# RELAZIONE FINALE PROGETTO DI RICERCA

**Titolo del progetto:**

**PROGETTAZIONE E VALIDAZIONE DI UNA PROCEDURA MULTIPARAMETRICA PER L'ANALISI DELLE SOTTOPOPOLAZIONI DI LINFOCITI B DI INTERESSE NELLE PATOLOGIE DA DEFICIT IMMUNOLOGICI.**

**Titolare della Borsa di Studio: Dott.ssa Giada COCCHIARA**

**Introduzione.** Il processo di maturazione del sistema immunitario genera numerose popolazioni di linfociti che hanno la capacità di reagire in modo specifico agli stimoli antigenici e che si caratterizzano per l'espressione di diversi marcatori di superficie. Nel contesto dei linfociti B sono state identificate diverse popolazione cellulari che riassumono il processo maturativo e le cui relative proporzioni, pur variando in relazione alle differenti fasce di età, riflettono lo "stato di salute" del comparto B linfocitario. La riduzione o l'assenza di specifiche popolazioni di linfociti B è stata correlata ad un ampio spettro di immunodeficienze sia primitive, ad esempio l'immunodeficienza comune variabile (CVID), sia secondarie, ad esempio quelle correlate ad altre citopenie o a quelle di natura iatrogena.
L'approccio analitico più comunemente impiegato per lo studio di queste popolazioni cellulari è quello citofluorimetrico, il quale, tuttavia, è stato finora relativamente limitato dalla possibilità di analizzare contestualmente tutte le popolazioni cellulari di interesse, richiedendo l'allestimento di numerose marcature in parallelo da cui derivare in definitiva i diversi sottogruppi di cellule. L'attuale disponibilità di nuovi strumenti analitici in grado di analizzare contemporaneamente fino a 13 diversi marcatori è fondamentale per consentire il "subsetting" delle popolazioni linfocitarie mediante una singola miscela di anticorpi monoclonali.

**Materiali e Metodi.** I test sono stati eseguiti su 30 campioni di sangue venoso periferico di soggetti con assetto imunofenotipico "di base" normale, selezionati tra i campioni afferenti al Laboratorio di Immunopatologia dell'AO Ordine Mauriziano. I pazienti avevano tutti preso atto dell'informativa che prevede la possibilita di impiego, al termine dell'iter diagnostico, dei residui dei campioni ematici impiegati per altre indagini al fine di messa a punto di nuovi test diagnostici.
L'elenco completo degli anticorpi impiegati è riportato nella tabella 1

Tabella 1. Anticorpi monoclonali, relativi fluorocromi e quantità di anticorpo impiegati nello studio.

| Marker | Fluorochrome | Source | µL/test |
|---|---|---|---|
| CD5 | PC5.5 | Beckman Coulter | 3 |
| CD10 | APC-AF700 | Beckman Coulter | 3 |
| CD19 | ECD- | Beckman Coulter | 2 |
| CD20 | PerCP | Miltenyi Biotec | 2 |
| CD20 | PC5.5 | Beckman Coulter | 3 |
| CD20 | SNv605 | Beckman Coulter | 5 |
| CD21 | APC | Miltenyi Biotec | 5 |
| CD21 | PE | Beckman Coulter | 10 |
| CD24 | APC-AF750 | Beckman Coulter | 3 |
| CD24 | APC | Beckman Coulter | 5 |
| CD27 | PB | Miltenyi Biotec | 5 |
| CD27 | PC7 | Beckman Coulter | 5 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| CD38 | PC7 | Beckman Coulter | 5 |
| CD38 | BV786 | BD Biosciences | 5 |
| CD45 | KO | Beckman Coulter | 3 |
| CD200 | APC-AF750 | Beckman Coulter | 3 |
| IgD | FITC | Dako | 1 |
| IgM | PE | BioLegend | 3 |
| IgM | PB | Beckman Coulter | 5 |

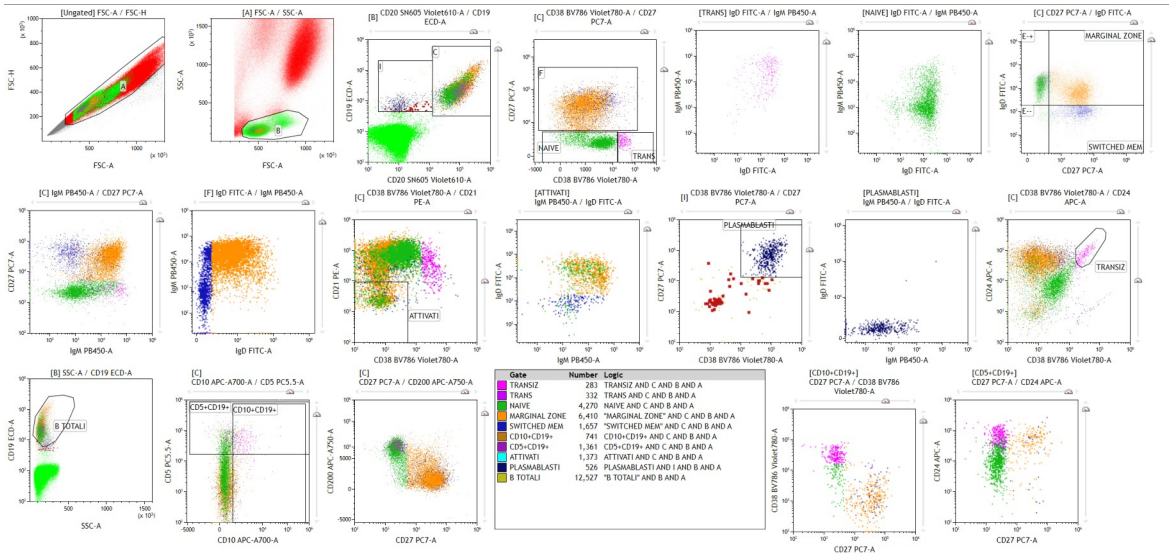
La messa a punto della miscela ottimale per l'identificazione e separazione delle diverse popolazioni di interesse è stata eseguita attraverso una serie di successivi "rounds" in cui le miscele di reazione erano costituite rispettivamente da 8, 9 e 12 anticorpi monoclonali come dscritto nella tabella 2.
Cento microlitri di sangue venoso periferico erano incubati con la miscela di anticorpi per 15 minuti a temperatura ambiente, i globuli rossi erano quindi lisati con 2 ml di soluzione lisante ($NH_4Cl$) per 10 minuti e quindi centrifugati a 400 xg per 5 minuti. Il fondello veniva risospeso in 3 ml di MACS buffer (PBS + 0.5% albumina bovina + EDTA 0.1M) e centrifugato a 400 xg per 5 minuti. Il fondello veniva risospeso in 0.6 ml di MACS buffer e immediatamente acquisito al citofluorimetro. Per ogni campione sono stati acquisiti 300.000-500.000 eventi totali. Il citofluorimetro impegato è un DxFLEX a 13 colori/15 parametri (Beckman Coulter) opportnamente calibrato secondo le indicazioni del produttore.
L'analisi è stata eseguita impegando il software Kaluza ver 2.1 (Bekman Coulter).

Tabella 2. Miscele di anticorpi monoclonali impiegate per l'identificazione della differenziazione e maturazione dei linfociti B del sangue periferico nei tre consecutivi "rounds". I colori nella prima riga della tabella identificano le tre linee laser (405 nm – violetto, 488 nm – blu, 633 nm - rosso) di eccitazione dei rispettivi fluorocromi.

| PB | KO | SN605 | BV786 | FITC | PE | ECD | PC5.5 | PC7 | APC | AF700 | AF750 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CD27 | CD45 | - | - | IgD | IgM | CD19 | CD20 | CD38 | CD21 | - | - |
| CD27 | CD45 | - | - | IgD | IgM | CD19 | CD20 | CD38 | CD21 | - | CD24 |
| IgM | CD45 | CD20 | CD38 | IgD | CD21 | CD19 | CD5 | CD27 | CD24 | CD10 | CD200 |

**Risultati.** La combinazione a 12 colori è risultata la piú informativa e grazie alle potenzialità offerte dalla strumentazione impiegata, consente un "subsetting" dei linfociti B estremamente articolato e riproducibile. Nella figura 1 è riportata la schermata di analisi caratteristica di un soggetto normale.

Figura 1. Schermata di analisi dei "subsets" di linfociti B in un soggetto normale. Le finestre analitiche A e B servono a isolare la popolazione dei mononucleati. Le finestre analitiche I e C identificano tutti i linfociti B (C) e la popolazione che contiene i plasmablasti (I) nelle successive finestre analitiche sono identificate i 5 principali subsets di linfociti B che si differenziano per lo stadio maturativo. TRANS e TRANSIZ: linfociti B transizionali, NAIVE: linfociti B naive, MARGINAL ZONE: linfociti B memoria della zona marginale IgM+, SWITCHED MEM: linfociti B memoria IgM-IgD- (switched), ATTIVATI: linfociti B attivati, PLASMABLASTI. Sono inoltre identificabili i linfociti B CD5+ e CD10+, questi ultimi comprendenti sia una quota di elementi transizionali (immaturi) sia una quota di elementi maturi riferibile a linfociti B del centro germinativo.




**Conclusioni.** La possibilità di creare delle miscele di anticorpi monoclonali che consentono l'identificazione in un singolo esame di tutte le popolazioni cellulari di interesse è un elemento chiave per ottenere un quadro completo e dettagliato del processo di maturazione e di differenziazione dei linfociti B circolanti che si riflette positivamente sulla valenza clinica dell'esame stesso. La disponibilità di un test analitico rapido ed altamente efficace per l'analisi dei "subsets" linfocitari B consentirà di migliorare la qualità dell'analisi per le patologie da immunodeficienza primitiva e secondaria, soprattutto nel caso di indagini da svolgersi in età pediatrica, ove il quantitativo di campione disponibile è sempre limitato. Inoltre, la possibilità di identificare un maggior numero di popolazioni cellulari in un singolo esame puó permettere una migliore conoscenza dell'assetto immunitario anche in soggetti in situazioni in cui sia coinvolta la risposta immune di tipo umorale quali ad esempio la ricostituzione B cellulare post trattamento con anticorpi monoclonali.

Referenze bibliografiche

Wehr C. et al. Blood. 2008: 111, 77-85.
Morbach H. et al. Clin Exp Immunol. 2010. 162: 271-279.
Piatosa B. et al. Cytometry Part B. 2010. 78B: 372-381.
Wienholt L. et al. Pathology. 2019. 51:640-641.