 4 giugno 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Residenziale
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II

Mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

14:00 Registrazione

14:30 **Apertura**
Comitato Scientifico e Organizzatore

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale di Apertura

Immunità innata, infiammazione e cancro

Alberto Mantovani (Milano)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00, 14:00-17:00

Sessione 3: Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle terapie avanzate

Evoluzione della Citometria a flusso, dalla diagnosi alla terapia, con l'avvento delle terapie avanzate mediante trapianto di cellule CAR

Giuseppe Gaipa (Monza)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Pausa caffè

Prospettive del monitoraggio citometrico nell'ambito delle terapie avanzate mediante cellule CAR-T "commerciali"

Cristiana Carniti (Milano)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione

Pausa pranzo

Sessione 4: Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle Leucemie Acute Mieloidi

Stato dell'arte nella diagnostica e monitoraggio citometrico delle Leucemie Acute Mieloidi

Marisa Gorrese (Salerno), Vincenza Cerbone (Napoli)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Pausa caffè

Evoluzione della citometria a flusso nel monitoraggio delle malattie oncoematologiche in trattamento con anticorpi monoclonali

Giovanni Rossi (San Giovanni Rotondo) Grazia Dell'Olio (San Giovanni Rotondo)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione e conclusioni

Assemblea GIC Aperta a tutti

Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"

Venerdì 12 giugno 08:30-12:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale Conclusiva

Conclusioni

Light Lunch di saluto

CITOMETRIA E IMMUNITÀ: DALLA FENOTIPIZZAZIONE AGLI STUDI FUNZIONALI

Coordinatori: Chiara Agrati (Roma), Alessandra Battaglia (Roma), Daniela Fenoglio (Genova)

Giovedì 7 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Apertura: Citometria Multidisciplinare

Lettura di Apertura della Conferenza e Scuola

Presentazione Corsi della Scuola di Citometria: Riunione di tutti i Partecipanti con il Comitato Scientifico e Organizzatore e i Coordinatori dei Corsi, informazioni organizzative e chiarimenti

Mercoledì 13 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 1: Caratterizzazione citometrica delle cellule regolatorie e soppressorie

Apertura del Corso e benvenuto ai Partecipanti

Chiara Agrati (Roma), Alessandra Battaglia (Roma), Daniela Fenoglio (Genova)

Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule T regolatorie

Fortunata Carbone (Napoli)

Transizione dalla funzione effettrice a quella regolatoria delle cellule CD8+: ruolo della citometria policromatica

Daniela Fenoglio (Genova)

Pausa caffè con ... Azienda

La citofluorimetria nello studio delle cellule soppressorie di derivazione mieloide: oltre l'immunosoppressione

Alessandra Sacchi (Roma)

Uso della Citometria per lo studio dell'attività regolatoria delle cellule linfoidi innate

Giuseppe Pietropaolo (Roma)

Discussione e conclusioni

Martedì 19 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Mercoledì 27 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 2: "Exhaustion" e senescenza delle cellule linfoidi e mieloidi

Benvenuto ai Partecipanti

Analisi citofluorimetriche ad alta dimensionalità (high-dimensional flow cytometry) nel monitoraggio della T-cell exhaustion in pazienti affetti da neoplasie ematologiche recidivanti dopo terapia cellulare e genica

Maddalena Noviello (Milano)

Analisi dei Checkpoint Inibitori nelle Cellule NK: Approcci Citofluorimetrici in Contesti Normali e Patologici

Emanuela Marcenaro (Genova)

Pausa caffè con ... Azienda

Uso della Citometria per la caratterizzazione di programmi differenziali di memoria delle cellule T contro il vaiolo e SARS-CoV-2 nei centenari

Sara De Biasi (Modena)

Immunità innata. I neutrofili: Indicazioni per il loro immunomonitoraggio mediante citofluorimetria in condizioni fisiologiche e patologiche

Patrizia Scapini (Verona)

Discussione e conclusioni

Giovedì 4 giugno 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Residenziale
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II

Mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

14:00 Registrazione

14:30 **Apertura**

Comitato Scientifico e Organizzatore

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale di Apertura

Immunità innata, infiammazione e cancro

Alberto Mantovani (Milano)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00, 14:00-17:00

Sessione 3: Immunoterapia dei tumori: ruolo del monitoraggio citometrico nella medicina di precisione

Benvenuto ai Partecipanti

Chiara Agrati (Roma), Alessandra Battaglia (Roma), Daniela Fenoglio (Genova)

Il sistema immunitario come farmaco vivente contro il cancro: l'ingegnerizzazione delle cellule immunitarie per il targeting di precisione delle cellule tumorali

Cristina Maccalli (Genova)

I linfociti NK nel cancro del colon-retto: caratterizzarli fenotipicamente per disegnare nuove immunoterapie

Mariella Della Chiesa (Genova)

Pausa caffè

Riconoscimento citometrico delle cellule mieloidi soppressorie di origine granulocitaria: fenotipo, funzione e criticità

Alessandra Battaglia (Roma)

Introduzione al panorama mieloidi mediante la Citometria a flusso spettrale e approcci di analisi unbiased

Achille Anselmo & Francesca Clemente (Milano)

Discussione

Pausa pranzo

Sessione 4: La Citometria a flusso nel monitoraggio delle patologie infettive e autoimmuni

Dalla soppressione cellulo-mediata alle cellule T regolatorie: una prospettiva storica

Giuseppe Matarese (Napoli)

Analisi dell'attività antivirale dei linfociti T gamma delta: ruolo della citofluorimetria

Chiara Agrati (Roma)

Pausa caffè

Analisi citofluorimetrica delle cellule B in contesti di vaccinazione, infezione e malattia

Eva Piano-Mortari (Roma)

Analisi citofluorimetrica multiparametrica per l'identificazione e la caratterizzazione di linfociti T specifici ad antigeni virali

Laura Maggi (Firenze)

Discussione e conclusioni

Assemblea GIC Aperta a tutti

Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"

Venerdì 12 giugno 08:30-12:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale Conclusiva

Conclusioni

Light Lunch di saluto

**LA CITOMETRIA IN ONCOLOGIA
CITOMETRIA FUNZIONALE COME STRUMENTO INTEGRATO
PER APPLICAZIONI TERAPEUTICHE**

Coordinatori: Igea D'Agnano (Milano), Virginia Tirino (Napoli)

Giovedì 7 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Apertura: Citometria Multidisciplinare

Lettura di Apertura della Conferenza e Scuola

Presentazione Corsi della Scuola di Citometria: Riunione di tutti i Partecipanti con il Comitato Scientifico e Organizzatore e i Coordinatori dei Corsi, informazioni organizzative e chiarimenti

Giovedì 14 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 1: Proliferazione e morte cellulare: lo yin e lo yang del ciclo vitale della cellula

Introduzione

Igea D'Agnano (Milano), Virginia Tirino (Napoli)

Il ciclo cellulare come bersaglio nelle terapie oncologiche: il contributo della citometria a flusso

Igea D'Agnano (Milano)

Pausa caffè con ... Azienda

Quando e come muore una cellula: la citometria funzionale nello studio della morte cellulare

Virginia Tirino (Napoli)

Discussione e conclusioni

Martedì 19 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Giovedì 28 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 2: Citometria avanzata: strategie di sorting nello studio dell'eterogeneità dei tumori

Introduzione

Igea D'Agnano (Milano), Virginia Tirino (Napoli)

Il Cell Sorting nella Ricerca Oncologica: Preparazione del campione, approcci tecnici e innovazione tecnologica per l'identificazione accurata delle popolazioni target

Nicolò Panini (Milano)

Pausa caffè con ... Azienda

Cell sorting per lo studio delle cellule tumorali: applicazioni e nuove strategie label-free

Martina Mugnano (Napoli)

Discussione e conclusioni

Giovedì 4 giugno 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

**Residenziale
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II**

Mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

14:00 Registrazione

14:30 **Apertura**
Comitato Scientifico e Organizzatore

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale di Apertura

Immunità innata, infiammazione e cancro

Alberto Mantovani (Milano)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 , 14:00-17:00

Sessione 3: Approcci citometrici avanzati nello studio di organelli e nanoparticelle nel targeting terapeutico e nella terapia farmacologica

Esplorare i mitocondri con la Citometria: nuovi approcci e applicazioni

Vitale Del Vecchio (Roma)

Pausa caffè

Vescicole extracellulari: come la Citometria rende visibile l'invisibile

Paola Lanuti (Chieti)

Discussione

Pausa pranzo

Sessione 4: Il microambiente sotto la lente della Citometria: dall'analisi cellulare alla clinica

Analisi citometrica multiparametrica dell'assetto immunologico in pazienti con NSCLC avanzato: strategie di gating e marcatori predittivi di risposta all'immunoterapia

Rosa Camerlingo (Napoli)

Pausa caffè

Biomarcatori immunologici e citofluorimetria: una combinazione chiave per la profilazione del paziente oncologico

Ilaria Grazia Zizzari (Roma)

Discussione e conclusioni

Assemblea GIC Aperta a tutti

Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"

Venerdì 12 giugno 08:30-12:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale Conclusiva

Conclusioni

Light Lunch di saluto

CITOMETRIA AMBIENTALE
LA CITOMETRIA PER LE NUOVE SFIDE AMBIENTALI

Coordinatori: Stefano Amalfitano (Roma), Raffaella Casotti (Napoli)

Giovedì 7 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Apertura: Citometria Multidisciplinare

Lettura di Apertura della Conferenza e Scuola

Presentazione Corsi della Scuola di Citometria: Riunione di tutti i Partecipanti con il Comitato Scientifico e Organizzatore e i Coordinatori dei Corsi, informazioni organizzative e chiarimenti

Venerdì 15 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 1: Citometria e biodiversità

Introduzione

Applicazioni della citometria a flusso per lo studio ed il monitoraggio dell'ambiente marino.

Cecilia Balestra (Trieste)

Pausa caffè con ... Azienda

Imaging cytometry for environmental monitoring

Gerald Pfister (Roma)

Le nuove sfide della Citometria a flusso in campo ambientale

Stefano Amalfitano (Roma)

Discussione e Conclusioni

Martedì 19 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Venerdì 29 maggio 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione 2: Citometria e approcci biotecnologici

Introduzione

Citometria a flusso per la valutazione dell'effetto sinergico di molecole antimicrobiche su isolati di *Pseudomonas aeruginosa*

Stefania Arioli (Milano)

Pausa caffè con ... Azienda

Dalla Terra allo Spazio: applicazioni della Citometria a flusso nell'agricoltura spaziale

Carla Sandri (ENEA, Roma)

Future Flow in Biotechnology: Where Flow Cytometry Takes Us

David W. Galbraith (Arizona)

Discussione e Conclusioni

Giovedì 4 giugno 14:30-17:30 Web Live Streaming

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Residenziale
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II

Mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

14:00 Registrazione

14:30 **Apertura**
Comitato Scientifico e Organizzatore

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale di Apertura

Immunità innata, infiammazione e cancro

Alberto Mantovani (Milano)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00, 14:00-17:00

Sessione 3: Citometria ambientale dalla teoria alla pratica: Tecniche citometriche per il monitoraggio ambientale

Introduzione

Tecniche citometriche per il monitoraggio microbiologico: Procedure di laboratorio

Cecilia Balestra (Trieste), Stefano Amalfitano (Roma)

Pausa caffè

Tecniche citometriche per il monitoraggio microbiologico: Esempi applicativi

Stefano Amalfitano (Roma), Cecilia Balestra (Trieste)

Discussione e conclusioni

Pausa pranzo

Sessione 4: Citometria ambientale dalla teoria alla pratica: Tecniche citometriche in campo biotecnologico

Tecniche citometriche su matrici vegetali: Procedure di laboratorio

Anna Farina (Roma), Debora Giorgi (Roma)

Pausa caffè

Tecniche citometriche su matrici vegetali: Esempi applicativi

Anna Farina (Roma), Debora Giorgi (Roma)

Discussione e conclusioni

Assemblea GIC Aperta a tutti

Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"

Venerdì 12 giugno 08:30-12:30

Sessione Plenaria di Citometria Multidisciplinare

Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

Lettura Magistrale Conclusiva

Conclusioni

Light Lunch di saluto

CALENDARIO

Giovedì 7 maggio 14:30-17:00 (Web Live Streaming)
Sessione di Apertura Multidisciplinare di Citometria

Martedì 19 maggio 14:30-17:00 (Web Live Streaming)
Sessione Multidisciplinare di Citometria

Giovedì 4 giugno 14:30-17:00 (Web Live Streaming)
Sessione Multidisciplinare di Citometria

CB CORSO BASE:

lunedì 11 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

lunedì 25 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C1 CORSO EMATOLOGIA

martedì 12 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

martedì 26 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C2 CORSO IMMUNOLOGIA

mercoledì 13 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

mercoledì 27 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C3 CORSO ONCOLOGIA

giovedì 14 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

giovedì 28 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C4 CORSO CITOMETRIA AMBIENTALE

venerdì 15 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

venerdì 29 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

10-12 GIUGNO 2026 (RESIDENZIALE)

Auditorium Biotechnologie

Università degli Studi di Napoli Federico II

mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

Sessione Plenaria comune a tutti i Corsi

giovedì 11 giugno 08:30-13:00 - 14:00-17:00

Corsi in parallelo

venerdì 12 giugno 08:30-12:30

Sessione Plenaria comune a tutti i Corsi

PROGRAMMA SOCIALE PRELIMINARE

mercoledì 10 giugno

17:30 *Brindisi di Benvenuto*

giovedì 11 giugno

17:00 *Assemblea dei Soci*

18:00 *Degustazione "Sapere i Saperi ... a Km 0"*

venerdì 12 giugno

12:45 *Sorteggio Premi scheda valutazione evento*

13:00 *Lunch di saluto**

**è indispensabile la prenotazione alla Segreteria GIC con un messaggio e-mail entro il 16 marzo 2026*

QUOTE DI ISCRIZIONE PER OGNI CORSO

Dopo il 16 marzo 2026

Soci GIC* € 160,00 + IVA 22%
non Soci € 220,00 + IVA 22%
non strutt Soci GIC* € 90,00 + IVA 22%
non strutt non Soci € 150,00 + IVA 22%

Soci GIC* € 200,00 + IVA 22%
non Soci € 260,00 + IVA 22%
non strutt Soci GIC* € 140,00 + IVA 22%
non strutt non Soci € 190,00 + IVA 22%

*In regola con la quota associativa 2026

+ 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 d’iscrizione, una autocertificazione vistata dal Responsabile della Struttura.

La quota include:

- le colazioni di lavoro, le pause caffè;
- le attività previste dal programma sociale;
- il materiale didattico: pen-drive con copia delle slide delle Lezioni e file di aggiornamento e formazione;
- Crediti per Elenco Citometristi Esperti;
- Attestati di partecipazione.

INFORMAZIONI GENERALI

- I Corsi sono a numero chiuso e si svolgono in parallelo;
- Le Sessioni Web Live Streaming si svolgeranno in orari pomeridiani;
- I Partecipanti che si iscriveranno a un Corso entro il 16 marzo, possono chiedere di seguire gratuitamente, esclusivamente come “UDITORI” e senza ricevere Attestato, le Sessioni Web Live Streaming di un altro Corso;
- L’Attestato di partecipazione verrà inviato a coloro che seguiranno l’intero Corso.

È prevista l’annuale Assemblea dei Soci GIC, l’assegnazione dei Premi di Studio GIC e la presentazione di prodotti e di apparecchiature da parte delle principali Aziende del settore.

RISERVATO AI DIPENDENTI DELLE PUBBLICHE AMMINISTRAZIONI (OSPEDALE, UNIVERSITÀ, COMUNE, ASL ...)
Per poter ricevere fattura elettronica intestata ad un Ente Pubblico ed emessa con il metodo SPLIT PAYMENT (addebito dell’IVA in fattura alla P.A.) o in esenzione IVA ai sensi dell’art. 10 del DPR 633/72 come modificato dall’art. 14, comma 10 della legge 24 dicembre 1993 n. 537, dovranno essere inviate, unitamente alla scheda di iscrizione:

- richiesta specifica con i dati fiscali dell’Ente e dati del referente amministrativo della pratica (telefono ed e-mail);
- dichiarazione scritta (contenente tutti i dati fiscali dell’Ente), in cui si specifichi che il dipendente (indicare nome e cognome) per cui viene richiesta l’iscrizione è autorizzato a frequentare l’evento per aggiornamento professionale;
- codice IPA che identifica la Pubblica Amministrazione (codice alfanumerico composto da 6 caratteri);
- ogni altra eventuale informazione che l’Ente stesso ritenga necessaria ed opportuna per facilitare l’identificazione del pagamento del servizio come da norma della fatturazione elettronica.
- dichiarazione scritta (contenente tutti i dati fiscali dell’Ente), in cui si specifichi che il dipendente (indicare nome e cognome) per cui viene richiesta l’iscrizione è autorizzato a frequentare l’evento per aggiornamento professionale;
- codice IPA che identifica la Pubblica Amministrazione (codice alfanumerico composto da 6 caratteri);
- ogni altra eventuale informazione che l’Ente stesso ritenga necessaria ed opportuna per facilitare l’identificazione del pagamento del servizio come da norma della fatturazione elettronica.

SEDE DEI CORSI IN PRESENZA

Auditorium Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II
Via Tommaso De Amicis, 95, 80131 Napoli



COME RAGGIUNGERE LA SEDE:

L'Auditorium di Biotecnologie, sede della Conferenza, è situato nell'area dell'A.O.U. 'Federico II' con ingresso in Via Tommaso De Amicis.

Metro: Metropolitana di Napoli Linea 1- Fermata 'Policlinico' a 200 metri dall'Auditorium di Biotecnologie, sede della Conferenza.

Treno: Stazione Napoli Centrale – Piazza Garibaldi – arrivo treni Trenitalia <https://www.trenitalia.com/ed>, Italo <https://www.italotreno.it/> e poi proseguire in metropolitana Linea 1 "Policlinico".

Aereo: Aeroporto di Napoli Capodichino <https://www.aeroportodinapoli.it/> e poi prendere un taxi. L'area Taxi è situata di fronte agli Arrivi.

Sono in vigore tariffe predeterminate su percorsi prestabiliti, sia urbani che extraurbani (Centro città, Molo Beverello, Mergellina, Pompei, Caserta ecc), comprensive di ogni supplemento extra (da/per aeroporto, notturno, festivo, bagagli, animali, chiamata radio).

Navetta Alibus è la linea di collegamento speciale e veloce tra l'Aeroporto ed il centro della città di Napoli, in particolare Stazione Centrale e Porto (Molo Beverello). <https://www.aeroportodinapoli.it/collegamenti-con-napoli-centro>.

Auto: Chi proviene dall'A1, dalla A3, e dalla A14, può immettersi sul raccordo per la tangenziale di Napoli, uscendo allo svincolo n.7 'Zona Ospedaliera' Policlinico. Parcheggio a pagamento "Colli Aminei" a 500 m. dall'Auditorium di Biotecnologie. Un ampio parcheggio auto a pagamento si trova anche nei pressi della Metropolitana (fermata 'Policlinico') a 200 m. dall'Auditorium.. Nelle adiacenze in Via Pansini e in Via Tommaso De Amicis è possibile, altresì, parcheggiare sulle strisce blu.

Taxi: Lo stazionamento dei taxi è a 200 m. dall'Auditorium di Biotecnologie, e situato all'ingresso di Via Pansini dell'A.O.U. 'Federico II'.

PROGRAMMA, REGISTRAZIONE E ISCRIZIONE NEL SITO:

<http://www.conferenzadicitometriagic.it/>

ULTERIORI INFORMAZIONI NEI SITI:

<http://www.citometriagic.it/> e www.proeventifad.it/

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@citometriagic.it
<http://www.citometriagic.it>

Segreteria Organizzativa

ProEventi Srl

Viale Matteotti 36, 71016, San Severo
tel: 0882 242151
e-mail: citometriagic@proeventi.it



Identificare l'inatteso: uso dell'analisi citometrica non supervisionata per identificare profili immunologici protettivi

Veronica Bordoni and Chiara Agrati

Unit of Pathogen Specific Immunity, Department of Pediatric Hematology and Oncology
IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

e-mail: veronica.bordoni@opbg.net

Abstract

The main concept of analyzing cytometric data by unbiased methods is to use computational algorithms to identify cell populations based on their marker expression patterns, without relying on manual gating or predefined phenotypic knowledge. This approach aims to overcome the limitations of traditional gating and to identify unexpected new subsets.

In our studies, the sequential use of UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) for visualization and exploration of the identified populations, and FlowSOM (Flow Self-Organizing Map) for unbiased clustering has been the essential approach, allowing the depiction of immune profiles in different clinical settings such as pediatric patients given Haploidentical Stem Cell Transplantation (haplo-HSCT) and in splenectomized or asplenic patients.

With this approach, we investigated the antiviral protective profile of $\gamma\delta$ T cells in haplo-HSCT-pediatric patients after 30, 60 and 120 days post-HSCT. Clustering analysis identified a protective subset of V δ 2 T cells in patients who did not experience viral reactivation, which expresses CD16, NKG2D, and CD107a and produces high levels of IFN- γ . These cells can inhibit CMV replication, induce antigen-presenting cell maturation and improve $\alpha\beta$ virus-specific T cell response, opening a new application of V δ 2-targeting immunotherapy after HSCT, adding the antiviral to the antitumor potential.

Furthermore, we used a similar approach to analyze innate immune cells in splenectomized or born asplenic (both pediatric and adult) patients.

We identified a specific signature of innate immune cells characterized by altered phenotype and impaired functions, allowing to reveal a previously unrecognized role of the spleen in the homeostasis of innate NK and V δ 2 T cells.

In summary, the use of FlowSOM and UMAP provides a powerful and unbiased approach to analyze complex flow cytometry data, allowing the objective identification, visualization and characterization of cellular profiles, which could contribute to the understanding the complex balance between immune protection and/or pathogenesis.

Perché fare una analisi non supervisionata dei dati citometrici (unbiased analysis)

Negli ultimi anni quando si parla di citometria a flusso, spesso ci si trova a gestire dataset con un numero altissimo di parametri, che possono includere decine o addirittura centinaia di marker per ogni cellula, insieme a enormi quantità di dati per ciascun campione. L'adozione di

approcci differenti da quelli "manuali" per l'analisi dei dati citometrici è diventata dunque fondamentale per rispondere alla crescente necessità di analisi più approfondite e oggettive. Il gating manuale, infatti, si basa sulla conoscenza preesistente dei fenotipi cellulari e sull'esperienza dell'operatore che di fatto introduce la sua soggettività nel processo di analisi. Questo può portare a variazioni nel posizionamento dei gate tra diversi ricercatori o anche dallo stesso operatore in momenti diversi. Inoltre, il gating manuale può risultare inefficace nell'identificare popolazioni cellulari nuove o rare che non rientrano nelle categorie predefinite già note. In parallelo all'evoluzione della citometria a flusso, ci sono stati notevoli progressi nella bioinformatica e nella potenza di calcolo. Questo ha reso possibile lo sviluppo e l'applicazione di algoritmi computazionali avanzati per analizzare grandi dataset ad alta dimensionalità in tempi ragionevoli. Sono stati creati pacchetti software e librerie che semplificano l'implementazione di questi metodi. L'uso di approcci unbiased sta quindi contribuendo ad una maggiore standardizzazione e rigore scientifico nell'analisi dei dati di citometria a flusso (Aghaeepour et al., 2013) di quasi tutte le pipeline di analisi.

Riduzione della dimensionalità

Il flusso di un'analisi imparziale si basa principalmente sulla riduzione della dimensionalità, cioè nella trasformazione di un set di dati complesso (ad esempio, migliaia di cellule misurate con 50 marcatori diversi, quindi 50 dimensioni) in una rappresentazione più gestibile (solitamente 2 o 3 dimensioni).

In questa sezione presentiamo i punti chiave del flusso di una analisi unbiased dei dati citometrici. Prima di procedere con la riduzione della dimensionalità, è necessario **pulire e normalizzare i dati**. Questi passaggi possono includere la rimozione di valori mancanti o outliers, la normalizzazione per attenuare effetti sistematici (come la calibrazione delle intensità della fluorescenza) e la compensazione per sovrapposizioni spettrali.

Il passo successivo consiste nell'applicare un **algoritmo di clustering** ai dati. Il clustering è utile per raggruppare le cellule in cluster basati su corrispondenze nei parametri misurati, senza la necessità di etichettare i gruppi in anticipo. Tra le tecniche di clustering più comuni troviamo: i) il K-means, che determina un numero predefinito di cluster (k) e assegna le cellule a questi cluster (Aghaeepour et al., 2011); ii) il DBSCAN, un algoritmo basato sulla densità che non richiede di definire un numero di cluster a priori e può identificare "rumore" nei dati (Ester, 1996) e iii) il Clustering Gerarchico, che consente di costruire una gerarchia di cluster e di esplorare

diverse risoluzioni, ad esempio, formando cluster più grandi o più piccoli (Weber e Robinson, 2016). Durante questa fase, non è necessario sapere in anticipo quante popolazioni cellulari esistano in quanto il clustering si occupa di raggruppare le cellule in base alle loro somiglianze nei dati.

Una volta identificati i cluster, è possibile visualizzare i risultati per esplorare la struttura dei dati. La visualizzazione aiuta a comprendere la distribuzione dei cluster nello spazio multidimensionale e a valutare la qualità del clustering. Le tecniche di visualizzazione più comuni includono:

- **PCA (Analisi delle Componenti Principali):** una tecnica di riduzione dimensionale che cerca di mantenere la massima varianza nei dati (Robinson, et al., 2010; Lugli, E. et al. (2010). È particolarmente utile per proiettare i dati su due o tre dimensioni, consentendo di osservare la separazione tra i cluster.

- **t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding):** Una tecnica che preserva la prossimità locale dei dati, rendendo visibili le strutture più sottili tra i dati (van der Maaten, & Hinton,, 2008).

- **UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection)** è un'altra tecnica di riduzione dimensionale, simile a t-SNE, ma con una capacità superiore di mantenere sia la struttura locale che quella globale, ed è generalmente più veloce (Becht et al., 2018). Visualizzare questi dati può rivelare se i cluster identificati sono ben separati e se ci sono eventuali outliers. Se i cluster risultano distinti e separati, significa che il clustering è risultato efficace.

Dopo aver eseguito il clustering e la visualizzazione, si prosegue con l'interpretazione dei cluster, iniziando a controllare i marcatori associati a ciascun gruppo, verificando se alcuni marcatori specifici siano espressi in modo diverso tra i cluster. Questa fase è fondamentale

per la possibile identificazione di potenziali popolazioni cellulari con specifici fenotipi. Si termina quindi l'analisi con la validazione dimostrando che i cluster siano riproducibili e significativi, confermando i risultati con l'esecuzione di analisi con gating manuale.

Per un'analisi unbiased dei dati citometrici, il flusso ideale è quindi il clustering per identificare i gruppi senza preconcetti, seguito dalla visualizzazione per esplorare e comprendere la distribuzione e la separazione dei cluster per finire con la validazione e l'analisi statistica.

Identificazione di profili immunologici protettivi

Mediante un approccio di analisi citometrica unbiased abbiamo identificato un profilo protettivo dei linfociti T Vδ2 nei confronti delle riattivazioni virali dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT, Hematopoietic Stem Cell Transplantation) e descritto la loro attività antivirale e la loro capacità di migliorare la risposta virus-specifica (Bordoni et al., 2025). Le cellule T Vδ2 sembrano giocare un ruolo protettivo dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (Merli et al., 2020). Sebbene la loro presenza sia stata associata ad un migliore esito clinico del trapianto, il loro coinvolgimento nella protezione antivirale non è stata ancora ben delineata. Abbiamo quindi studiato il profilo protettivo antivirale delle cellule T γδ in pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aplo-HSCT dopo 30 giorni dal trapianto stesso (figura 1).

Per caratterizzare l'andamento delle cellule T γδ nel tempo nei campioni di sangue periferico derivati da pazienti con nessuna riattivazione virale (No-VR) e con riattivazione da citomegalovirus (CMV-R), abbiamo applicato una analisi unbiased dei dati di citometria a flusso a 13 parametri. Come mostrato in figura 1 la PCA ha ben evidenziato la separazione dei due gruppi di pazienti con e senza riattivazione da CMV post 30 giorni dal trapianto. Per definire e quantificare ulteriormente queste differenze tra pazienti No-VR e CMV-R, abbiamo eseguito il clustering FlowSOM (Quintelier et al., 2021) e confrontato l'espressione di 12 marcatori delle cellule T, identificando 5 cluster principali. La rappresentazione UMAP dei dati ha evidenziato regioni chiave relative alle cellule T nei campioni derivati dai pazienti con nessuna riattivazione virale (No-VR) rispetto ai pazienti con riattivazione da citomegalovirus (CMV-R). I pazienti No-VR sono caratterizzati da una frequenza significativamente più elevata di un cluster Vδ2 [verde (2) nella UMAP] a fenotipo citotossico che esprime CD107a+CD16+CD45RA+CD137+NKG2D+ (figura 1). Parallelamente, abbiamo identificato una riduzione del cluster Vδ1-citotossico (CD45RA+CD56+Perforin+) nei pazienti No-VR rispetto ai pazienti CMV-R (blu, 4). Lo studio funzionale ha dimostrato che le cellule T Vδ2 hanno la capacità di inibire la replicazione del CMV, di indurre la maturazione delle cellule presentanti l'antigene e di potenziare la risposta delle cellule T αβ virus-specifiche,

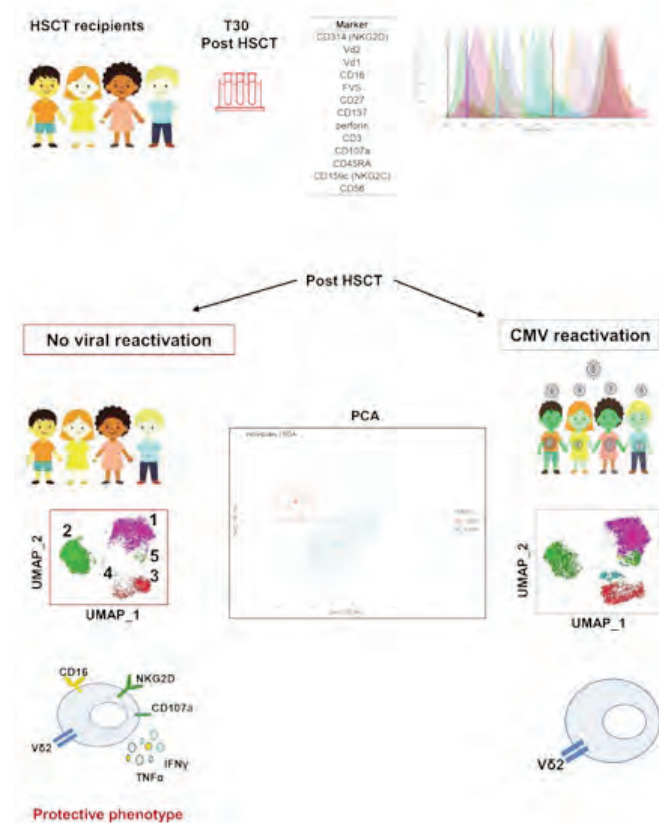


Figure 1: approccio di analisi citometrica unbiased per l'identificazione di un profilo protettivo dei linfociti T Vδ2 nei confronti delle riattivazioni virali dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Cluster 2 (Vδ2, verde) CD107a+CD16+ CD137+NKG2D+; cluster 4 (Vδ1-citotossico, blu) CD45RA+CD56+Perforin+

delineando così una potenziale applicazione dell'immunoterapia mirata alle cellule Vδ2 nel contesto post-HSCT, coniugando attività antivirale e antitumorale.

Identificazione di profili cellulari caratteristici

Abbiamo utilizzato un approccio di analisi citometrica non supervisionata per analizzare anche le cellule dell'immunità innata da cellule mononucleate di sangue periferico in pazienti splenectomizzati o asplenic sia pediatrici che adulti confrontandoli con un gruppo di donatori sani (HD, Figura 2). Mediante un approccio unbiased di dati di citometria a flusso a 10 parametri abbiamo identificato un profilo specifico delle cellule immunitarie innate rivelando un ruolo precedentemente sconosciuto della milza nell'omeostasi delle cellule NK e delle cellule T Vδ2 (Bordoni, et al. 2025).

L'analisi UMAP ha evidenziato due cluster principali di immunità innata (Vδ2 e NK CD56+CD16dim/neg) che differivano tra donatori sani e pazienti splenectomizzati/asplenic, e l'analisi manuale "hand-gating" ha reso possibile la quantificazione di queste differenze. Tra gli adulti, le cellule T Vδ2 erano significativamente ridotte nei pazienti asplenic. Per caratterizzare ulteriormente le cellule NK circolanti nei pazienti splenectomizzati e confrontarle con le cellule NK residenti nella milza, abbiamo eseguito un'analisi multiparametrica concentrandosi sull'espressione di un marcatore di homing (CXCR6) (Angelo LS. et al 2022), sui recettori NK e su due fattori di trascrizione, noti per discriminare lo stato di differenziazione delle cellule NK, Eomes e Tbet (Kiekens et al 2021; Wagner JA et al 2020). E' stato osservato un profilo simile delle cellule NK nel sangue periferico dei pazienti splenectomizzati e nella milza. Nello specifico, l'analisi dei cluster ha identificato 6 diversi cluster con diverse espressioni dei marcatori. L'espressione di diversi marcatori nella milza è caratterizzata dalla presenza di un ampio cluster di cellule NK che esprimono CXCR6high, Eomes, NKp46, NKG2D con assenza del CD16 (marrone, 1), confermando i dati pubblicati sulle cellule NK

residenti nella milza (Angelo LS. et al 2022). Come previsto, questo cluster è assente nel sangue periferico sia dei pazienti che nei HD che di quelli splenectomizzati. Inoltre, la milza ha mostrato la presenza di un cluster CD16negCXCR6dimNKG2Cpos e Eomesneg Tbetneg (verde chiaro, 4). L'assenza sia di Eomes che di Tbet suggerisce una funzionalità ridotta. È interessante notare che questo cluster si trova anche nel sangue periferico di pazienti splenectomizzati, dove rappresenta più della metà delle cellule NK circolanti (56%). Al contrario, l'analisi dei cluster nel sangue periferico di HD ha mostrato un profilo completamente diverso con due cluster principali ad alta espressione del CD16+ Tbet+ Eomes+ NKp46+ e NKG2Cpos suggerendo un profilo più differenziato delle cellule NK circolanti nei soggetti sani (viola, 5). Da notare che i sottogruppi principali trovati sia nella milza (marrone) sia nel sangue di pazienti splenectomizzati (verde chiaro) sono assenti nell'HD. Per valutare le conseguenze funzionali della ridotta espressione di CD16 sulle cellule NK, abbiamo eseguito un test ADCC nei pazienti asplenic, dimostrando l'incapacità delle loro cellule NK di esercitare la funzione ADCC, come rilevato dalla mancata induzione della proteina CD107a.

Conclusioni

Nel complesso quindi, nei nostri studi, l'utilizzo sequenziale di UMAP per la visualizzazione ed esplorazione delle popolazioni identificate, unitamente a FlowSOM per il clustering non supervisionato, ha rappresentato un approccio metodologico essenziale, che ci ha permesso di delineare i profili immunitari in diversi contesti clinici, quali i pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aploidentico di cellule staminali emopoietiche (haplo-HSCT) e in pazienti asplenic.

In sintesi, l'uso di FlowSOM e UMAP fornisce un approccio potente e imparziale per analizzare dati complessi di citometria a flusso, consentendo l'identificazione, la visualizzazione e la caratterizzazione oggettive dei profili cellulari, che potrebbero contribuire alla comprensione del complesso equilibrio tra protezione immunitaria e/o patogenesi.

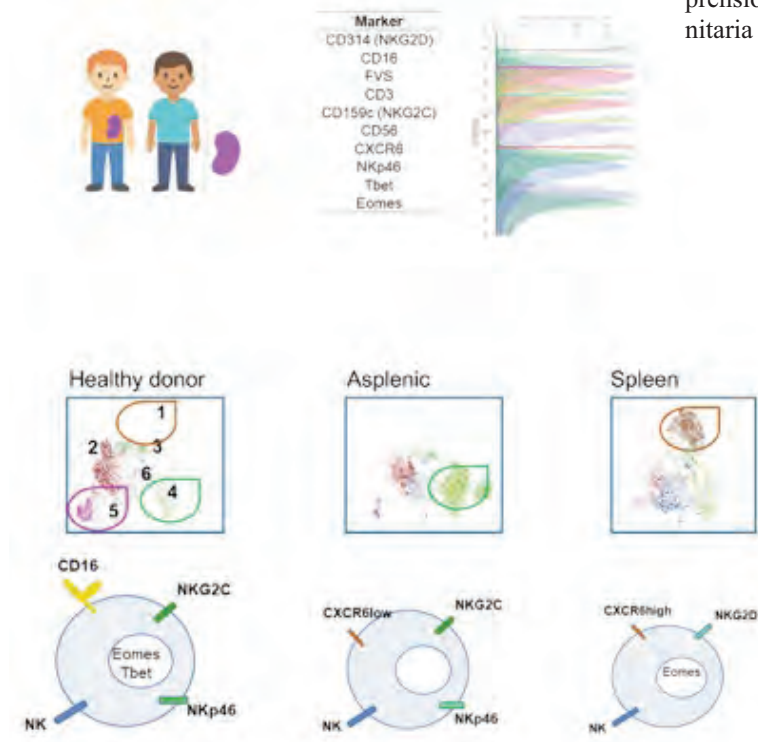


Figure 2: approccio di analisi citometrica unbiased per l'identificazione di un profilo caratteristico delle cellule immunitarie innate in campioni biologici derivati da pazienti splenectomizzati o asplenic e donatori sani (HD). NK CXCR6high, Eomes, NKp46, NKG2D, cluster marrone, (1); NK CD16neg, CXCR6dim NKG2Cpos, Eomesneg, Tbetneg cluster verde chiaro, (4); NK CD16+ Tbet+ Eomes+ NKp46+ e NKG2Cpos cluster viola (5).

Bibliografia

1. Aghaeepour N. et al. (2013). Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods*. 2013 Mar;10(3):228-38.
2. Aghaeepour N. et al. (2011). Rapid Cell Population Identification in Flow Cytometry Data. *Cytometry A*. 2011 Jan;79(1):6-13.
3. Ester M. et al. (1996). A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters. In: *Proceedings of 2nd International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (Kdd-96)* (1996).
4. Weber LM and Robinson MD (2106). Comparison of clustering methods for high-dimensional single-cell flow and mass cytometry data. *Cytometry A*. 2016 Dec;89(12):1084-1096.
5. Robinson, J. P. (2010). Data Analysis in Flow Cytometry: The Future Just Started. *Cytometry Part A*.
6. Lugli, E. et al. (2010). Computational Analysis of Multi-parametric Flow Cytometry Data: The Next Generation. *Cytometry Part A*.
7. van der Maaten, L J P., & Hinton, GE. (2008). Visualizing data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*, 9(Nov), 2579-2605.
8. Becht E. et al. (2018). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*. 2018 Dec 3.
9. Bordoni V. et al. (2025). Antiviral potential of Vδ2 T cells in children given TCR αβ/CD19 cell-depleted HLA-haploidentical HSCT. *Blood Adv*. 2025 Mar 11;9(5):990-1002.
10. Merli P. et al. (2020). Immune Modulation Properties of Zoledronic Acid on TcRγδ T-Lymphocytes After TcRαβ/CD19-Depleted Haploidentical Stem Cell Transplantation: An analysis on 46 Pediatric Patients Affected by Acute Leukemia. *Front. Immunol.*, 12 May 2020.
11. Quintelier K., et al. (2021). Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. *Nature Protocols* volume 16, pages3775-3801 (2021).
12. Bordoni V., Cinicola BM., et al. (2025). Impairment of Innate Immunity and Depletion of Vaccine-Induced Memory B and T Cells in the Absence of the Spleen. *Am J Hematol*. 2025 May;100(5):770-784
13. Angelo LS. et al (2022) et al., Phenotypic and Functional Plasticity of CXCR6+ Peripheral Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology* 12 (2022): 810080.
14. Kiekens, et al. (2021). T-BET and EOMES Accelerate and Enhance Functional Differentiation of Human Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology* 12 (2021): 732511.
15. Wagner JA, et al. (2020). Stage-Specific Requirement for Eomes in Mature NK Cell Homeostasis and Cytotoxicity. *Cell Reports* 31, no. 9 (2020): 107720.



Invito alla lettura

a cura di Rachele Amodeo

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, Brinkman RR, Czechowska K. *Cytometry B Clin Cytom*. 2024 Jul;106(4):228-238. doi: 10.1002/cyto.b.22166. Epub 2024 Feb 26. PMID: 38407537
Free article. Review

La Citometria a flusso è uno strumento clinico fondamentale nella diagnosi di molte neoplasie ematologiche e tradizionalmente richiede un'attenta analisi dei dati digitali da parte di ematopatologi con competenze specifiche nel settore. Il progresso e il successo dell'intelligenza artificiale sta coinvolgendo anche il mondo della Citometria pertanto come laboratori e clinici ci troveremo di fronte a un bivio tecnologico nella gestione di questi cambiamenti. Sebbene le soluzioni di intelligenza artificiale (AI) possano facilitare l'analisi multidimensionale dei dati citometrici, le loro implementazioni cliniche sono ancora limitate. In questo interessante manoscritto, sono esposte considerazioni tecniche, operative, normative e raccomandazioni per l'utilizzo dell'intelligenza artificiale nel laboratorio di Citometria a flusso

Newly diagnosed T-large granular lymphocyte Leukemia presenting with severe neutropenia: a case report

El Asmar S, Lasri N, Lahlimi F, Yahyaoui H, Tazi I. *Oxf Med Case Reports*. 2025 Sep 28;2025(9):omaf170. doi: 10.1093/omcr/omaf170. eCollection 2025 Sep. PMID: 41025032

Newly diagnosed T-large granular lymphocyte Leukemia presenting with severe neutropenia: a case report

El Asmar S, Lasri N, Lahlimi F, Yahyaoui H, Tazi I. *Oxf Med Case Reports*. 2025 Sep 28;2025(9):omaf170. doi: 10.1093/omcr/omaf170. eCollection 2025 Sep. PMID: 41025032

La leucemia linfatica granulosa a grandi cellule (LGLL) è una rara malattia linfoproliferativa. E' classificata in due sottotipi principali: la leucemia linfatica granulosa a grandi cellule T (T-LGLL) e la linfocitosi cronica delle cellule natural killer (NK). La malattia è caratterizzata da bicitopenie, in particolare neutropenia e anemia, spesso associate a linfocitosi, raramente trombocitopenia. Frequente è l'associazione con disturbi autoimmuni, in particolare con l'artrite reumatoide. La Citometria a flusso eseguita su sangue periferico identifica una popolazione clonale CD3+, CD8+, CD57+, CD5+, CD7-, TCRab+ compatibile con T-LGLL. Questo articolo sottolinea le sfide diagnostiche e terapeutiche poste dalla T-LGLL, soprattutto in contesti in cui la diagnostica molecolare e le terapie mirate non sono disponibili. Nei pazienti con neutropenia inspiegabile, in particolare se persistente e grave, la T-LGLL dovrebbe essere presa in considerazione anche in assenza di marcatori autoimmuni. Un approccio diagnostico completo che integri citologia, Citometria a flusso e, quando disponibili, test molecolari in particolare mutazioni STAT3/STAT5 è fondamentale per una diagnosi accurata.

Il ruolo della Citometria a flusso nella identificazione del Fenotipo piastrinico nella Trombocitemia essenziale

¹Vittorio Emanuele Muccio, ²Cristina Barale, ¹Marisa Pautasso,
^{2,3}Alessandro Morotti, ²Isabella Russo

¹Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologiche, AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino.

²Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino.

³Medicina Interna a Indirizzo Ematologico, AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino.

email: v.muccio@sanluigi.piemonte.it

Abstract

Essential thrombocythemia (ET) is a Philadelphia chromosome-negative (Ph-) myeloproliferative neoplasm (MPN) that increases the risk of vascular events such as thrombosis and hemorrhage. Lines of evidence suggest that enhanced platelet activation is involved in pathogenesis of thrombosis in ET and the hallmark of thrombotic prevention is the use of the antiplatelet agent aspirin. Applicable laboratory approaches to define risk scores and improve prognostic value in ET are in demand. Flow cytometry is an essential laboratory tool for assessing platelet phenotype, function, and cellular interactions. In this study, we evaluated platelet function in ET patients by analyzing platelet aggregation by Born's method and membrane expression of activation markers, such as CD62 and the active form of GPIIb/IIIa, by flow cytometry. In comparison to healthy subjects, ET patients show increased aggregability, specifically to ADP and TRAP-6, and, in those in ASA treatment, a decreased anti-aggregating effect of aspirin. Regardless aspirin therapy, flow cytometry analysis reveals that platelets from ET patients show increased levels of CD62 expression and decreased PAC-1 binding to GPIIb/IIIa active form. Altogether, these results indicate that platelets from ET patients are characterized by increased activation and aggregability associated with a procoagulant phenotype that could play a critical role in the hypercoagulable state. Since the management of ET relies on risk stratification, our data and advances in highly multiparametric and imaging flow cytometry and sorting could help identify functionally and immunophenotypically distinct platelet subsets and monitor the efficacy of antithrombotic drugs.

Introduzione

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono un gruppo di malattie ematologiche caratterizzate dall'espansione clonale di uno o più tipi cellulari appartenenti alla linea mieloide e si differenziano in base alla presenza o assenza del cromosoma Philadelphia (Ph) (risultato della traslocazione tra regioni dei cromosomi 9 e 22) (Todor SB e Mihaila RG, 2025). Le complicanze più frequenti delle MPN (Ph-) sono le trombosi arteriose e venose e, meno frequentemente, le emorragie (Van Genderen PJJ e Michiels JJ, 1994). Le piastrine rivestono un ruolo centrale nell'emostasi e trombosi e alterazioni della loro funzionalità potrebbero essere alla base dell'aumentato rischio trombotico nei pazienti con MPN (Ph-) MPN (Marin Oyarzún CP e Heller PG, 2019; Matsuura S, et al. 2020). Tra le MPN (Ph-), la Trombocitemia Essenziale

(TE) è quella maggiormente associata a un aumentato rischio di complicanze tromboemboliche ed emorragiche ed è caratterizzata sia da trombocitosi che da piastrine con anomalie funzionali (He F, et al. 2024; Morotti A, et al. 2023) di cui, però, non è stato a tutt'ora identificato un pattern costante di alterazioni.

Le piastrine dei pazienti con TE mostrano risposte alterate agli stimoli (Marin Oyarzún CP e Heller PG, 2019; Matsuura S, et al. 2020). Durante gli episodi trombotici è stata dimostrata in vivo l'attivazione piastrinica (Nurden P, et al. 1996) e, nei pazienti con TE ed eritromelalgia, sono state osservate sia attivazione sia riduzione dell'emivita isotopica delle piastrine (Van Genderen PJJ e Michiels JJ, 1996). La trombosi continua a rappresentare una delle principali cause di morbidità e mortalità nei pazienti con TE ma non ne è ancora completamente chiarito il processo fisiopatologico esatto.

Le piastrine normalmente circolano in uno stato non attivato e si attivano solo in determinate circostanze (Gremmel T, et al. 2024). L'attivazione è associata a modificazioni nella capacità di legame e all'espressione di diverse proteine di superficie. La valutazione della funzione piastrinica nel laboratorio di routine rappresenta, pertanto, uno strumento fondamentale per l'indagine dei disturbi emorragici e delle disfunzioni piastriniche, nonché per la valutazione della risposta alla terapia anti-aggregante.

Il metodo "gold standard" per la misurazione della funzione piastrinica è l'aggregometria in trasmissione di luce. Tuttavia, questo metodo richiede un numero minimo di piastrine (di solito $>100 \times 10^9/L$), limitandone l'uso nei soggetti con trombocitopenia moderata o severa. Inoltre, campioni provenienti da soggetti con conte piastriniche elevate richiedono una diluizione con plasma povero di piastrine prima della valutazione (Stratmann J, et al. 2019).

La citofluorimetria, mediante il legame di anticorpi verso specifici epitopi piastrinici, si è dimostrata uno strumento efficace nello studio dell'attivazione piastrinica in vivo (Tschoepe D, et al. 1990; de Castellarnau C, et al. 1997; Hindle MS, et al. 2023) ed è sempre più spesso utilizzata per evidenziare alterazioni nell'espressione di marcatori di attivazione piastrinica di membrana dopo stimolazione con agonisti (Michelson AD, et al. 2000), nonché nell'identificare e quantificare le microparticelle derivate dalle piastrine (Kailashiya J, 2018). Un vantaggio rilevante di questa tecnica è che non dipende dalla conta piastrinica e può, pertanto, essere eseguita anche in soggetti con grave trombocitopenia. Numerosi studi dimostrano che livelli aumentati di marcatori di atti-

vazione piastrinica possono risultare utili nella previsione di uno stato pre-trombotico (Sedlmayr P, et al. 1996; Tschoepe D, et al. 1993). Inoltre, la valutazione citofluorimetrica dell'attivazione piastrinica si è dimostrata efficace nel monitoraggio dell'attività piastrinica nei pazienti con malattia cardiovascolare e durante trattamenti interventistici (Gawaz M, et al. 1996a; Gawaz M, et al. 1996b).

In particolare, noti marcatori di attivazione piastrinica espressi sulla membrana e valutabili mediante citofluorimetria a flusso sono P-selectina (CD62P) e il complesso glicoproteico (GP) IIb/IIIa che nella sua forma attivata si lega all'anticorpo Platelet Activation Complex-1 (PAC-1).

L'espressione della P-selectina sulla superficie piastrinica è correlata alla secrezione dei granuli α , in seguito alla stimolazione con agonisti (Spurgeon BEJ e Naseem KM, 2020) e diversi studi suggeriscono che l'aumentata percentuale di piastrine circolanti che esprimono CD62P possa rappresentare un affidabile marcatore dell'attivazione in vivo delle piastrine (Ramström S, et al. 2016). Il CD62P una volta traslocato sulla superficie piastrinica, dopo l'attivazione, media l'adesione delle piastrine ai leucociti, le interazioni cellulari tra piastrine, leucociti e cellule endoteliali e la sua espressione è risultata aumentata in numerose condizioni cliniche e in studi in vitro in cui si valutavano l'attivazione piastrinica, l'interazione leucocita-piastrina e la trombosi (Graff J, et al. 2002).

L'anticorpo monoclonale PAC-1 riconosce la forma attivata del complesso GPIIb/IIIa (integrina α IIb β 3), che rappresenta il principale recettore piastrinico per il fibrinogeno (Laspa Z, et al. 2025). Il recettore GPIIb/IIIa, se non stimolato, è in una conformazione "chiusa" e non lega il fibrinogeno mentre, dopo attivazione piastrinica, cambia conformazione permettendo il legame di PAC-1 al sito attivo (Lu Q e Malinauskas RA, 2011). Poiché le piastrine con GPIIb/IIIa attivato sono in grado di aggregarsi, maggiore è il segnale di PAC-1 maggiore sarà il legame con il fibrinogeno e il potenziale aggregante. Pertanto, il PAC-1 rappresenta un marker sensibile di attivazione precoce (prima della degranolazione) e, in condizioni normali, può essere considerarsi un marcatore di aggregabilità piastrinica.

Sebbene i soggetti con TE presentino un aumentato rischio di trombosi e, in alcuni casi, anche di emorragia, i livelli di attivazione e reattività piastrinica non sono normalmente valutati.

Questo studio fornisce evidenza che i pazienti con TE presentano piastrine circolanti basalmente più attive e con un fenotipo procoagulante che potrebbe potenzialmente svolgere un ruolo chiave nell'aumentato rischio trombotico di questi pazienti.

Scopo dello studio e Pazienti

Scopo dello studio è valutare la funzionalità delle piastrine in pazienti affetti da TE attraverso il metodo standard di aggregazione in campioni di plasma ricco in piastrine (PRP) e l'espressione di specifici epitopi di membrana mediante l'analisi citofluorimetrica in campioni di sangue intero. Lo studio ha coinvolto 20 pazienti con TE e 24 soggetti di controllo. Rispetto ai soggetti sani, valori significativamente più alti sono stati evidenziati nel numero degli eritrociti in tutti i pazienti e delle piastrine nei pazienti in terapia con aspirina. Non sono emerse dif-

ferenze significative tra i pazienti con o senza terapia antiaggregante con aspirina.

Metodi

In campioni di plasma ricco in piastrine (PRP) di tutti i soggetti sono stati eseguiti test di aggregazione piastrinica con metodo di Born in risposta a: Acido arachidonico (AA) 1 mmol/L, ADP 2,5 μ mol/L; Collagene 4 mg/L; Epinefrina 10 μ mol/L; Peptide 6 attivante il recettore della trombina (TRAP-6) 10 μ mol/L. I risultati sono espressi come percentuale della Maximal Aggregation. Per l'analisi citofluorimetrica sono stati usati il CD41a (APC), per identificare le piastrine, il CD62P PE-Cy7 e il PAC-1 (FITC), come marcatori di attivazione. Tutti gli anticorpi sono della Becton Dickinson (BDTM).

Le piastrine sono state identificate in base alle loro caratteristiche di forward, side scatter e positività per CD41a. Il sangue raccolto in provette con sodio citrato (BDTM) è contato al contaglobuli per valutare il numero di piastrine del campione. È stato prelevato un volume di sangue intero sufficiente ad ottenere almeno 1×10^6 piastrine per l'analisi. Sono stati quindi aggiunti gli anticorpi anti-CD41a APC, anti-CD62P PE-Cy7 e PAC-1 FITC, utilizzati a concentrazioni ottimali determinate mediante titolazione e conformemente alle indicazioni del produttore. I campioni sono stati incubati per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (RT). Al termine dell'incubazione, ciascun campione è stato riportato a un volume finale di 1 mL mediante aggiunta di PBS e immediatamente acquisito al citofluorimetro. I risultati sono espressi come percentuale di cellule positive.

Lo studio è stato condotto conformemente alla Dichiarazione di Helsinki e approvato dal Comitato Etico Territoriale Interaziendale A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino (Protocollo N.0065/2025).

Risultati

Dall'analisi dell'aggregazione piastrinica risulta che, rispetto ai soggetti sani di controllo, le piastrine dei pazienti con TE, non in terapia antiaggregante, mostrano un aumento della sensibilità agli effetti aggreganti di ADP ($p < 0.01$) e TRAP ($p < 0.0001$) (Fig. 1A), mentre nei pazienti in terapia antiaggregante con aspirina i valori di aggregazione piastrinica risultano significativamente ridotti al collagene ($p < 0.001$), all'epinefrina ($p < 0.001$) e all'AA ($p < 0.005$) ma non all'ADP ($p = ns$). Una percentuale non trascurabile di pazienti (circa il 20%) in terapia con aspirina mostra una Maximal Aggregation superiore al 20% in risposta all'AA indicando una incompleta inibizione dell'attività della cicloossigenasi 1 (COX-1) (Fig. 1B). Quest'ultimo dato mette in luce la presenza di soggetti con TE caratterizzati da ridotta risposta agli effetti inibitori piastrinici all'aspirina.

Dal confronto dei test di aggregazione dei pazienti non in terapia antiaggregante con quelli in trattamento con aspirina, emergono gli effetti inibitori dell'aspirina sulla risposta a collagene, epinefrina e AA ($p < 0.001$ per tutti) (Fig. 1C) nonché sulla risposta agli agonisti ai quali le piastrine dei pazienti con TE non in terapia con aspirina mostravano maggiore sensibilità come ADP e TRAP-6 ($p < 0.001$ per entrambi).

L'analisi in citofluorimetria mostra che, rispetto ai soggetti sani di controllo, l'espressione sulla membrana

	SOGGETTI SANI (n=24)	TE NO ASA (n=9)	TE ASA (n=11)
ETÀ (anni)	49±11	55±15	58±13
GENERE M/F n (%)	13/11 (54.2/45.8)	4/5 (44.4/55.6)	4/7 (36.4/63.6)
LEUCOCITI (*10 ³ /uL)	5.9±1.4	8.9±5.1	9.1±5.6
ERITROCITI (*10 ⁶ /uL)	5.0±0.6	4.5±0.6 *	3.9±1.4 *
Hb (g/dL)	14.1±1.5	13.2±2.0	11.9±4.5
HCT (%)	44.2±4.5	40.4±5.4	36.5±14.1
PIASTRINE (*10 ³ /uL)	281±63	381±167	649±553 *
PDW (fL)	19.3±2.8	14.4±1.4	14.6±4.7
PCT (%)	0.28±0.1	0.4±0.1	0.5±0.5
MPV (fL)	9.9±1.5	9.7±0.5	9.8±3.5
		TE NO ASA (n=9)	TE ASA (n=11)
MUTAZIONE DRIVER n (%)	JAK2 V617F	6 (66.7)	8 (72.7)
	CALR	3 (33.3)	3 (27.3)
TERAPIA ANTICOAGULANTE n (%)		2 (22.2)	0 (0)
TERAPIA ONCOLOGICA n (%)	CITO RIDUTTIVO	2 (22.2)	6 (54.5)
	JAK-i	0 (0)	1 (9.1)
EVENTI TROMBOTICI n (%)		1 (11.1)	0 (0)

I valori sono espressi come media ± deviazione standard
* p < 0.05 vs soggetti sani

A

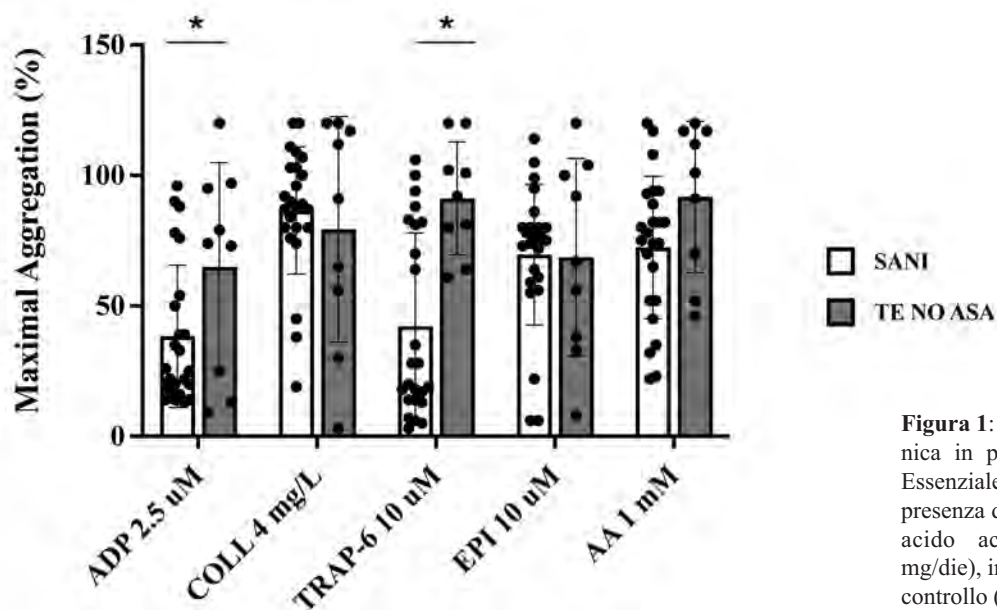


Figura 1: Test di aggregazione piastrinica in pazienti con Trombocitemia Essenziale (TE), sia in assenza che in presenza di terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico (ASA, 100 mg/die), in confronto a soggetti sani di controllo (A e B, rispettivamente) e tra gli stessi pazienti (C).

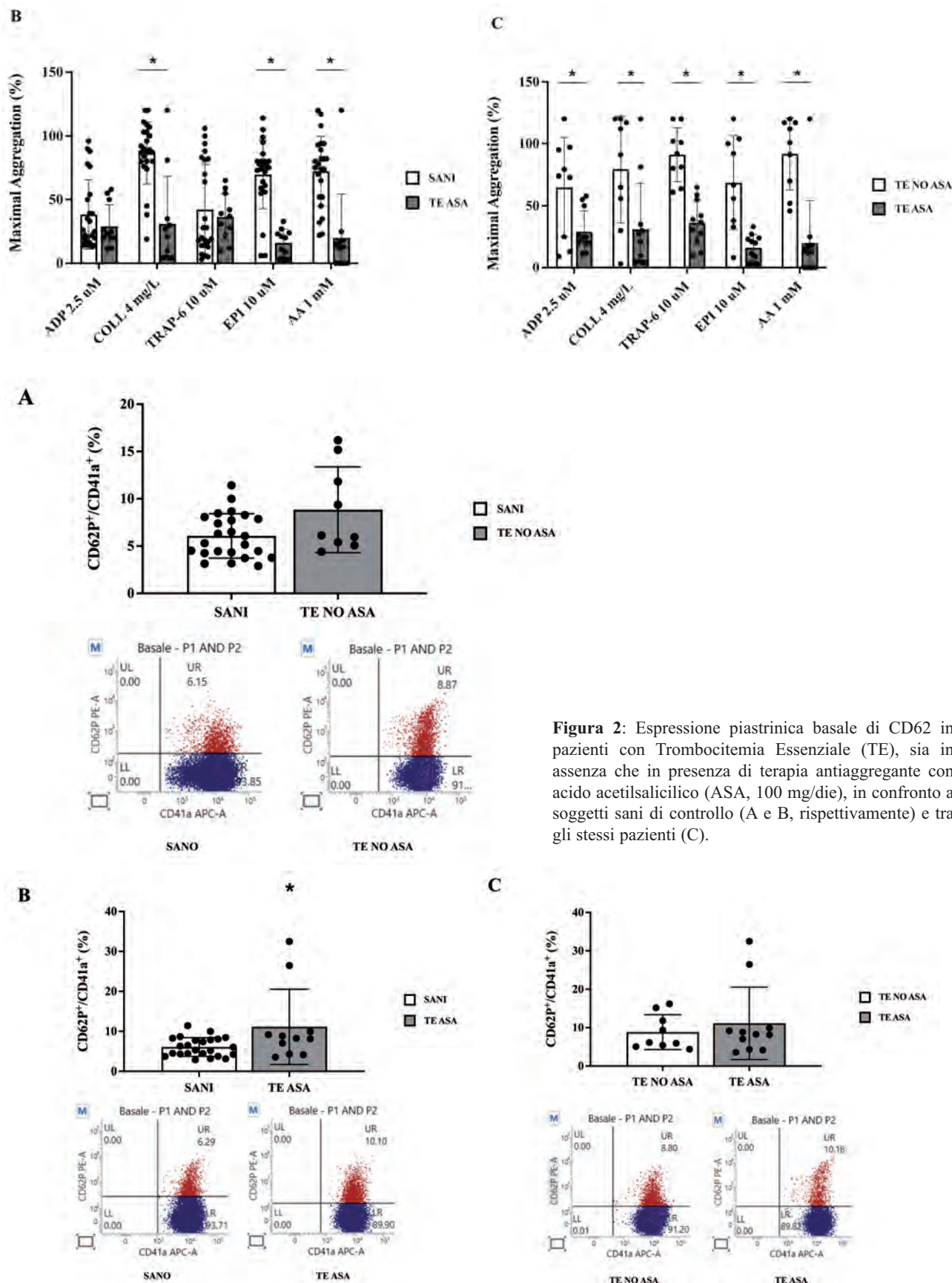


Figura 2: Espressione piastrinica basale di CD62 in pazienti con Trombocitemia Essenziale (TE), sia in assenza che in presenza di terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico (ASA, 100 mg/die), in confronto a soggetti sani di controllo (A e B, rispettivamente) e tra gli stessi pazienti (C).

piastrinica di CD62P nei pazienti affetti da TE mostra un trend in aumento (statisticamente non significativo presumibilmente anche a causa della scarsa numerosità dei soggetti), in assenza di terapia con aspirina ($p=0.09$) (Fig.2A) e un aumento significativo in presenza di terapia antiaggregante con aspirina ($p<0.05$, Fig.2B). Dal

confronto tra i pazienti in aspirina e quelli non in aspirina non emergono differenze nell'espressione di CD62P (Fig.2C).

Dall'analisi del legame di PAC-1 al recettore del fibrinogeno GPIIb/IIIa si è osservato che nei pazienti con TE, rispetto ai soggetti sani di controllo, il legame di

A

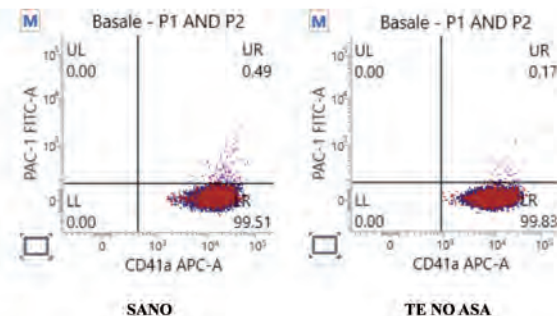
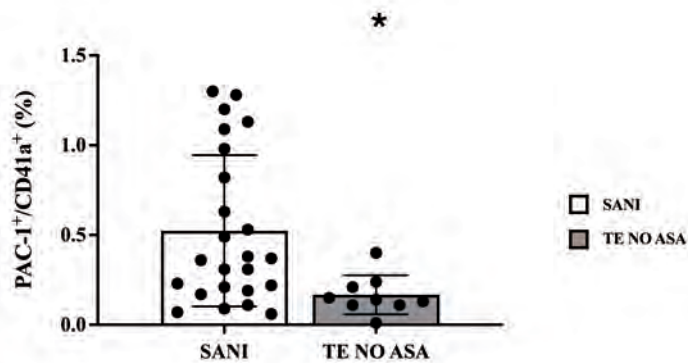
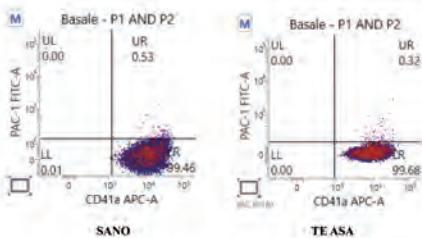
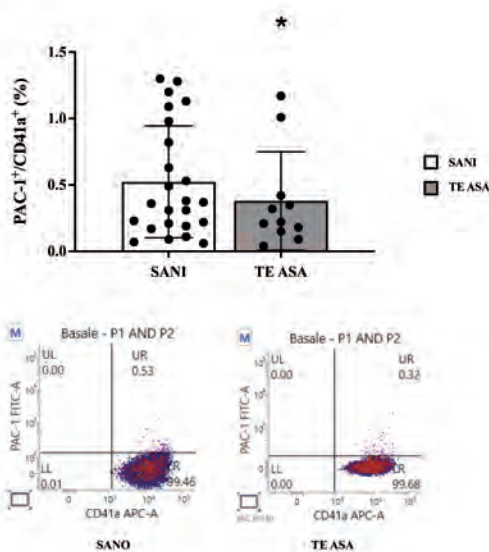
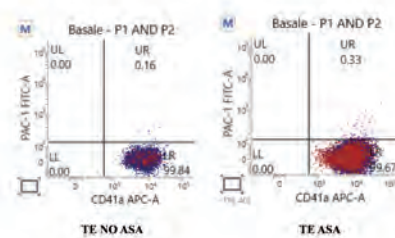
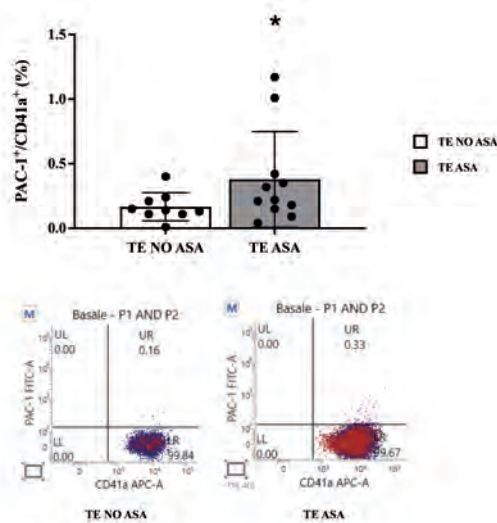


Figura 3:Espressione piastrinica basale di PAC-1 in pazienti con Trombocitemia Essenziale (TE), sia in assenza che in presenza di terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico (ASA, 100 mg/die), in confronto a soggetti sani di controllo (A e B, rispettivamente) e tra gli stessi pazienti (C).

B



C



PAC-1 sulla membrana piastrinica è minore sia in assenza ($p < 0.0001$, Fig.3A) che in presenza ($p < 0.005$, Fig.3B) di terapia con aspirina. Tuttavia, dal confronto tra i pazienti con o senza terapia antiaggregante con aspirina (Fig. 3C), si osserva che l'aspirina è in grado aumentare l'espressione di PAC-1 ($p < 0.003$) indicando una maggiore disponibilità di siti di legame di GPIIb/IIIa con l'anticorpo.

Conclusioni

Lo studio dimostra che, rispetto a una popolazione di soggetti sani di controllo, nei pazienti con TE: i) è presente un'esaltata aggregabilità piastrinica a TRAP-6 e ADP, ii) la terapia antiaggregante con aspirina inibisce efficacemente la risposta aggregante piastrinica, ma in alcuni pazienti tale inibizione risulta incompleta, iii) a livello di membrana piastrinica, l'espressione di CD62P risulta aumentata e non modificata dalla terapia con aspi-

rina) iv) il legame di GPIIb/IIIa a PAC-1 è ridotto e questa riduzione è, almeno in parte, revertita dall'assunzione di aspirina. Pertanto, dall'analisi al citofluorimetro, se da un lato, la maggiore espressione di CD62P, pur in assenza di stimolo, indica uno stato di iperreattività piastrinica basale, dall'altro, la ridotta espressione di PAC-1 indurrebbe a ritenere che le piastrine dei pazienti con TE dovrebbero mostrare una ridotta tendenza all'aggregabilità a causa della ridotta esposizione sulla membrana di GPIIb/IIIa nella sua conformazione attiva. Questa apparente discordanza, invece, tra aumentata risposta aggregante ad alcuni stimoli e la ridotta esposizione di GPIIb/IIIa sulla membrana in assenza di stimolo potrebbe essere spiegata, almeno in parte, dalle peculiari caratteristiche assunte dalle piastrine con fenotipo procoagulante. A tale riguardo, studi in Letteratura dimostrano che le piastrine con accentuata attività procoagulante si caratterizzano per la presenza di filamenti di fibrina sulla

membrana, rappresentando una sottopopolazione di piastrine attivate in grado di trattenere sulla loro superficie diversi fattori procoagulanti rilasciati dai granuli α (Yakimenko A.O., et al. 2012). In presenza di questo fenotipo piastrinico, il legame di PAC-1 a GPIIb/IIIa sulla membrana piastrinica risulterebbe ostacolato anche per ingombro sterico. Tuttavia, non si può escludere che il ridotto legame possa invece dipendere da una ridotta espressione del recettore del fibrinogeno. Uno studio condotto da Moore et al (2013) ha dimostrato, nei pazienti con TE, un ridotto legame delle piastrine al fibrinogeno nonostante normali livelli di espressione del recettore GPIIb/IIIa (Moore, et al. 2013). Gli stessi Autori dimostrano anche che, dopo esposizione alla trombopoietina, la trombina, mediante legame al suo recettore PAR-1, indurrebbe un aumento dell'espressione di GPIIb/IIIa a cui seguirebbe, tuttavia, la scomparsa dei siti di legame con il fibrinogeno. Si può quindi ipotizzare che condizioni di aumentata attivazione di PAR-1 portino ad aumentata conversione di fibrinogeno in fibrina con scomparsa dei siti di legame al fibrinogeno e conseguente riduzione di legame a PAC-1. Possiamo quindi ipotizzare che, nel nostro studio, le piastrine dei pazienti con TE siano basalmente più attivate (come indicato dagli aumentati livelli di espressione di CD62) e presentino soprattutto un fenotipo "coated" ovvero piastrine con deposizione sulla membrana di filamenti di fibrina, che maschererebbero, almeno parzialmente, i siti di legame di GPIIb/IIIa a PAC-1. In tale contesto, la terapia con aspirina aumenterebbe, in condizioni basali, il legame di PAC-1 a GPIIb/IIIa, da un lato, per l'azione di lisi dell'aspirina sulla fibrina e, dall'altro, per gli effetti inibitori dell'aspirina sulla trombina e quindi sulla generazione di fibrina. Ulteriori studi, nel nostro laboratorio, verificherebbero la relazione tra marcatori diretti dell'attività procoagulante delle piastrine e l'espressione di PAC-1 e chiariranno se, tra i meccanismi responsabili dell'aumentata risposta aggregante a TRAP-1 e ADP, possano essere implicati un'altra espressione e/o attivazione dei relativi recettori.

In conclusione, i dati del presente studio dimostrano che, nella TE sono presenti alterazioni piastriniche funzionali che potrebbero svolgere un ruolo nello stato di ipercoagulabilità presente nei disordini mieloproliferativi. Inoltre, questo studio suggerisce che la citometria a flusso potrebbe rappresentare un utile strumento per l'identificazione di pazienti con fenotipo piastrinico procoagulante. L'allestimento di pannelli multicolore potrebbe contribuire ad ampliare le conoscenze sulla funzionalità piastrinica e fornire utili strumenti predittivi di rischio per complicanze tromboemboliche nei pazienti con TE ed essere impiegati nella pratica clinica anche per monitorare l'effettiva efficacia dei farmaci antitrombotici.

Referenze

- de Castellarnau C., Cullaré C., Alvarez M.V., et al. Functional characterization of GPIIb- and GPIIIa-specific monoclonal antibodies. Further evidence for the existence of agonist-specific activated states of the platelet fibrinogen receptor. *Platelets*. 1997;8(4):243-53.
- Gawaz M., Neumann F.J., Ott I., et al. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart*. 1996a;76:166-172.
- Gawaz M., Neumann F.J., Ott I., Schiessler A., Schömig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*. 1996b;93:229-237.
- Graff J., Klinkhardt U., Schini-Kerth V.B., et al. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Mar;300(3):952-7.
- Gremmel T., Frelinger A.L. 3rd, Michelson A.D. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2024 Nov;50(8):1173-1186.
- He F., Laranjeira A.B., Kong T., et al. Multiomic profiling reveals metabolic alterations mediating aberrant platelet activity and inflammation in myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest*. 2024 Feb 1;134(3):e172256.
- Hindle M.S., Cheah L.T., Yates D.M., Naseem K.M. Preanalytical conditions for multiparameter platelet flow cytometry. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023 Sep 20;7(7):102205.
- Kailashiya J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal Biochem*. 2018 Apr 1;546:78-85.
- Laspa Z., Rohlfing A.K., Gawaz M.P. Analyzing Platelet Subpopulations by Multi-color Flow Cytometry. *J Vis Exp*. 2025 Jun 10;(220).
- Lu Q., Malinauskas R.A. Comparison of two platelet activation markers using flow cytometry after in vitro shear stress exposure of whole human blood. *Artif Organs*. 2011 Feb;35(2):137-44.
- Marin Oyarzún CP, Heller PG. Platelets as Mediators of Thromboinflammation in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Front Immunol*. 2019 Jun 14;10:1373.
- Matsuura S., Thompson C. R., Belghasem M. E., et al. (2020). Platelet dysfunction and thrombosis in JAK2(V617F)-Mutated primary myelofibrotic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 40, e262–e272.
- Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Frelinger III A.L., Furman M.I. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods*. 21 (2000), pp. 259-270.
- Moore S.F., Hunter R.W., Harper M.T., et al. Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin α (IIb) β (3) pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia. *Blood*. 2013 Feb 14;121(7):1209-19.
- Morotti A., Barale C., Sornatale M., et al. Aberrant Platelet Aggregation as Initial Presentation of Essential Thrombocythemia: Failure of Enter-Coated Aspirin to Reduce Platelet Hyperactivation. *Int J Mol Sci*. 2023 Dec 22;25(1):176.
- Nurden P., Bihour C., Smith M., Raymond J.M., Nurden A.T. Platelet activation and thrombosis: Studies in a patient with essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 51 (1996), pp. 79-84.
- Ramström S., Södergren A.L., Tynngård N., Lindahl T.L. Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives? *Semin Thromb Hemost*. 2016 Apr;42(3):268-81.
- Sedlmayr P., Grosshaupt B., Muntean W. Flow cytometric detection of intracellular platelet antigens. *Cytometry*. 1996 Apr 1;23(4):284-9.
- Spurgeon B.E.J., Naseem K.M. Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020 Jan;98(1):19-27.
- Stratmann J., Karmal L., Zwinge B., Miesbach W. Platelet Aggregation Testing on a Routine Coagulation Analyzer: A Method Comparison Study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019 Jan-Dec; 25:1076029619885184.
- Todor S.B., Mihaila R.G. Cytokine Landscapes, Immune Dysregulation, and Treatment Perspectives in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms: A Narrative Review. *J Clin Med*. 2025 Sep 8;14(17):6328.
- Tschoepe D., Schultheiß H.P., Kolarov P., et al. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation*. 88 (1993), pp. 37-4.
- Tschoepe D., Spangenberg P., Esser J., et al. Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. *Cytometry*. 11 (1990), pp. 652-656.
- Van Genderen P.J., Lucas I.S., Van Strik R., et al. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemostasis*. 76 (1996), pp. 333-338.
- Van Genderen P.J.J., Michiels J.J. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic thrombocythemia. *Presse Med*. 1994; 23 73-77.
- Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., et al. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J*. 2012 May 16;102(10):2261-9.

QUOTA ASSOCIATIVA GIC 2026... 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 2026 e quelle arretrate 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 cosiddetti "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



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 capacità 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 2026

<http://www.citometriagic.it>



News in Bibliografia

Peer Review Journal

The Diamond Age of Cytometry: From Fulwyler to Spectral Multiplexing.

Robinson JP.

Cytometry A. 2025 Nov;107(11):713-715. doi: 10.1002/cyto.a.24970.

An Opportunity for ISAC and ICCS to Lead on Universal Cytometry Standards.

Sorigue M, Petriz J.

Cytometry A. 2025 Dec;107(12):785-786. doi: 10.1002/cyto.a.70003.

Lost in Translation: Harmonizing Terminology and Defining Mathematical Tools for Panel Optimization.

Rajwa B, Roederer M.

Cytometry A. 2025 Dec;107(12):793-816. doi: 10.1002/cyto.a.24972. Review.

Automated Gating of CD34⁺ Cells in Cord Blood: Performance Evaluation of a Machine Learning-Based ISHAGE Protocol.

Simard C, Fournier D, Trépanier P.

Cytometry A. 2026 Feb 20. doi: 10.1002/cyto.a.70017.

TimeFlow 2: An Unsupervised Cell Lineage Detection Method for Flow Cytometry Data.

Liarou M, Matthes T, Marchand-Maillet S.

Cytometry A. 2026 Jan;109(1):42-61. doi: 10.1002/cyto.a.70006.

Optimization of a 40-Color Spectral Flow Cytometry Panel for Human Blood Immunophenotyping: Impact of Blood Volume, Sample Preservation, and Overnight Staining.

Neubauer F, Spittler A, Berger A, Wisgrill L.

Cytometry A. 2025 Dec;107(12):837-853. doi: 10.1002/cyto.a.70004.

Traceable Refractive Index Measurements of Liquids to Standardize Extracellular Vesicle Flow Cytometry.

Kuiper M, Koops R, Nieuwland R, van Leeuwen TG, van der Pol E.

Cytometry A. 2026 Feb 23. doi: 10.1002/cyto.a.70015.

CompensAID: An Automated Detection Tool for Reference Errors.

Olsman R, Bonte S, Hofmans M, Buysse M, Van der Borcht K, Saeys Y, van der Velden VHJ, Van Gassen S.

Cytometry A. 2026 Feb 23. doi: 10.1002/cyto.a.70016.

Imaging Flow Cytometry Detection of Cytogenetic Abnormalities in Circulating CD34⁺ Cells Predicts Leukemic Transformation in Myelofibrosis.

Hamilton RM, Collinson RJ, Hui HY, Ng ZY, Chuah HS, Webb M, Guo BB, Erber WN, Fuller KA.

Cytometry A. 2026 Feb 3. doi: 10.1002/cyto.a.70012.

Transparency and Reporting in the Evaluation of PD1 by Flow Cytometry.

Sorigue M, Salvia R, Petriz J.

Cytometry A. 2025 Nov;107(11):745-749. doi: 10.1002/cyto.a.24969. Epub 2025 Oct 16. PMID: 41099167 Review.

Matrix Recovery Algorithm for Reconstructing Mixing Matrices From Raw Observations and Ordinary Least Squares Unmixed Abundance Values.

Kmet R, Novo D.

Cytometry A. 2026 Jan;109(1):80-84. doi: 10.1002/cyto.a.70005.

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





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



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

