

Università degli Studi di Napoli
"Federico II"

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in
Morfologia Clinica e Patologica
(XIX ciclo)

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani



Tesi di Dottorato di Ricerca

Diagnostica combinata dei disordini
linfoproliferativi con istopatologia,
immunoistochimica e citofluorimetria

Relatore
Prof. Guido Pettinato

Candidato
Dr. Giuseppe Ciancia

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

<i>Frontespizio</i>	pag. 1
<i>Indice</i>	pag. 2
1. La linfadenomegalia (LADM)	pag. 4
Definizione	pag. 4
Etiologia	pag. 4
Approccio e diagnosi differenziale	pag. 4
- Fase clinica	pag. 4
- Indagini di laboratorio ed esami strumentali	pag. 5
L'indirizzo biotico	pag. 6
Il ruolo dell'agoaspirato per ago sottile (FNAC) ecoguidato	pag. 7
FNAC quale indicatore di malignità	pag. 7
FNAC ed indagine integrata	pag. 8
Tabella 1	pag. 10
2. La linfadenomegalia nei disordini linfoproliferativi	pag. 11
Definizione e classificazione delle sindromi linfoproliferative (SLP)	pag. 11
Cenni per SLP che possono presentare LADM: loro definizione, epidemiologia, classificazione, clinica e laboratorio	pag. 11
Leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti	pag. 11
Leucemia linfatica acuta	pag. 12
Macroglobulinemia di Waldenstrom	pag. 13
I linfomi: loro definizione, epidemiologia, classificazione, clinica, immunofenotipo, genetica, laboratorio e stadiazione	pag. 14
Il linfoma di Hodgkin	pag. 14
I linfomi non Hodgkin	pag. 16
Tabella 2	pag. 18
3. Un mezzo diagnostico innovativo: la Citofluorimetria su tessuto	pag. 22
Il costruttivo apporto di nuove metodiche	pag. 22
Definizione e cenni di tecnica della Citofluorimetria a flusso (FCM)	pag. 23
La FCM nelle SLP	pag. 25
Cenni storici	pag. 25
Le applicazioni	pag. 25
Pro e contro rispetto l'approccio morfologico	pag. 28
Immunoistochimica	pag. 28
Citofluorimetria su tessuto	pag. 29
Vantaggi e svantaggi di ciascuna tecnica	pag. 30
Tabella 3	pag. 33
Lo stato dell'arte	pag. 34
Tabella 4	pag. 35

4. Scopi del lavoro	pag. 36
5. Materiali e metodi	pag. 37
I pazienti ed i criteri di arruolamento	pag. 37
Le biopsie	pag. 38
L'iter del campione bioptico	pag. 39
Le procedure in Anatomia Patologica	pag. 40
Tabella 5	pag. 42
Le procedure in Citofluorimetria	pag. 43
Tabella 6	pag. 45
La diagnosi definitiva	pag. 46
Figure 1-6	pag. 47
6. Risultati	pag. 50
Le diagnosi per ciascuna metodica	pag. 50
Correlazioni sul riscontro di patologia benigna o neoplastica	pag. 51
Risultati per tipo di biopsia	pag. 52
Tabelle 7-10	pag. 55
Figure 7-12	pag. 61
7. Discussioni	pag. 67
8. Conclusioni	pag. 73
9. Bibliografia	pag. 75

INTRODUZIONE

Capitolo 1 - LA LINFOADENOMEGALIA

Definizione

La linfadenomegalia (LADM) è l'ingrandimento di una stazione linfonodale.

Normalmente i linfonodi superficiali non sono palpabili; privo di significato patologico è il rinvenimento in bambini e giovani adulti di linfonodi sottomandibolari, laterocervicali od inguinali morbidi e piatti, con diametro inferiore ad 1 cm.

La comparsa di LADM con caratteristiche parenchimatose diverse (durezza) o con diametro superiore ai 2 cm richiede approfondimento mirato⁵².

Eziologia

La LADM è solitamente si può osservare in molte malattie: infezioni (batteriche, virali, fungine e parassitarie), immunologiche (artrite reumatoide, LES, connettiviti), neoplasie ematologiche (sindromi linfoproliferative), metastasi da tumori solidi ed altre patologie, tra le quali più frequente è la sarcoidosi. Nella pratica medica la LADM è causata maggiormente da malattie virali o batteriche; in meno dell'uno per cento vi è una patologia maligna⁵².

Approccio e diagnosi differenziale

L'approccio al paziente con LADM prevede una fase clinica, una laboratoristica ed una strumentale.

Fase clinica

Si avvale di un'attenta anamnesi (curando bene sintomi sistemici, pregressi episodi infettivi, convivenza con animali domestici, abitudini sessuali) e di un accurato esame obiettivo.

Di una LADM (localizzata o con coinvolgimento di più sedi non contigue) sono da valutare: dimensioni, consistenza, dolorabilità, mobilità ed eventuale concomitante splenomegalia.

La consistenza e la dolorabilità sono elementi molto importanti da acquisire; infatti, linfonodi morbidi possono essere benigni; duri e fissi sui piani adiacenti sono suggestivi di malignità.

La dolorabilità si riscontra quando la capsula è stirata da un rapido accrescimento, in genere secondaria a un processo infiammatorio e raramente a sindromi linfoproliferative.

Indagini di laboratorio ed esami strumentali

Molti pazienti con LADM non necessitano di alcun approfondimento: se l'anamnesi e l'esame obiettivo indicano una causa benigna di LADM si ricorre ad un attento monitoraggio con intervallo variabile da 2 a 4 settimane (breve follow-up); il paziente è invitato a tornare, per una rivalutazione più precoce, in presenza di un aumento di dimensioni.

Gli antibiotici non sono indicati in caso di LADM a meno che non vi siano evidenze di infezione batterica; l'uso di corticosteroidi va inibito poiché l'effetto linfocitolitico può mascherare la diagnosi di una sindrome linfoproliferativa.

Le indagini di approfondimento comprendono:

❖ Esami bio-umorali:

- emocromo con formula leucocitaria e valutazione dello striscio di sangue periferico al microscopio ottico;
- routine laboratoristica di base (con LDH e QPE);
- sierologia per le infezioni da EBV, CMV, Toxoplasma ed HIV;
- VES, PCR e β -2-microglobulina.

❖ Esami strumentali:

- radiografia del torace;

- ecografia linfonodale per le stazioni superficiali;
- ecografia di addome e pelvi;
- TC-PET total body nelle forme dubbie o per positività dell'ecografia linfonodale o della radiografia del torace.

L'indirizzo bioptico

Elemento chiave di un iter diagnostico della LADM è nella decisione di eseguire o meno una biopsia escissionale del linfonodo sospetto.

Tale procedura è oggi fortemente orientata dall'ecografia e dall'eventuale agoaspirato per ago sottile (FNAC) sotto guida ultrasonografica.

Infatti, Picardi et al. Hanno dimostrato come la selezione mediante ecografia specialistica dei linfonodi da biopsizzare, oltre a ridurre le complicanze dell'atto chirurgico, aumenti significativamente (87% vs 64%) la percentuale di diagnosi istologica di patologia maligna rispetto alle procedure standard di biopsia.¹

Sono stati elaborati algoritmi in grado di identificare più precisamente quei pazienti con LADM che dovrebbero sottoporsi a biopsia. In uno studio sono stati valutati 123 pazienti dai 9 ai 25 anni sottoposti a biopsia linfonodale. Sono state identificate tre variabili che predicono quali pazienti con LADM periferica debbano essere sottoposti a biopsia: un linfonodo con diametro superiore a 2 cm e una radiografia del torace con reperti anomali hanno un valore predittivo positivo, mentre sintomi recenti relativi a infezioni di orecchie, naso e gola hanno un valore predittivo negativo.²⁻³ Un altro studio relativo a 220 pazienti con LADM ha identificato cinque variabili: dimensioni del linfonodo, localizzazione (sopraclaveare o non sopraclaveare), età (maggiore o minore di 40 anni), consistenza e dolorabilità. Esse possono essere utilizzate in un modello matematico per identificare i pazienti candidabili alla biopsia.²⁻³

Nel 10-15% dei casi anche la biopsia può non essere diagnostica; in tali casi vi è indicazione ad un monitoraggio più stretto ed a ripetere la biopsia a distanza di breve tempo⁵³.

Il ruolo del FNAC ecoguidato

Da parecchi anni è andato affermandosi sempre più nella diagnosi avanzata della LADM la tecnica del FNAC, eventualmente ecoguidato e integrato da tecniche ancillari quali citofluorimetria a flusso (FCM) e citogenetica. Sono numerosi gli studi che dimostrano come essa sia una procedura semplice, veloce, economica e soprattutto affidabile.^{4-8, 16-19}

FNAC quale indicatore di malignità

Inizialmente il ruolo di questa metodica era volto a discriminare tra benignità e malignità.

Nel 1998, Jeffers et al. Indicavano che "sebbene la biopsia escissionale e l'esame istologico rimangono il gold standard per la diagnosi e la classificazione dei linfomi non Hodgkin (LNH), il FNAC con analisi della clonalità ed immunofenotipizzazione con FCM è utile per distinguere popolazioni reattive da quelle neoplastiche e facilitare la classificazione dei linfomi".⁵

In uno studio retrospettivo su 196 FNAC corredati da FCM aventi come riferimento l'outcome clinico e istologico, il FNAC si è rivelato come una metodica con sensibilità del 93%, incidenza di falsi negativi dello 0% e un valore predittivo positivo per malignità del 100%.⁶

Su 290 aspirati valutati al microscopio ed al citofluorimetro, si sono dimostrate una sensibilità e una specificità pari rispettivamente al 95% e all'85% quando le diagnosi suggestive di linfoma sono state considerate

positive; la specificità è stata del 100% quando sono state considerate solo le diagnosi definitive di linfoma.⁷

FNAC ed indagine integrata

Nel 1999 con il lavoro di Ravinsky si focalizza l'attenzione sulla possibilità che la associazione FNAC-FCM possa determinare una sottoclassificazione dei LNH. Di 41 aspirati esaminati per morfologia e immunofenotipo, 11 dei 12 casi definiti reattivi sono stati confermati dal follow-up clinico ed istologico, mentre uno si è rivelato essere una sindrome linfoproliferativa; tutti i 25 casi con diagnosi di linfoma sono stati confermati e per solo 3 di essi l'esame istologico ha modificato la classificazione fatta dal citopatologo con il citofluorimetrista; dei 4 casi non conclusivi al FNAC+FCM, infine, 2 si sono rivelati linfomi e 2 iperplasie reattive.⁸

Nelle precedenti classificazioni dei LNH⁹⁻¹² il quadro istologico era una componente essenziale; non era quindi ipotizzabile un approccio diagnostico definitivo basato unicamente su una metodica citologica qual è il FNAC. La più recente classificazione Revised European-American Lymphoma/World Health Organization (REAL/WHO)¹³⁻¹⁵ pone meno enfasi sull'istologia (tranne che per rari casi) ed incrementa l'attenzione su criteri clinici, citologici, immunofenotipici e citogenetica, ed è così che diagnosi e classificazione con FNAC sono considerate possibili, particolarmente quando accompagnate dai dati immunofenotipici.

Prova ne è uno studio in cui una prima diagnosi di LNH basata su 74 FNAC con FCM è stata seguita a breve da una biopsia chirurgica di conferma quale gold standard. La diagnosi di linfoma è stata confermata in tutti i casi e la classificazione dopo FNAC da solo si è rivelata corretta in 47 casi su 74 (63%); questa percentuale è diventata più alta (84%) nei casi in cui si è associata anche la FCM.¹⁶

Questo contributo della FCM è stato confermato da uno studio condotto su 55 pazienti con storia di LNH e lesioni sospette

per recidiva, ai quali è stato praticato FNAC con studio immunocitochimico, citomorfológico e citofluorimetrico, dalla cui integrazione, unitamente alla biopsia chirurgica nei casi discordanti, è stata pronunciata la diagnosi definitiva. L'immunocitochimica ha identificato il 58%, la citomorfológica il 77% e la FCM il 100% delle recidive.¹⁷

Un altro lavoro del 2004 è relativo a 307 FNAC correati da FCM, praticati su tessuti sospetti per lesioni linfoproliferative: relativamente alla natura della proliferazione (LNH verso iperplasia reattiva) la sensibilità è stata del 93% e la specificità del 100%; riguardo invece la classificazione dei LNH a piccole e medie cellule questi due parametri sono stati rispettivamente del 63% e dell'88%.¹⁸

Essendosi ormai affermata la possibilità di sottoclassificare i linfomi con tecniche citologiche, Dong et al. Hanno dimostrato come l'accuratezza diagnostica dell'associazione FNAC-FCM vari fra i vari sottotipi.

Essa è:

- a) migliore per linfoma a piccoli linfociti/leucemia linfatica cronica, linfoma linfoblastico, linfoma di Burkitt, linfoma mantellare, linfoma follicolare e plasmocitoma;
- b) minore per linfoma della zona marginale e linfoma diffuso a grandi cellule B;
- c) scarsa per il linfoma di Hodgkin (LH), per il quale la FCM rimane una tecnica ancora "cieca".¹⁹

Discorso a parte meritano infine bambini ed adolescenti, nei quali, sebbene l'associazione di citologia e FCM aumenti l'accuratezza diagnostica, quest'ultima può essere evitata nella maggior parte dei casi basati sulla sola diagnosi citomorfológica per il fatto che la prevalenza dei LNH nei bambini è molto minore che negli adulti; in genere sono forme diffuse ed aggressive (linfoma di Burkitt, linfoblastico, a grandi cellule, ecc.) che possono essere prontamente diagnosticate con FNAC con o senza FCM.²⁰

Tabella 1. Sintesi di alcuni dei lavori citati nel paragrafo

Bib.	Autore	Anno	Casi	Metodica	Sensibilità per LNH	Specificità per LNH	Corretta class.ne REAL/WHO ¹³⁻¹⁵
5	Jeffers	1998	46	FNAC+FCM	18/21 (86%)	25/25 (100%)	Non valutata
6	Zardawi	1998	196	FNAC+FCM	109/117 (93%)	78/79 (99%)	Non valutata
8	Ravinsky	1999	41	FNAC+FCM	25/28 (89%)	13/13 (100%)	22/25 (88%)
7	Meda	2000	290	FNAC+FCM	95%	100%	Non valutata
19	Dong	2001	139	FNAC+FCM (FCM praticata in 105/139 casi)	* 93/139 (67%) (globale) 80/105 (77%) (nei casi con FCM)	Non applicabile	77%
16	Mouraud	2003	74	FNAC+FCM (FCM praticata in 53/74 casi)	74/74 (100%)	Non applicabile	63% (globale) 84% (casi con FCM) 33% (casi senza FCM)
17	Picardi	2003	55	FNAC e FCM praticate separatamente	40/52 (77%) (con il solo FNAC) 52/52 (100%) (con la sola FCM)	3/3 (100%) (sia per il solo FNAC che per la sola FCM)	44/52 (85%) con la sola FCM
18	Zeppa	2004	307	FNAC+FCM	93%	100%	63% (relativamente ai soli LNH a piccole e medie cellule)

- comprende 16 casi di linfoma di Hodgkin, quindi la sensibilità è da intendersi *per linfoma* e non *per LNH*

Legenda:

LNH: linfoma non Hodgkin

FNAC: agoaspirato per ago sottile

FCM: citofluorimetria

Capitolo 2 - LA LINFOADENOMEGALIA NELLE SINDROMI LINFOPROLIFERATIVE

Definizione e classificazione delle sindromi

linfoproliferative

Le sindromi linfoproliferative (SLP) sono neoplasie delle cellule linfoidi. Esse originano dalle cellule del sistema immunitario in diversi stadi di differenziazione, con il risultato di un'ampia gamma di aspetti morfologici, immunologici e clinici. Alcune forme si manifestano quasi sempre in forma leucemica (interessamento primitivo del midollo osseo e del sangue) ed altre quasi sempre in forma di linfoma (tumori solidi del sistema immunitario); altre ancora in forma sia di linfoma che di leucemia, potendo inoltre verificarsi un cambiamento del pattern clinico durante il decorso della stessa malattia.

La suddivisione più importante da praticare nell'ambito delle SLP è quella in acute e croniche, essendo la differenza principale costituita dal grado di differenziazione (basso nelle prime ed avanzato nelle seconde) del clone cellulare neoplastico.

La più recente classificazione dei tumori linfatici dell'OMS le suddivide in tre grandi categorie: a cellule B, a cellule T e malattia di Hodgkin.¹³⁻¹⁵

Si accennerà ad alcune forme di SLP che possono presentarsi con LADM, dando poi maggiore spazio ai linfomi, al centro del nostro lavoro.

Cenni per SLP che possono presentare LADM: loro definizione, epidemiologia, classificazione, clinica e laboratorio

- **La leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti**

Definizione ed epidemiologia

In assoluto la più frequente tra le leucemie, la leucemia linfatica cronica (LLC)/linfoma a piccoli linfociti è quasi

sempre con fenotipo B e raramente T. La malattia predilige il sesso maschile e l'età avanzata.

Clinica

Spesso asintomatica, la malattia può presentarsi con occasionale affaticabilità e sudorazioni notturne; la **LADM** è, in genere, grossolana e non dolente.

Laboratorio

Il quadro ematologico periferico mostra linfocitosi assoluta; allo striscio sono presenti linfociti ad abito maturo e le caratteristiche ombre di Gümprrecht (residui nucleari delle cellule patologiche). In relazione allo stadio può esservi anemia e piastrinopenia. Il midollo osseo è coinvolto, con l'espansione del clone in grado variabile. Alla FCM, il clone risulta debolmente positivo per le immunoglobuline di membrana (sIg) e positivo per gli antigeni delle cellule B (CD 19, CD20, CD23, CD24) e per il CD5, oltre che per le catene k o λ.

- **La leucemia linfatica acuta**

Definizione ed epidemiologia

La leucemia linfatica acuta (LAL) è un disordine clonale neoplastico originante da progenitori linfoidei, prevalentemente di tipo B, nel midollo osseo, nel timo e nei linfonodi. E' la leucemia più frequente dell'infanzia; oltre a questa fascia d'età predilige soggetti di età avanzata (Hoffmann, Hematology, Churchill Livingstone Editore, New York, 2002).

Classificazione

La classificazione French-American-British (FAB) distingue tre gruppi di LAL (L1, L2 e L3) in base alle caratteristiche morfologiche degli elementi leucemici.²¹

Clinica

Le manifestazioni prevalenti sono astenia, pallore, tachicardia, infezioni e manifestazioni emorragiche. Il 50% circa dei pazienti manifesta LADM e splenomegalia. Non sono

rare le localizzazioni testicolare e cerebrale (Hoffmann, Hematology, Churchill Livingstone Editore, New York, 2002).

Laboratorio

Il quadro ematologico mostra anemia, leucocitosi con presenza di blasti leucemici, neutropenia e piastrinopenia. Il midollo osseo è ipercellulato ed infiltrato da una percentuale variabile di cellule leucemiche. L'immunofenotipizzazione consente la suddivisione delle LAL in LLA-B (pro B, pre B, B comune, e B matura) e LLA-T (pre T e T comune).²²

• **La macroglobulinemia di Waldenstrom**

Definizione ed epidemiologia

La macroglobulinemia di Waldenstrom (MW) si caratterizza per la presenza di una componente monoclonale sierica di tipo IgM. La sottostante proliferazione linfoide coinvolge il midollo osseo e gli organi linfoidi periferici, prevalendo una splenomegalia di grado variabile. La malattia colpisce preferenzialmente i maschi nell'età avanzata (Hoffmann, Hematology, Churchill Livingstone Editore, New York, 2002).

Clinica

La LADM con epatosplenomegalia si riscontra in circa la metà dei pazienti. Quando presenti, i principali sintomi sono rappresentati da astenia, dispnea da sforzo e raramente diatesi emorragica. Può inoltre osservarsi una sindrome da iperviscosità⁵⁴.

Laboratorio

L'aumento monoclonale delle IgM è spesso accompagnato da anemia; allo striscio di sangue periferico vi è impilamento delle emazie. L'aumento di linfociti nel midollo osseo è variabile. L'immunofenotipizzazione dimostra la clonalità della proliferazione, documentando la restrizione per una catena leggera; essa attesta la natura B-linfocitaria delle cellule neoplastiche con la positività per CD19, CD20 ed sIg (Hoffmann, Hematology, Churchill Livingstone Editore, New York, 2002).

I linfomi: loro definizione, epidemiologia, classificazione, clinica, immunofenotipo, genetica, laboratorio e stadiazione

1. I linfomi di Hodgkin

Definizione

Il LH è un linfoma maligno contrassegnato dalla presenza di cellule caratteristiche (dette di *Reed-Sternberg* - RS).

Epidemiologia

Il LH rappresenta il 25% circa di tutti i linfomi e l'1% di tutte le neoplasie maligne dell'adulto. Vi sono due picchi d'incidenza: del giovane adulto (20-30 anni) e dell'anziano (più di 60 anni); è più frequente nel maschio.²³

Classificazione

La più recente è la REAL:^{13-15, 24}

- LH a predominanza linfocitaria nodulare (caratterizzato dalla presenza di una variante della cellula RS, detta cellula *lymphocytic/histiocytic* - *L&H*)
- LH classico: - sclerosi nodulare
 - cellularità mista
 - deplezione linfocitaria
 - *lymphocyte rich*

Clinica

L'esordio della malattia è contrassegnato dalla comparsa di manifestazioni legate all'interessamento linfonodale (70% laterocervicale, 20% ascellare e 10% inguinale) o d'organo (milza 13%, fegato 10%, polmone 6%, scheletro 5%, altre sedi 10%).

Vi possono essere inoltre manifestazioni sistemiche quali febbre, sudorazione notturna, perdita di peso (cosiddetti sintomi dello stadio B), astenia e prurito.

Laboratorio

Esami bioumorali

Nelle fasi attive di malattia può esservi anemia, a volte associata a modeste leucocitosi e piastrinosi. Principali alterazioni, incostantemente presenti, sono: VES elevata,

iperfibrinogenemia, iper- α 2-globulinemia, iposideremia ed iperuricemia.

Midollo osseo

Il coinvolgimento midollare è in funzione dello stadio e del quadro istologico (è raro nella forma a prevalenza linfocitaria, più frequente in quella a deplezione linfocitaria).

Biopsia linfonodale

La biopsia linfonodale, da praticare sempre nel sospetto di LH, è l'esame diagnostico. Il FNAC, meglio se ecoguidato, non permette una diagnosi definitiva di LH. Da uno studio del 2001 è infatti emersa una sensibilità della metodica per il LH pari solo al 44%.¹⁹

Citogenetica

Tecnicamente non agevole da praticare nel LH, l'analisi cromosomica su tessuto linfonodale, midollo osseo quando coinvolto, o parenchima invasivo, mostra in circa due terzi dei pazienti aberrazioni principalmente quantitative (iperdiploidia).²⁵

Immunofenotipo

Le cellule RS e le loro varianti mononucleate esprimono molto spesso gli antigeni CD15, CD30 e CD70, mentre in genere non esprimono il CD45 e l'antigene epiteliale EMA (*Epithelial Membrane Antigen*). Per tutti questi antigeni l'esatto contrario avviene nella cellula L&H. Entrambe le forme esprimono il CD40.

Malgrado le numerose informazioni sul fenotipo della cellula RS, la maggior parte dei casi di LH studiati con FCM mostra solo un quadro policlonale con abbondanza di marcatori di cellule T, principalmente CD4. Nel LH solo meno dell'1% delle cellule presenti sono neoplastiche; la maggioranza delle cellule è costituita da cellule infiammatorie non maligne e la FCM mostra un aspecifico *pattern* reattivo.²⁶

Stadiazione

La stadiazione si avvale, oltre che di un accurato esame obiettivo, di esami radiologici (radiografia del torace, TAC-

PET total body) e biotici (biopsia linfonodale, del midollo osseo e di sedi extranodali sospette).

La stadiazione di Ann Arbor²⁷, valida anche per i linfomi non Hodgkin, è la seguente:

- Stadio I: una singola regione linfonodale o extralinfonodale;
- Stadio II: due o più regioni linfonodali situate dallo stesso lato del diaframma, oppure una sede extralinfonodale e una o più regioni linfonodali poste dallo stesso lato del diaframma;
- Stadio III: più regioni linfonodali situate da entrambi i lati del diaframma;
- Stadio IV: interessamento diffuso o disseminato di una o più sedi extralinfonodali con o senza compromissione linfonodale.

Le lettere A e B dopo lo stadio indicano se sono rispettivamente assenti o presenti i seguenti sintomi: febbre, sudorazione notturna e perdita di peso (almeno il 10% negli ultimi 6 mesi).

2. I linfomi non Hodgkin

Definizione

I LNH derivano da cloni neoplastici di linfociti B o T. In circa il 30% dei casi vi è leucemizzazione.

Epidemiologia

I LNH rappresentano circa il 3-5% di tutte le neoplasie maligne ed il 75% di tutti i linfomi. L'incidenza è in progressivo aumento nei paesi occidentali a sviluppo industriale (si pensa per l'aumento dell'incidenza dell'infezione da HIV e dell'esposizione ad agenti ambientali chimici nocivi) ed aumenta con l'età, anche se soggetti in età giovanile e puberale risultano colpiti con discreta frequenza.²⁸

Fattori di rischio per LNH sono l'età avanzata, il sesso maschile, la razza bianca, un'anamnesi familiare positiva per malattie linfoproliferative, l'esposizione a forti dosi di

radiazioni, patologie primitive e secondarie del sistema immunitario, alcune infezioni (da HIV, EBV, HTLV, HCV, Helicobacter Pylori, oculare da Chlamydia Trachomatis) ed alcuni farmaci (principalmente immunosoppressori e chemioterapici).²⁸

Classificazione

Se le vecchie classificazioni di Rappaport (1966)⁹, Lukes e Collins (1974)¹⁰, Kiel (1978)¹¹ e Working Formulation (1980)¹², pur fondamentali, hanno oramai solo valore storico,²⁹ la moderna nomenclatura dei LNH si basa sulla classificazione REAL (1991) e sulla sua revisione approvata dalla WHO nel 1997.¹³⁻¹⁵ Queste ultime due versioni, integrando studi di ordine istopatologico, immunofenotipico, citogenetico e biomolecolare, hanno suddiviso le SLP in tumori a cellule B (80-85%) e a cellule T-NK (15-20%), e ciascuna di queste due classi in neoplasie da precursori e da cellule mature.¹³⁻¹⁵

Immunofenotipo e genetica

Nella tabella 2 sono schematizzate le principali caratteristiche immunofenotipiche (le più rilevanti ai fini del nostro studio), citogenetiche e molecolari dei LNH, classificati secondo i criteri REAL/WHO.¹³⁻¹⁵

Tabella 2. Classificazione REAL/WHO dei LNH; correlazione tra entità anatomopatologiche, caratteristiche immunofenotipiche e genetiche^{13-15, 26, 30}

<i>Istotipo</i>	<i>Immunofenotipo</i>	<i>Anomalie genetiche specifiche</i>
Neoplasie da precursori delle cellule B		
Linfoma (L.) linfoblastico	CD19+, CD22+, CD10+, CD34+, TdT+, CD79a+, sIg e cIg-	No
Neoplasie a cellule B mature		
L. a piccoli linfociti	CD5+, CD19+, CD20+, CD23+, CD79a+, CD22+/-, CD24+, sIg+ (debole), CD10-, CD11c-	Alcuni casi con trisomia 12
L. linfoplasmocitico	sIg+, cIg+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD25+/-, CD11c+/-, CD10-, CD5-	No
Leucemia a cellule capellute	CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD11c+, CD25+, CD103+, sIg+, CD5-, CD23-, CD10-	No
L. marginale tipo MALT	CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD23-, CD11c-/+ , sIg+, cIg+/-	Molti casi con t(11;18); alcuni trisomia del 3
Plasmocitoma	cIg+, sIg-, CD19-, CD20-, CD22-, CD79a+/-, CD45-/+ , CD38+, EMA +/-, CD56+/-, CD43+/-	In alcuni casi t(11,14)
L. follicolare	sIg+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD10+/-, CD5-, CD23-, CD43-, CD11c-, BCL-2+	Nella maggior parte dei casi t(14;18) con riarrangiamento di bcl-2
L. mantellare	CD19+, CD20+, CD79a+, CD5+, CD22+, CD43+, CD11c-, CD23-, CD10-/+ , sIg+	t(11;14) con riarrangiamento di bcl-1
L. diffuso a grandi cellule	CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD45+/-, CD10-/+ , CD5-/+ , sIg+/-, CD38+, CD71+, HLA-DR+	t(14;18) in circa il 30% dei casi; bcl-6 riarrangiato (40%) o mutato (60%)
L. di Burkitt	sIgM+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD24+, CD10+, TdT+/-, CD5-, CD23-, Ki-67+	Una tra t(2;8), t(8;14) o t(8;22), con riarrangiamento di c-myc
L. B ad alto grado simil-Burkitt	CD19+, CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, sIg+/-, cIg-/+	bcl-2 riarrangiato in circa il 30-50% dei casi

Legenda:

LNH: linfoma non Hodgkin

TdT: desossittransferasi terminale

sIg: immunoglobuline di superficie

cIg: immunoglobuline citoplasmatiche

EMA: Antigene epiteliale di membrana

(continua)

Tabella 2. Classificazione REAL/WHO dei LNH; correlazione tra entità anatomopatologiche, caratteristiche immunofenotipiche e genetiche^{13-15, 26, 30}

(continua da pagina precedente)

<i>Istotipo</i>	<i>Immunofenotipo</i>	<i>Anomalie genetiche specifiche</i>
Neoplasie da precursori delle cellule T		
L. linfoblastico	CD1a+/-, CD2+, CD3 +/-, CD7+, TdT+, CD34-/+ , CD79a-, TcR+, CD4 e CD8-	In circa il 25% dei casi riarrangiamento scl/tal-1
Neoplasie a cellule T mature		
L. a piccoli linfociti	CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, CD4+, CD8-/+	In circa il 75% dei casi inv (14)
Micosi fungoide/ sindrome Sézary	CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD7-, CD8-, CD25-	No
L. T periferico	CD2+/-, CD3+/-, CD5+/-, CD7-/+ , CD4+	No
L. a cellule T dell'adulto	CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD25+, CD7-	HTLV-1 integrato nel genoma
L. angioimmuno-blastico	CD2+, CD3+, CD4+, TcR+	No
L. angiocentrico	CD2+, CD56+, CD3-/+ , CD5+/-, CD7+/-, CD4 o CD8+	No
L. T intestinale	CD3+, CD7+, CD8+/-, CD103+, TcR+	No
L. anaplastico a grandi cellule	CD30+, CD45+/-, CD25+/-, EMA+/-, CD15-/+ , CD3-/+ , CD43-/+ , ALK+/-	La maggior parte presenta t(2;5) con fusione alk/npm

Legenda:

LNH: linfoma non Hodgkin

TdT: desossittransferasi terminale

TcR: *T cell receptor*

EMA: Antigene epiteliale di membrana

(fine)

Clinica

Il quadro clinico d'esordio è rappresentato da linfadenomegalie (60-90% dei casi) non dolenti, uniche o multiple, talora associate ad epatosplenomegalia (20%). La linfadenomegalia del mediastino può determinare una sindrome mediastinica.

La presenza di cellule linfomatose nel midollo osseo e in circolo in percentuale significativa (>10%) è frequente nella variante linfoblastica e in quella follicolare, mentre negli altri istotipi può verificarsi solo in fasi avanzate.

Altre localizzazioni di frequente osservazione sono rappresentate da stomaco (lesioni ulcerose o noduli vegetanti), intestino tenue (zone di irrigidimento fino a stenosi della parete, associate a sintomi di malassorbimento), sierose, ossa (lesioni litiche), meningi, cute, testicolo e sistema nervoso.

I sintomi sistemici quali astenia, calo ponderale e febbre sono più frequenti nei linfomi ad alto grado di malignità.

Laboratorio

- **Quadro ematologico periferico**

I reperti sono sempre aspecifici; in meno della metà dei casi vi è lieve anemia e neutrofilia. Occasionalmente sono presenti linfociti atipici in circolo.

- **Esami ematochimici**

Le fasi di attività della malattia sono in genere contrassegnate da incrementi dei livelli sierici di β -2-microglobulina, LDH ed acido urico, così come aumentate sono

VES, PCR, fibrinogeno ed α -2-globuline; la sideremia è ridotta.

- **Biopsia linfonodale e immunofenotipizzazione**

Sono fondamentali per la diagnosi; si rimanda alla tabella 2 (pagg. 18-19), per la descrizione immunofenotipica.

- **Citogenetica**

Sono numerose le alterazioni cromosomiche dei LNH, e si rimanda alla tabella 2, (pagg 18-19).

- **Midollo osseo**

Sia l'agoaspirato che la biopsia osteomidollare possono evidenziare infiltrazione midollare con frequenza variabile da un istotipo all'altro; è più frequente nei linfomi follicolare e linfoblastico.

Stadiazione

La stadiazione si avvale di un accurato esame obiettivo, di esami radiologici, inclusa la TAC-PET total body, e biopsici. E' inoltre indispensabile effettuare la biopsia ossea.

La stadiazione più utilizzata è quella di Ann Arbor,²⁷ per la quale si rimanda al capitolo sul linfoma di Hodgkin (pag.19). Circa il 10% dei pazienti esordisce in stadio I, mentre il 70-80% viene diagnosticato in stadio III e IV.

Capitolo 3 - UN MEZZO DIAGNOSTICO INNOVATIVO: LA CITFLUORIMETRIA SU TESSUTO

Il costruttivo apporto di nuove metodiche

Fino a pochi anni fa, la caratterizzazione delle SLP era essenzialmente descrittiva e basata sulla osservazione microscopica. Questo approccio, valido nella maggior parte dei casi, è in altri limitato poiché l'identità delle cellule neoplastiche non può essere sempre stabilita, né può essere riconosciuta la natura clonale della loro proliferazione.

Termini descrittivi come "grande", "piccolo", "follicolare", "diffuso", "anaplastico", "plasmocitico", ecc., che erano prevalenti nelle precedenti classificazioni delle SLP,⁹⁻¹² sono ancora utilizzati nella moderna tassonomia della REAL/WHO,¹³⁻¹⁵ ma vanno sempre più integrandosi e completandosi con informazioni riguardanti altre significative proprietà biologiche quali quelle immunofenotipiche, citogenetiche e molecolari.³¹

Ne deriva che la recente classificazione della REAL/WHO¹³⁻¹⁵ dei linfomi si basa su una costellazione di caratteristiche cliniche, morfologiche, fenotipiche e genetiche.¹⁶

Pertanto diventano sempre più indispensabili per una corretta diagnosi tecniche ancillari come la citogenetica, la biologia molecolare e la citofluorimetria.

Di quest'ultima, nota anche come citometria a flusso con anticorpi fluorescenti, ci occuperemo nel nostro lavoro.

Definizione e cenni di tecnica della citofluorimetria a flusso

La citometria a flusso (FCM) è una tecnica di misura automatica di particelle microscopiche, ed in particolare di cellule.

Si basa sull'uso di un laser come sorgente di eccitazione della fluorescenza e sulla possibilità di separare le popolazioni cellulari sulla base delle loro caratteristiche fisiche, in particolare dimensioni cellulari e granulosità citoplasmatica. Una cellula, quando colpita da un impulso luminoso, provoca rifrazione della luce. Tale evento definisce il segnale detto di *scatter* (dispersione), dove ogni punto sul citogramma rappresenta una cellula che ha deviato la luce. In citometria, le cellule vengono separate in base a diagrammi biparametrici, dove sulle ascisse viene rappresentato lo *Scatter* frontale (*Forward Scatter* - FSC), che definisce le dimensioni cellulari, e sulle ordinate lo *Scatter* laterale (*Side Scatter* - SSC), che definisce la granulosità citoplasmatica; più elevato sarà il FSC, più grandi saranno le cellule; più elevato sarà il SSC, maggiore sarà la granulosità delle cellule.

Per la diagnosi delle emopatie maligne, si usa l'immunofluorescenza diretta associata alla citometria a flusso (citofluorimetria), la quale consente, in tempi relativamente brevi, la immunofenotipizzazione di un elevatissimo numero di cellule con risultati estremamente affidabili e ripetibili.

Si intende per immunofenotipizzazione la tipizzazione di cellule con metodi immunologici, attraverso l'uso di anticorpi monoclonali (MoAb) diretti verso antigeni di superficie, citoplasmatici ed intranucleari. I MoAb non sono rivolti verso antigeni specifici delle cellule tumorali, bensì verso antigeni associati ai differenti stadi maturativi della normale differenziazione mieloide o linfoide.

Dopo aver separato le cellule in base ai segnali di *scatter*, si delimita un *gate* (finestra) sulla popolazione cellulare di cui si desidera studiare l'immunofenotipo determinando la fluorescenza delle cellule contenute dal *gate*. I risultati vengono espressi con un diagramma a dispersione di punti in cui ogni punto rappresenta una cellula positiva o negativa per l'MoAb cui è stata esposta.

Un importante aspetto da considerare è l'*intensità* della fluorescenza, la quale è funzione della densità dell'espressione degli antigeni: essa si classifica in bassa, media ed elevata sulla base del confronto con il controllo isotipico e con la posizione degli eventi negativi nella marcatura in esame.³²

La FCM nelle SLP

Cenni storici

La FCM è stata utilizzata nell'analisi dei linfomi sin da fine anni '70. I primi studi erano focalizzati prevalentemente sulla misurazione della fase del ciclo cellulare e della ploidia, sfruttando la semplicità con la quale questa tecnica misura il contenuto in DNA.

Negli anni '80, con l'aumentare delle conoscenze sulla biologia delle cellule linfoidi e con l'aumentare di markers quali i MoAb, si è assistito ad un rapido aumento dell'uso delle analisi citofluorimetriche dei tumori linfatici.³¹

Le applicazioni

Le applicazioni che questa metodica mette a disposizione dell'ematologo clinico nell'ambito delle SLP sono numerose e preziose. L'immunofenotipizzazione può essere a seconda dei casi praticata su sangue periferico, aspirati, biopsie di tessuti e su tutti i tipi di fluidi corporei.³³

Dimostrazione della clonalità delle cellule B

Nei linfonodi e nel sangue periferico di individui sani, ogni linfocito B esprime in superficie una catena leggera delle immunoglobuline (Ig), e il rapporto tra cellule esprimenti κ e λ è all'incirca 1,5.³¹

La perdita dell'espressione delle Ig di superficie in cellule B mature³⁴⁻³⁵, o un significativo aumento od inversione di questo normale rapporto³⁶⁻³⁷ (restrizione delle catene leggere) testimoniano la presenza di una popolazione B-

cellulare clonale che, particolarmente se associata ad anomalie dei parametri fisici (*Side e Forward Scatter*) e/o dell'espressione antigenica, è una caratteristica peculiare delle neoplasie a cellule B.³¹

Dimostrazione di anomalie delle cellule T

La diagnosi di neoplasia a cellule T mediante FCM è più difficile che per le cellule B, data l'assenza di markers sensibili di clonalità. Tuttavia la recente disponibilità di molti MoAb diretti contro i domini V delle catene α e β del recettore per gli antigeni dei linfociti T (TcR) può risultare utile nell'individuare la clonalità della proliferazione T-cellulare, dato che si pensa che cellule T appartenenti allo stesso clone neoplastico esprimano tutte uno stesso dominio. Inoltre, indicatori di neoplasia a cellule T possono essere l'assenza degli antigeni normalmente espressi, la presenza di antigeni aberranti (antigeni non espressi, o non così espressi, nei linfociti T normali) e livelli anomali di TcR.³⁰⁻

31, 38

Classificazione e diagnosi differenziale di tumori linfoidi

Assodata la clonalità di una proliferazione di cellule linfoidi, la FCM può risultare utile anche nella sua classificazione, date le note associazioni di specifici sottotipi con taluni pannelli antigenici (vedi tabella 2, pagg. 22-23).³⁰

Dimostrazione di fenotipi aberranti

La FCM può determinare i livelli di espressione e coespressione di molteplici antigeni su singole cellule.

Anormali sovraespressione, sottoespressione o coespressione di antigeni cellulari rappresentano alcuni dei fenotipi aberranti che si osservano comunemente nelle neoplasie linfoidi, e sono utili per la loro diagnosi e classificazione.³¹

Individuazione di cloni cellulari minimi

La FCM è molto sensibile per rivelare piccole popolazioni di cellule linfoidi clonali, che possono non essere individuate con le convenzionali tecniche diagnostiche. Pertanto la FCM può fornire un importante contributo sia nella fase prodromica che in quella di follow-up e per determinare la malattia minima residua a livello midollare.³⁰⁻³¹

Analisi del contenuto in DNA

La misurazione del contenuto in DNA e quindi della fase del ciclo cellulare, mediante FCM, consente di calcolare la frazione di crescita delle cellule neoplastiche, che si è rivelata essere un fattore prognostico spesso correlato al grado istologico e potenzialmente utile ai fini della programmazione di terapie "ciclo cellulare-dipendenti".^{30, 39}

Quantificazione di cellule esprimenti specifici antigeni

L'utilità di questa applicazione è evidente alla luce della attuale disponibilità di farmaci diretti selettivamente verso taluni epitopi cellulari: l'esempio più eclatante è quello dell'antigene CD20, che è bersaglio specifico del farmaco antineoplastico Rituximab.³¹

Pro e contro rispetto l'approccio morfologico

Immunoistochimica

Nelle biopsie linfonodali e di altri tessuti, l'immunofenotipo è generalmente analizzato mediante immunoistochimica (IHC) su sezioni istologiche di tessuti congelati o più spesso fissati. L'applicazione di MoAb specifici per le linee B, T, mieloide o epiteliale, permette l'assegnazione delle neoplasie ad un dato stipite cellulare. Inoltre, lo sviluppo di MoAb per antigeni tipici di alcune traslocazioni, come ALK-1, ciclina D1 o BCL-2, è molto utile nella diagnosi differenziale di specifici istotipi.

Pur consentendo l'analisi di un tessuto senza alterarne l'architettura, l'IHC ha alcune limitazioni legate alla disponibilità di MoAb.⁴⁰ La diagnosi di SLP è sempre più basata sull'analisi di fluidi corporei, biopsie endoscopiche o agoaspirati a causa dei loro minor costi ed invasività:³⁰ su questi materiali la diagnosi basata sulla sola morfologia può essere estremamente difficile.⁴¹

La maggior parte degli antigeni non resiste ai normali processi di fissazione. Il numero di MoAb efficaci su tessuti fissati è in aumento, ma il numero di reagenti disponibili è ancora limitato. D'altra parte, ai fini diagnostici, i risultati dell'IHC non sono immediatamente disponibili ed alcuni possono essere difficili da interpretare.⁴⁰ Ad esempio l'IHC non sempre fornisce una chiara evidenza della restrizione delle catene leggere delle immunoglobuline (Ig)

per l'abbondanza di esse negli spazi interstiziali di un tessuto, riducendo l'evidenza di Ig monoclonali di debole intensità sulla superficie dei linfociti B.³¹ Infine non è facile praticare una marcatura doppia o tripla sulla stessa sezione, cosa spesso necessaria per identificare sottopopolazioni con fenotipi aberranti frammisti a linfociti normali.⁴⁰

Citofluorimetria su tessuto

L'analisi citofluorimetrica può essere utilizzata per individuare la presenza di differenti popolazioni cellulari all'interno di una sospensione cellulare eterogenea.^{26, 42} Il numero di MoAb disponibili per la FCM è elevato, ed essi possono essere accoppiati a diversi fluorocromi, consentendo rivelazioni antigeniche multiple.⁴⁰ L'isolamento cellulare richiesto dalla FCM poi evidenzia, laddove presente, la restrizione per una catena leggera, non essendovi interferenza da parte delle altre Ig tissutali.³¹

Tuttavia, l'immunofenotipizzazione mediante FCM viene praticata su sospensioni cellulari e l'indispensabile disgregazione del tessuto non consente alcuna valutazione dell'architettura del parenchima.⁴⁰ Neoplasie caratterizzate da una relativa povertà di cellule tumorali, come il LH o alcuni linfomi a grandi cellule, non possono essere sempre individuate dalla FCM.³⁰ Nel LH solo meno dell'1% delle cellule presenti sono neoplastiche e la maggioranza delle cellule è costituita da cellule infiammatorie non maligne, per cui il

quadro generalmente risultante alla FC mostra un aspecifico *pattern* reattivo.²⁶ Nei linfomi a grandi cellule ci può essere invece una perdita preferenziale delle cellule neoplastiche per un loro minore rilascio all'atto dell'aspirazione o per una loro maggiore perdita all'atto della dissezione tessutale.³⁰

Vantaggi e svantaggi di ciascuna tecnica^{30, 40, 43}

I principali *vantaggi* della FCM sono:

1. distinte popolazioni cellulari sono definite in base alle loro dimensioni (*forward scatter*) e granulosità (*side scatter*);
2. le cellule morte possono essere escluse dall'analisi;
3. possono essere identificati antigeni di superficie debolmente espressi;
4. possono essere praticate analisi multicolori (da 2 a 6), permettendo un accurata definizione del profilo antigenico di superficie di specifiche cellule;
5. possono essere individuate due neoplasie coesistenti nello stesso sito tissutale;
6. valutazioni diagnostiche, relativamente non invasive, di fluidi corporei ed agoaspirati, possono talvolta evitare biopsie tissutali;
7. i risultati sono disponibili in poco tempo;
8. la dimostrazione della restrizione delle catene leggere è inequivocabile;
9. il numero di MoAb disponibili è molto grande;

10. la minore operatore-dipendenza dell'analisi dei risultati si traduce in una maggiore obiettività.

Gli *svantaggi* della *FCM* sono i seguenti:

1. organi sclerotici possono fornire troppo poche cellule per un'adeguata analisi;
2. vi è perdita dell'architettura tessutale;
3. una piccola popolazione di cellule B monoclonali può a volte non esser riconosciuta in un linfoma ricco in cellule T o in linfoistiociti;
4. mancanza di markers specifici di clonalità nei linfomi T;
5. un coinvolgimento tessutale parziale del linfoma con campionamento in una zona differente od una scorretta conservazione del tessuto possono causare risultati falsamente negativi;
6. incapacità a diagnosticare il linfoma di Hodgkin per lo scarso numero di cellule neoplastiche presenti.

I principali *vantaggi* dell'*IHC* sono:

1. preservazione dell'architettura tessutale;
2. capacità di riconoscere un numero di cellule neoplastiche relativamente scarso (es. LH o linfomi a grandi cellule B - LBCL), grazie al loro inequivocabile aspetto morfologico;

3. migliore valutazione immunofenotipica di alcuni antigeni (ad es. CD15 in Reed-Sternberg, BCL-2, BCL-6, Ciclina D1, ALK-1 e κ e λ citoplasmatiche).

I principali *svantaggi* dell'*IHC* sono:

1. non è facilmente praticabile né molto attendibile quando il materiale disponibile è scarso;
2. lunghi tempi tecnici;
3. è estremamente difficile, se non impossibile, determinare la restrizione delle catene leggere o la presenza di antigeni espressi debolmente;
4. non è possibile escludere dall'analisi le cellule non vitali;
5. molti MoAb utilizzati in FCM non sono disponibili per l'IHC;
6. non si può praticare una marcatura multipla sulla stessa sezione;
7. un coinvolgimento tissutale parziale del linfoma con campionamento in una zona differente od una scorretta conservazione del tessuto possono causare risultati falsamente negativi;
8. la maggiore operatore-dipendenza dell'analisi dei risultati determina riduzione dell'obiettività.

*Tabella 3. Principali vantaggi e svantaggi nel paragonare
citofluorimetria (FCM) ed immunoistochimica (IHC)*

<i>Caratteristica</i>	<i>FCM</i>	<i>IHC</i>
Tempi tecnici	Brevi	Lunghi
Restrizione k e λ	Ben evidente	Poco evidente
MoAb disponibili	Molto numerosi	Non molto numerosi
Efficacia su materiale scarso	Alta	Incostante
Marcature multiple	Di routine	Difficili
Operatore-dipendenza	Minore	Maggiore
Esclusione cellule non vitali	Possibile	Impossibile
Antigeni debolmente espressi	Identificabili	Poco identificabili
Architettura tessutale	Persa	Conservata
LH	Invisibile	Visibile
LNH-T	Scarsa sensibilità	Buona sensibilità
Antigeni citoplasmatici/nucleari	Minore efficacia	Maggiore efficacia

Lo stato dell'arte

I dati presenti in letteratura sul ruolo della FCM nelle SLP e segnatamente nei linfomi sono numerosi. La maggioranza di essi riguarda studi su sangue periferico, aspirati midollari e FNAC di tessuto linfoide (cfr pagg. 7-11).

Da una revisione della bibliografia (1994-2006), sono pochi i lavori che trattano dell'applicazione di questa metodica a biopsie di tessuto linfoide. Sono riportate nella tabella 4 le conclusioni più significative.

Tabella 4. Lavori sul ruolo della FCM nelle biopsie di tessuti sospetti per SLP

<i>Bib.</i>	<i>Autore anno</i>	<i>Casi</i>	<i>Tecniche</i>	<i>Principali risultati e conclusioni</i>
44	Morse 1994	16	FCM; diagnosi finale istologica	Sensibilità di FCM per SLP=75% (90% escludendo LH) Specificità di FCM per SLP=100% I 3 falsi negativi alla FCM sono stati 2 LH ed un LNH a grandi cellule
41	Almasri 1997	26*	FCM e istologia	16 LNH: per 8, con un referto istologico dubbio, la diagnosi si è basata sulla FCM
43	Dunphy 2000	373	FCM; diagnosi finale istologica	Sensibilità di FCM per SLP=79% (89% escludendo LH) Specificità di FCM per SLP=100% VPP di FCM per SLP=100% VPN di FCM per SLP=73% (86% escludendo LH) Concordanze istologia/FCM=82% Discordanze istologia/FCM=18% Sensibilità della FCM per LH=0% 11% di LNH negativi alla FCM a causa di: parziale coinvolgimento tessutale, abbondanza di cellule reattive, marcata sclerosi, assenza di fenotipi aberranti, inidonea conservazione
40	Martinez 2003	422	FCM; diagnosi finale istologica	Sensibilità di FCM per SLP=72% (90% escludendo LH) Specificità di FCM per SLP=100% VPP di FCM per SLP=100% VPN di FCM per SLP=52% (79% escludendo LH) Concordanza istologia/FCM=81% Discordanza istologia/FCM=18% Maggiore correlazione tra la fenotipizz.ne citometrica e diagnosi finale per LLC, L. mantellare e L. follicolare Minore correlazione per alcuni LNH-B mancanti di uno specifico fenotipo come molti DLCL Sensibilità della FCM per LH=0% Ruolo importante di FCM nei linfomi composti
46	Wu 2003	19 [§]	FCM e istologia	FCM ha identificato 15 dei 17 LNH-B cutanei; tra questi, 5 positivi alla FCM erano solo sospetti all'esame istologico
47	Ravoet 2004	116	FCM e istologia	Concordanza istologia/FCM=88% Discordanze istologia/FCM=12%, tra le quali 1 carcinoma e 4 LNH diagnosticati dalla sola FCM
48	Sun 2004	135 [^]	FCM e istologia	In 3 dei 23 linfonodi processati, la diagnosi è arrivata solo grazie alla FCM

* biopsie gastriche

[§] biopsie cutanee

[^] di cui 23 linfonodi

Legenda:

FCM: citofluorimetria
SLP: sindrome linfoproliferativa
LH: linfoma di Hodgkin
LNH: linfoma non Hodgkin

DLCL: linfoma diffuso a grandi cellule
VPP: valore predittivo positivo
VPN: valore predittivo negativo
LLC: leucemia linfatica cronica

Capitolo 4 - SCOPI DEL LAVORO

Scopo del lavoro è stato analizzare il contributo della FCM nello studio di routine delle biopsie di tessuti sospetti per SLP.

Più precisamente si è valutata la validità dell'integrazione delle due metodiche (istologia e citofluorimetria) al fine di ottimizzare la finale condotta diagnostica delle SLP, comprimendo il più possibile il numero dei casi dubbi o non conclusivi al solo esame istologico. Sulla base del solo esame istologico, cui è oggi fondamentalmente affidata la diagnosi di linfoma, l'esattezza diagnostica $[(\text{veri positivi} + \text{veri negativi}) / \text{totale dei risultati}]$ non supera l'85-90% (vedi paragrafi precedenti, pagg. 31-38). Lo studio si è proposto di valutare la capacità della diagnostica combinata di tendere al 100%. Lo studio inoltre ha cercato di evidenziare una tipologia di campioni più sensibili alla metodica.

Capitolo 5 - MATERIALI E METODI

I pazienti ed i criteri di arruolamento

Sono stati considerati 66 pazienti afferiti, dall'aprile 2003 al maggio 2006, all'Area di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" di Napoli.

I criteri di inclusione sono stati:

1. presenza di lesione sospetta od ecograficamente suggestiva di SLP o documentazione endoscopica di sospetta lesione da SLP;
2. possibilità di ottenere almeno 2 frammenti tessutali da analizzare o la divisibilità di un unico prelievo;
3. consenso del paziente.

I criteri di esclusione sono stati:

1. non programmabilità dell'esame per l'iter della metodica integrata;
2. impossibilità ad ottenere più di un frammento;
3. biopsia effettuata con tempistica incompatibile a quella delle fasi della processazione;
4. rifiuto del paziente a partecipare allo studio.

I pazienti esclusi sono stati 10:

- per 6 perché la biopsia è stata effettuata in tempi che impedivano la procedura anche con FCM;
- in 4 per l'esiguità l'unico campione ottenuto destinato al solo studio istologico;
- 1 perché la procedura è stata rifiutata dal paziente.

Dei 56 pazienti arruolati, i maschi sono stati 30 e le femmine 26.

L'età media è stata di 47,5 anni, con un range da 17 ad 83 anni.

Per ogni paziente i dati clinici, laboratoristici e strumentali pertinenti sono stati gestiti dal Curante Specialista dell'Area di Ematologia dell'AOU "Federico II" di Napoli.

Le biopsie

Sono state studiate 65 biopsie da siti linfonodali ed extranodali (alcuni pazienti sono stati sottoposti

Le 65 biopsie hanno compreso:

- 34 linfonodali;
- 24 gastrointestinali;
- 5 cutanee;
- 2 da ghiandola lacrimale.

L'iter del campione bioptico

Il prelievo bioptico, effettuato in sterilità, a fresco ed in contenitore sterile refrigerato, è stato trasportato dapprima al Dipartimento Assistenziale di Anatomia Patologica e Citopatologia dell'Azienda Universitaria Policlinico Federico II. Le biopsie da endoscopia sono state trasportate immerse in soluzione fisiologica, ed in PBS (*phosphate buffer saline*) quelle destinate alla FCM.

Ogni campione chirurgico (figura 1) è stato misurato e descritto.

Da ciascuno di essi sono stati ottenuti, mediante l'utilizzo di strumenti sterili e sotto cappa, almeno due piccoli frammenti, di cui almeno uno da processare per l'esame immunoistochimico ed almeno uno per l'esame citofluorimetrico (figura 2).

Laddove è stato possibile, ulteriori frammenti sono stati destinati all'esame di Citogenetica e di Biologia Molecolare.

I frammenti destinati alla FCM, raccolti in provette sterili contenenti PBS (figura 3), sono stati trasportati al Servizio di Citofluorimetria dell'Unità Operativa di Immunologia Cellulare dell'Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale (A.O.R.N.) "A. Cardarelli" di Napoli.

Le procedure in Anatomia Patologica

I campioni per l'esame istologico sono stati fissati in formalina neutra tamponata diluita al 4% ed inclusi in paraffina. Per ogni linfonodo è stato effettuato un doppio campionamento. Da ciascun blocchetto di paraffina sono state ottenute al microtomo sezioni di circa 4 µm di spessore, che sono state colorate di routine con ematossilina-eosina (Melis, Tecniche di Anatomia Patologica, Edi Ermes Milano Editore, 1989).

La tipizzazione immunoistochimica è stata effettuata sulle sezioni più rappresentative, con il metodo Streptavidina-Biotina.⁴⁹ Specificamente, le sezioni, dello spessore di 4 µm, sono state sottoposte ad un processo di asciugatura *overnight* ad una temperatura di 40°C; sono state quindi sparaffinate in xilolo per 30 minuti e successivamente idratate con passaggi in etanolo a concentrazioni decrescenti (96, 90, 80 e 70%) ed infine in acqua distillata. L'attività delle perossidasi endogene è stata bloccata mediante un passaggio (15 minuti) delle sezioni in perossido di idrogeno (H₂O₂) e successivo lavaggio in tampone (10 minuti). Lo smascheramento dei siti antigenici è stato effettuato con esposizione dei preparati in forno a microonde (vedi tabella 5). Le sezioni sono state sequenzialmente trattate con l'anticorpo primario specifico (tabella 5), con l'anticorpo secondario biotinilato e con il complesso Streptavidina-Biotina.

La diaminobenzidina (q.b.) è stata usata come cromogeno in presenza di perossido di idrogeno. Le sezioni sono state infine contrastate con ematossilina.

Per lo studio dell' istotipo, alla luce della classificazione REAL/WHO¹³⁻¹⁵, sono stati testati gli anticorpi primari specifici per i seguenti antigeni: CD3, CD5, CD10, CD20, CD21, CD23, CD30, CD38, CD43, CD45RO, CD79a, Ciclina D1, BCL-2, BCL-6, Ki-67, EMA, k e λ.

I cloni, i distributori, le concentrazioni ed i tempi di incubazione degli anticorpi sono riportati nella tabella 5.

Tabella 5. I MoAb utilizzati in immunostochimica

<i>Anticorpo</i>	<i>Clone</i>	<i>Produttore</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Tempo di incubazione</i>	<i>Pretrattamento*</i>
CD3	Policlonale	DAKO	1:50	30 minuti	MW
CD5	54/F6	DAKO	1:100	60 minuti	MW
CD10	56C6	Menarini	1:100	40 minuti	MW
CD20	L26	Menarini	1:50	30 minuti	MW
CD21	B2	Menarini	1:50	60 minuti	MW
CD23	MHM6	DAKO	1:20	60 minuti	MW
CD30	K-1	Menarini	1:70	30 minuti	MW
CD 38	SPC32	Novocastra	1:50	30 minuti	MW
CD43	MT1	Menarini	1:50	30 minuti	MW
CD45RO	UCHL-1	Menarini	1:100	30 minuti	MW
CD79a	JCD117	DAKO	1:50	30 minuti	MW
Ciclina D1	DCS-6	DAKO	1:25	60 minuti	MW
BCL-2	100	Menarini	1:70	30 minuti	MW
BCL-6	P1F6	Novocastra	1:20	40minuti	MW
Ki-67	Mib-1	Menarini	1:50	60 minuti	MW
EMA	MC5	Ventana	1:70	30 minti	MW
Kappa [§]	K88	Menarini	1:50	16 minuti	-
Lambda [§]	Policlonale	Menarini	1:50	16minuti	-

*: MW: forno a microonde: 3 cicli (750 Watt per 9 minuti; 350 W per 10 minuti; 350 W per 10 minuti, intervallati da cicli di raffreddamento (21 minuti in acqua corrente)

§: per le catene leggere kappa e lambda non è necessario lo smascheramento antigenico

Le procedure in citofluorimetria

I campioni destinati alla citofluorimetria sono pervenuti, immersi in PBS, al laboratorio entro trenta minuti dalla biopsia, e sono stati processati secondo i metodi standard.^{33, 37, 50, 51}

Dopo l'esfoliazione con bisturi (figura 4), e sempre in PBS, la sospensione cellulare è stata centrifugata (10 minuti a 900 g). Il pellet ottenuto è stato risospeso in 2 ml di PBS e questa sospensione è stata aliquotata in tubi contenenti i complessi MoAb-fluorocromo (figura 5) alle diluizioni suggerite dal Produttore (in genere da 1:10 a 1:20). Il pannello di MoAb utilizzati con relativi fluorocromi è indicato nella tabella 6.

Dopo l'incubazione per 30 minuti a 4°C, sono stati aggiunti 2 ml di cloruro di ammonio al 10% per la lisi dei globuli rossi. I campioni sono stati quindi centrifugati per due minuti a 900 g e risospesi in 200 µl di PBS.

Si è quindi proceduto con l'analisi con il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Josè, CA) (figura 6). Per ogni campione sono stati acquisiti circa 10000 eventi, analizzati usando i software *Cell Quest* e *Paint-a-Gate Pro*.

Un *pattern* citofluorimetrico è stato definito patologico, alla luce dei dati clinico-laboratoristici, sulla base dell'integrazione delle seguenti constatazioni:

1. anomalie nelle caratteristiche del FSC e SSC - distribuzione con evidente "gate patologico";

2. l'eventuale restrizione clonale delle catene leggere delle immunoglobuline;
3. la presenza di un fenotipo linfomatoso (sovra- o sottoespressione di CD patognomonicici e sbilanciamento in senso clonale).

Laddove diagnosticata una SLP, ne è stata tentata la classificazione sulla base del sistema REAL/WHO.¹³⁻¹⁵

La refertazione è stata effettuata, in media, due ore dopo l'arrivo del campione al laboratorio.

Tabella 6. I MoAb utilizzati in FCM

<i>Anticorpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Produttore</i>
CD3	FITC	BD
CD5	FITC	BD
CD10	PE	BD
CD19	PE	BD
CD20	FITC	BD
CD22	PE	BD
CD23	FITC	BD
CD37	FITC	Immunotech
CD79 β	PE	Immunotech
FMC-7	FITC	Immunotech
CD103	FITC	Immunotech
CD25	PE	Immunotech
HLA-DR	PE	BD
CD38	FITC	Immunotech
CD11c	PE	Immunotech
CD35	FITC	Immunotech
CD43	FITC	BD
CD45	PE-Cy7	Immunotech
CD19	PERCP-Cy5.5	BD
kappa	FITC	BD
lambda	PE	BD

Legenda:

FITC: fluoresceina isotiocianato

PE: ficoeritrina

Cy: cianina

PERCP: proteina peridina-clorofilla

BD: Becton Dickinson

La diagnosi definitiva

Nella formulazione della diagnosi definitiva si è tenuto conto di:

- ❖ quadro clinico;
- ❖ esami strumentali;
- ❖ esami di laboratorio;
- ❖ risultato dell'esame istologico;
- ❖ risultato dell'esame citofluorimetrico;
- ❖ eventuali altre indagini praticate (citogenetica, biologia molecolare, FNAC, biopsia osteomidollare).



Figura 1. Un linfonodo appena biottizzato.

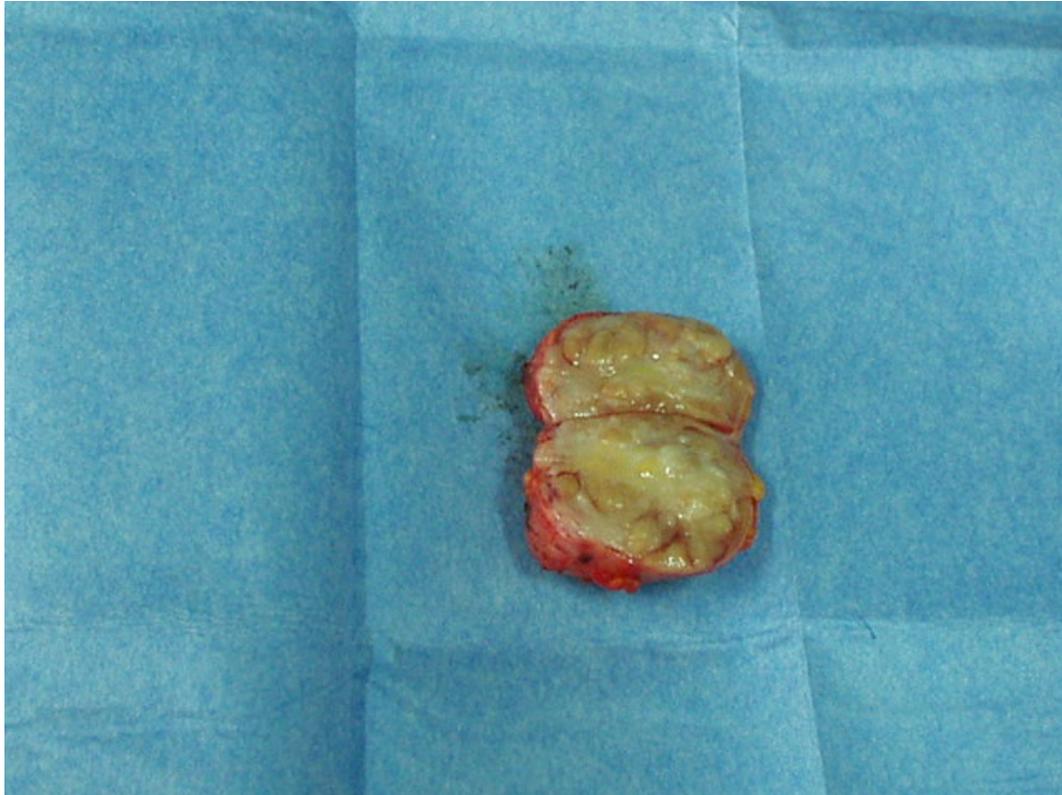


Figura 2. Il linfonodo sezionato longitudinalmente. Dal parenchima verranno ottenuti i frammenti destinati alle varie procedure.

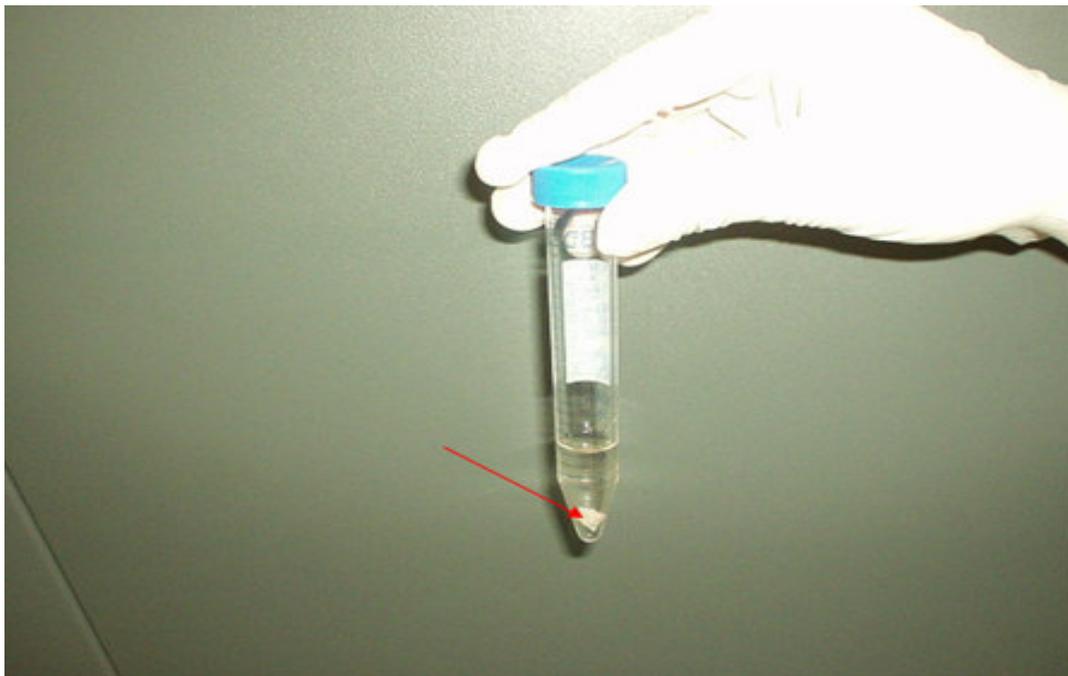


Figura 3. I frammenti di linfonodo destinati alla citofluorimetria sul fondo della provetta, immersi in PBS.

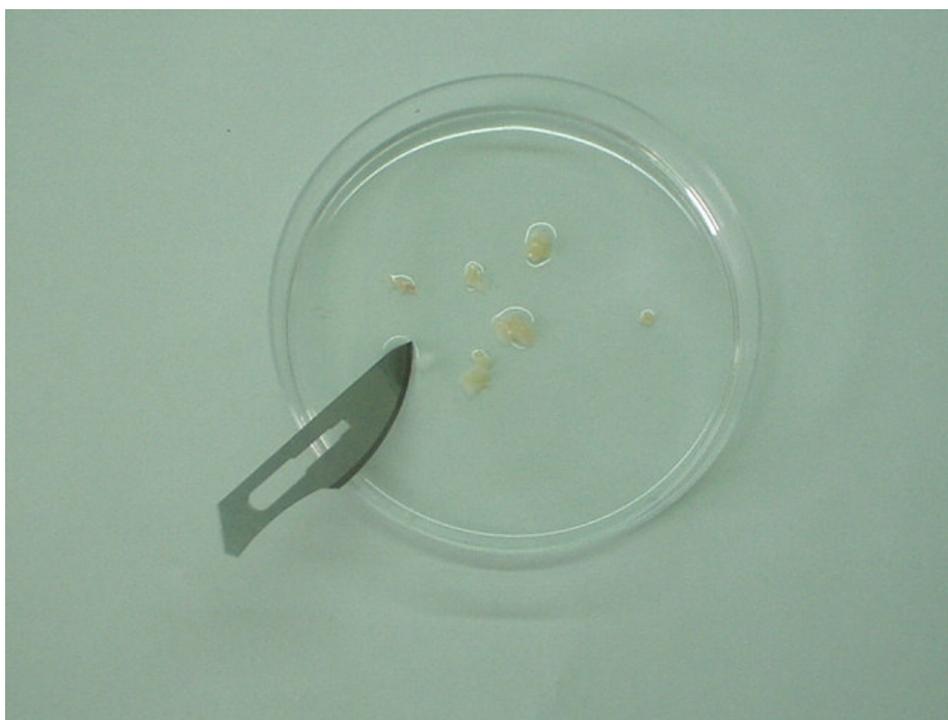


Figura 4. I frammenti linfonodali sottoposti ad esfoliazione meccanica con bisturi.



Figura 5. I flaconi contenenti i complessi MoAb-Fluorocromo utilizzati in FCM.



Figura 6. Il citofluorimetro.

Capitolo 6 - RISULTATI

Sono state ottenute 65 biopsie da 56 pazienti.

Dei 65 campioni processati, la diagnosi *istologica* è stata ottenuta in 65 casi (100%) e quella citofluorimetrica in 64 casi (98,4%).

In 4 casi (6,1%), la rivalutazione del preparato alla luce dei dati dell'altra metodica ha condotto ad una revisione della diagnosi (istologica in 3 casi e citofluorimetrica in 1 caso).

Le diagnosi per ciascuna metodica e definitive

Le diagnosi di ciascuna metodica e definitive, relative a tutte le biopsie, sono riportate nella tabella 7.

Su 62 biopsie, la diagnosi *istologica* (tabelle 8 e 9) è stata:

- ❖ patologia maligna in 36 casi (38 dopo revisione, e di queste 8 LH e 30 LNH);
- ❖ condizione benigna, reattiva o assenza di patologia in 29 casi.

Su 64 biopsie, la diagnosi *citofluorimetrica* (tabelle 8 e 9) è stata:

- ❖ SLP in 30 casi (31 dopo revisione);
- ❖ proliferazione non clonale in 34 casi (33 dopo revisione).

Su 65 biopsie, la diagnosi *definitiva* (tabelle 9 e 10) è stata:

- ❖ patologia maligna in 40 casi (7 LH, 32 LNH ed un linfoma composito - cod. 21LF);
- ❖ condizione benigna, reattiva o assenza di patologia in 21 casi;
- ❖ inconclusiva in 4 casi (cod. 11aIA, 11bIA, 11cIA, 40aRM), perchè le due metodiche discordanti e gli altri dati disponibili non hanno consentito di porre una diagnosi conclusiva ed hanno fatto optare per uno stretto monitoraggio del caso (tabella 9).

Correlazioni sul riscontro di patologia benigna o neoplastica

Le seguenti correlazioni sono relative al riscontro di natura (benigna o SLP) della proliferazione.

Su 64 biopsie, le diagnosi **istologica e citofluorimetrica** (tabelle 8 e 10) sono state:

- ❖ concordi in 47 casi (50 dopo revisione);
- ❖ discordi in 17 casi (14 dopo revisione); questi 14 casi hanno compreso:
 - 7 LH e 3 LNH cutanei (cod. 08aCRM, 08bCRM e 08dCRM), positivi alla sola istologia;
 - 3 biopsie gastroduodenali (cod. 11aIA, 11bIA e 11cIA) ed 1 da ghiandola lacrimale (cod. 40aRM), positive alla sola FCM.

Su 65 biopsie, le diagnosi **istologica e definitiva** (tabella 9) sono state:

- ❖ concordi in 57 casi (59 dopo revisione);
- ❖ discordi in 4 casi (2 dopo revisione, costituiti da 2 analoghi casi -cod. 28PM e 42VV- in cui sia l'istologia che la FCM sono state negative per SLP, che è stata poi diagnosticata da un FNAC successivo);
- ❖ gli altri 4 casi non hanno avuto una diagnosi definitiva.

Su 64 biopsie, le diagnosi **citofluorimetrica e definitiva** (tabella 9) sono state:

- ❖ concordi in 47 casi (48 dopo revisione);
- ❖ discordi in 13 casi (12 dopo revisione, costituite dai 7 LH, dai 3 LNH cutanei, e dai 2 casi diagnosticati dal FNAC);
- ❖ gli altri 4 casi non hanno avuto una diagnosi definitiva.

Risultati per tipo di biopsia

I risultati per tipo di biopsia sono riportati nella tabella 10.

Delle 35 biopsie **linfonodali**, la diagnosi definitiva è stata:

- ❖ patologia maligna in 30 casi (7 LH, 22 LNH ed 1 linfoma composito);
- ❖ condizione benigna, reattiva o assenza di patologia in 4 casi.

Nel dettaglio, i 7 **LH** hanno tutti presentato:

- ❖ positività alla istologia;
- ❖ quadro reattivo alla citofluorimetria.

Nei 22 casi di **LNH** si sono verificate le seguenti condizioni:

- ❖ in 17 casi c'è stata concordanza tra le due metodiche sin dalla prima valutazione;
- ❖ in 1 caso (cod.29VT) la concordanza si è verificata solo dopo revisione citofluorimetrica, alla luce della positività istologica;
- ❖ in 1 caso (cod. 09CG) la concordanza si è verificata solo dopo revisione istologica, alla luce della positività citofluorimetrica;
- ❖ 1 caso (cod. 05AA) non è stato valutabile in FCM e la diagnosi è stata solo istologica;
- ❖ 2 casi (cod. 28PM e 42VV) hanno presentato istologia e FCM negative e la diagnosi è giunta solo grazie ad un FNAC successivo.

Il linfoma **composito** ha presentato:

- ❖ positività per LH all'istologia;
- ❖ positività per LNH alla FCM.

Le 4 **LADM benigne** si sono tutte rivelate:

- ❖ negative per l'istologia;
- ❖ negative per la FCM.

Delle 24 biopsie **gastrointestinali**, la diagnosi definitiva è stata:

- ❖ LNH in 5 casi, di cui 4 MALTomi ed un LNH follicolare;
- ❖ condizione benigna, reattiva o assenza di patologia in 16 casi;
- ❖ non conclusiva in tre casi.

Nel dettaglio, nei 5 casi di **LNH** si sono verificate le seguenti condizioni:

- ❖ in 4 casi c'è stata concordanza tra le due metodiche sin dalla prima valutazione;
- ❖ in 1 caso (cod. 14MD) la concordanza si è verificata solo dopo revisione istologica, alla luce della positività citofluorimetrica (figure 7 e 8).

Le 15 biopsie **non neoplastiche** hanno tutte presentato:

- ❖ negatività all'istologia;
- ❖ negatività alla FCM.

Le 3 biopsie **non conclusive**, tutte appartenenti allo stesso paziente, sono state tali perché la FCM è stata positiva per SLP con istologia negativa.

Delle 5 biopsie **cutanee**, la diagnosi definitiva è stata:

- ❖ LNH in 4 casi;
- ❖ quadro reattivo in un caso.

Nel dettaglio, nei 4 casi di **LNH** si sono verificate le seguenti condizioni:

- ❖ 1 caso di positività per ambedue le metodiche;
- ❖ 3 casi di biopsie, tutte appartenenti allo stesso paziente, di negatività alla FCM e positività alla istologia.

La biopsia **non neoplastica** è risultata negativa per entrambe le metodiche.

Delle 2 biopsie da **ghiandola lacrimale**, entrambe dallo stesso paziente, la diagnosi definitiva è stata:

- ❖ inconclusiva nella prima biopsia;
- ❖ LNH alla seconda.

Nel dettaglio, il caso **non conclusivo** (cod. 40aRM) ha presentato alla FCM un'espansione di tipo T linfocitario,

mentre l'istologia ha evidenziato solo tessuto ghiandolare con pochi linfociti.

Il caso di **LNH** (cod. 40bRM), successivo al precedente, è risultato positivo per entrambe le metodiche.

Riscontro di tipo di SLP

Le seguenti correlazioni sono relative al riscontro di tipo (LH / LNH) della proliferazione.

Nei 7 casi di **LH** (tabella 9):

- ❖ l'esame *istologico* (figura 9) ha sempre individuato la neoplasia;
- ❖ la *FCM* (figura 10) non ha individuato la neoplasia, rinvenendo in tutti i casi un quadro reattivo.

Nei 29 casi di **LNH** (tabella 9):

- ❖ l'esame *istologico* (figura 11) ha fornito una diagnosi concorde con quella finale (anche in termini di corretta classificazione) in 24 casi (27 dopo revisione); in 2 casi l'istologia non ha individuato cellule patologiche e la diagnosi è scaturita da un FNAC successivo.
- ❖ la *FCM* (figura 12) ha individuato 22 (23 dopo revisione) dei 28 LNH processati e in tutti questi casi la sua immunofenotipizzazione è risultata concorde con la classificazione finale; i rimanenti 5 casi sono stati:
 - 3 LNH cutanei, positivi alla istologia;
 - 2 LNH negativi anche alla istologia e diagnosticati da FNAC successivo.

Nell'unico caso di **linfoma composito** (tabella 9):

- ❖ l'*istologia* ha individuato cellule patognomoniche di LH;
- ❖ la *FCM* ha individuato caratteristiche tipiche di un LNH.

Tabella 7. Riassunto della casistica e dei principali risultati

	Codice	Sesso	Età	Tipo biopsia	Citofluorimetria	Istologia	Confronto	Diagnosi definitiva
1	01MF	M	60	linfonodo	quadro reattivo	LH sclerosi nodulare	D	LH sclerosi nodulare
2	02ED	M	25	linfonodo	non clonale	iperplasia follicolare florida	C	iperplasia follicolare florida
3	03BA	F	49	linfonodo	SLP a cellule B CD5+, CD22+, CD23-, k+	LNH follicolare; dopo revisione: mantellare	D/C	LNH mantellare
4	04DAG	M	45	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, λ+	LNH follicolare	C	LNH follicolare
5	05AA	M	63	linfonodo	tessuto necrotico non valutabile	LNH diffuso a grandi cellule	NV	LNH diffuso a grandi cellule
6	06DGL	M	44	linfonodo	non clonale	iperplasia follicolare florida	C	iperplasia follicolare florida
7	07AM	F	69	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, k+	LNH marginale	C	LNH marginale
8	08aCRM	F	66	cute	non clonale	infiltrazione da LNH cutaneo a piccole cellule B	D	LNH cutaneo a cellule B
9	08bCRM	F	66	cute	non clonale	infiltrazione da LNH cutaneo a piccole cellule B	D	LNH cutaneo a cellule B
10	08cCRM	F	66	cute	non clonale	quadro reattivo	C	quadro reattivo
11	09CG	M	58	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, λ+	iperplasia follicolare florida; dopo revisione: LNH follicolare	D/C	LNH follicolare
12	10DIA	M	42	linfonodo	non clonale	iperplasia follicolare florida	C	iperplasia follicolare florida
13	11aIA	M	25	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD103+, CD23+, λ+	quadro reattivo	D	inconclusiva

(continua)

Tabella 7. Riassunto della casistica e dei principali risultati (continuazione)

	<i>Codice</i>	<i>Sesso</i>	<i>Età</i>	<i>Tipo biopsia</i>	<i>Citofluorimetria</i>	<i>Istologia</i>	<i>Confronto</i>	<i>Diagnosi definitiva</i>
14	11bIA	M	25	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23-, λ+	gastrite cronica	D	inconclusiva
15	11cIA	M	25	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23-, λ+	gastrite cronica e reazione linfoide	D	inconclusiva
16	12aBF	F	53	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD10±, CD23-, λ+	MALToma	C	MALToma
17	12bBF	F	53	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
18	13MC	M	34	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD10+, CD22+, CD23-, k+	LNH follicolare	C	LNH follicolare
19	14MD	F	69	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD10±, CD22+, λ+	quadro reattivo; dopo revisione: maltoma	D/C	maltoma
20	15aLLS	M	59	linfonodo	SLP a cellule B CD5+, CD23-, CD22+, k+	LNH follicolare	D	LNH follicolare grado II
21	15bLLS	M	59	colon	SLP a cellule B CD5-, CD22+, k+	LNH follicolare	C	LNH follicolare
22	16CV	M	40	stomaco e duodeno	non clonale	quadro reattivo	C	quadro reattivo
23	17CB	M	46	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
24	18CL	F	41	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
25	19PC	M	63	stomia esofago-digiunale	non clonale	quadro reattivo	C	quadro reattivo
26	20DP	M	32	linfonodo	non clonale	LH sclerosi nodulare	D	LH sclerosi nodulare

(continua)

Tabella 7. Riassunto della casistica e dei principali risultati (continuazione)

	<i>Codice</i>	<i>Sesso</i>	<i>Età</i>	<i>Tipo biopsia</i>	<i>Citofluorimetria</i>	<i>Istologia</i>	<i>Confronto</i>	<i>Diagnosi definitiva</i>
27	21LF	F	26	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD23+/-CD22+, λ+	LH sclerosi nodulare	D	linfoma composito
28	22CA	M	26	stomia esofago-digiunale	non clonale	quadro reattivo	C	quadro reattivo
29	23GF	F	60	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
30	24CR	F	44	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
31	25PC	F	82	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23+, CD38+, sIg-	LNH diffuso a grandi cellule B	C	LNH diffuso a grandi cellule B
32	26CMR	F	45	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
33	27CA	M	29	linfonodo	non clonale	LH sclerosi nodulare	D	LH sclerosi nodulare
34	28PM	M	22	linfonodo	non clonale	tessuto linfoide iperplastico	C	dopo FNAC: LNH
35	29VT	F	48	linfonodo	non clonale; dopo revisione: SLP a grandi cellule CD10+, CD19+, CD20+, CD38+, sIg-	LNH a grandi cellule	D/C	LNH a grandi cellule
36	30DA	M	60	stomia esofago-digiunale	non clonale	stomite cronica	C	stomite cronica
37	31FT	F	58	stomaco e duodeno	non clonale	quadro reattivo	C	quadro reattivo
38	32 DST	F	59	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD 22+, k+	LNH a grandi cellule B	C	LNH a grandi cellule B
39	33IF	F	39		non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica

(continua)

Tabella 7. Riassunto della casistica e dei principali risultati (continuazione)

	<i>Codice</i>	<i>Sesso</i>	<i>Età</i>	<i>Tipo biopsia</i>	<i>Citofluorimetria</i>	<i>Istologia</i>	<i>Confronto</i>	<i>Diagnosi definitiva</i>
40	34AE	F	54	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
41	35PE	M	48	linfonodo	SLP a cellule T CD2+, CD4+	LNH a cellule T	C	LNH a cellule T
42	36BS	F	56	cute	SLP a cellule B CD5-, CD10+/-, CD22+, CD23-, k+	SL a grandi cellule B	C	LNH a cellule B
43	37AG	M	63	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
44	38CA	F	61	stomaco e duodeno	non clonale	gastrite cronica	C	gastrite cronica
45	39CV	M	74	linfonodo	SLP CD19+, CD20+, CD107+, CD37+, CD11c+, CD22+, k+	Leucemia a cellule capellute	C	Leucemia a cellule capellute
46	40aRM	M	83	ghiandola lacrimale	popolaz cellul atipica CD7+, CD5+, CD8+, CD30+, CD105+	assenza di infiltrazione da SL	D	inconclusiva
47	40bRM	M	83	ghiandola lacrimale	SLP a cellule B CD5-, CD 22+, CD 23-, CD38+, λ+	LNH marginale	C	LNH marginale
48	41SC	F	27	linfonodo	quadro reattivo	LH sclerosi nodulare	D	LH sclerosi nodulare
49	42VV	M	40	linfonodo	quadro reattivo	assenza di specificità	C	dopo FNAC: LNH a grandi cellule B
50	43CMC	F	54	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23+/-, CD38+, CD10+, k+	LNH follicolare	C	LNH follicolare
51	44RG	F	40	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23+/-, CD38+, CD10+, k+	LNH a cellule B	C	LNH basso grado
52	45GA	F	69	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23+/-, CD38+, CD10+, λ+	LNH follicolare	C	LNH follicolare

(continua)

Tabella 7. Riassunto della casistica e dei principali risultati (continuazione)

	<i>Codice</i>	<i>Sesso</i>	<i>Età</i>	<i>Tipo biopsia</i>	<i>Citofluorimetria</i>	<i>Istologia</i>	<i>Confronto</i>	<i>Diagnosi definitiva</i>
53	46DMG	F	42	linfonodo	quadro reattivo	LH sclerosi nodulare	D	LH sclerosi nodulare
54	47aRC	M	57	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD23-, CD22+, CD43-, CD38-, λ+	MALToma	C	MALToma
55	48VU	M	74	linfonodo	SLP a cellule B CD5+, CD23-, CD22+, CD38-, CD43+, k+	LNH diffuso a grandi cellule B, var. immunoblastica	C	LNH diffuso a grandi cellule B, var. immunoblastica
56	49DSL	M	17	linfonodo	SLP a cellule B: CD5-, CD19/+, CD10+, CD23+, CD22+, CD38+, k+	LNH a cellule B tipo Burkitt	C	LNH a cellule B tipo Burkitt
57	50OF	M	17	linfonodo	non clonale	iperplasia reattiva	C	gastrite cronica
58	51RV	F	44	stomaco e duodeno	SLP a cellule B CD5-, CD23-, CD22+, CD38-, k+	MALToma	C	MALToma
59	52 CM	F	24	linfonodo	non clonale	LH sclerosi nodulare	D	LH sclerosi nodulare
60	08dCRM	F	67	cute	non clonale	infiltrazione da LNH cutaneo a piccole cellule B	D	LNH cutaneo a cellule B
61	53CMG	F	31	linfonodo	non clonale	LH sclerosi nodulare	D	LH, sclerosi nodulare
62	47bRC	M	57	stomaco	non clonale	iperplasia reattiva	C	gastrite cronica
63	41dPO	M	42	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23+-, CD38+, CD10+, k+	LNH follicolare	C	LNH follicolare
64	64nPE	M	40	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD22+, CD23+-, CD38+, CD10+, λ+	LNH follicolare	C	LNH follicolare
65	33cER	M	39	linfonodo	SLP a cellule B CD5-, CD 22+, k+	LNH a grandi cellule B	C	LNH a grandi cellule B

Legenda: LH = linfoma di Hodgkin
LNH = linfoma non Hodgkin
SLP = sindrome linfoproliferativa

C = concordanza
D = discordanza

(fine)

Tabella 8. Correlazione tra diagnosi istologica e citofluorimetrica relativamente alla natura benigna o da sindrome linfoproliferativa

		FCM		Totale istologia
		+	-	
Istologia	+	27	10	37
	-	4	23	27
Totale FCM		31	33	64*

*Il totale, di 61, esclude la biopsia dalla quale non è stata ottenuta diagnosi alla FCM.

Legenda: +: positività per sindrome linfoproliferativa

-: negatività per sindrome linfoproliferativa

Tabella 9. Correlazione tra diagnosi definitiva, istologica e citofluorimetrica relativa al tipo di proliferazione

Diagnosi definitiva	Campioni	Istologia		FCM	
		+	-	+	-
Benigna	21	0	21	0	21
LNH-B	31	29	2	25 ¹	5 ¹
LNH-T	1	1	0	1	0
LH	7	7	0	0	7
L. composito	1	1 ²	0	1 ²	0
Inconclusiva	4	0	4	4	0
Totale	64	38	27	31 ¹	33 ¹

¹ è escluso un LNH-B, di cui non è stata ottenuta diagnosi alla FCM.

² L'istologia ha individuato il LH e la FCM il LNH.

Legenda: +: positività per sindrome linfoproliferativa

-: negatività per sindrome linfoproliferativa

Tabella 10. Risultati per tipo di biopsia

Biopsia	Linfonodale	Gastrointest.	Cutanea	Gh.lacrimale	Tot
Campioni	34	24	5	2	65
Patologia maligna	30	5	4	1	40
Condizione benigna	4	16	1	0	21
Diagn.inconclusiva	0	3	0	1	4
Concordanze/discordanze tra IHC e FCM	26/7*	21/3	2/3	1/1	50/14*

* è esclusa la biopsia dalla quale non è stata ottenuta diagnosi alla FCM

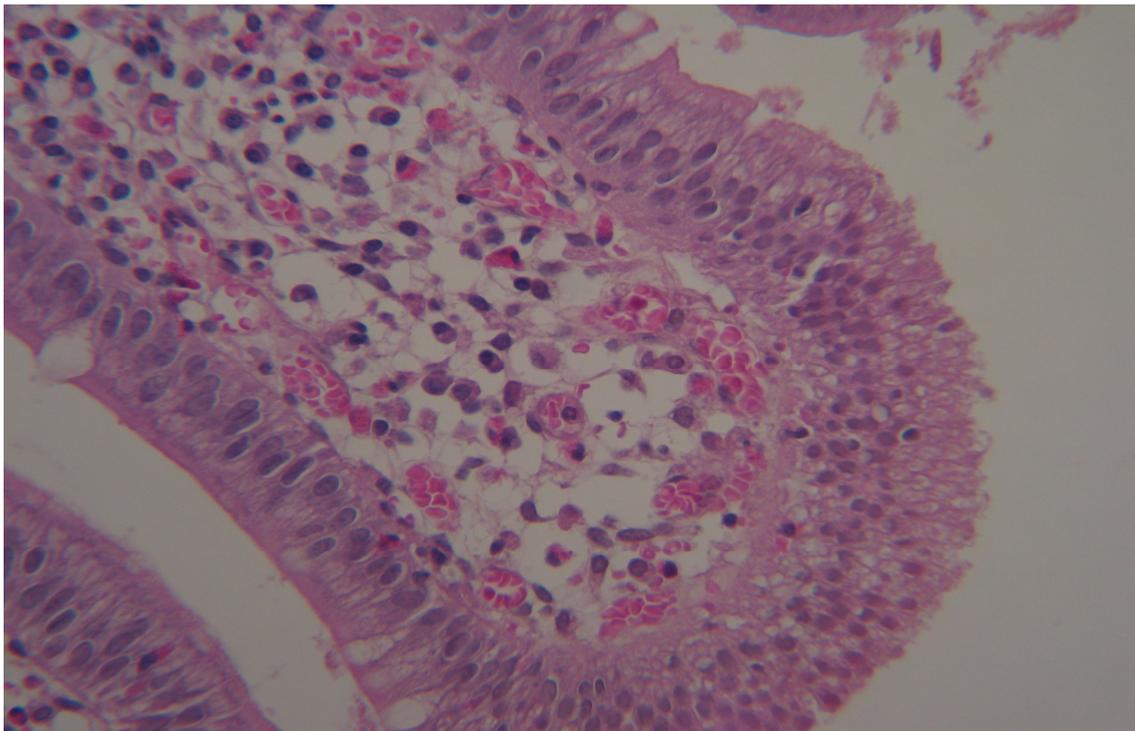
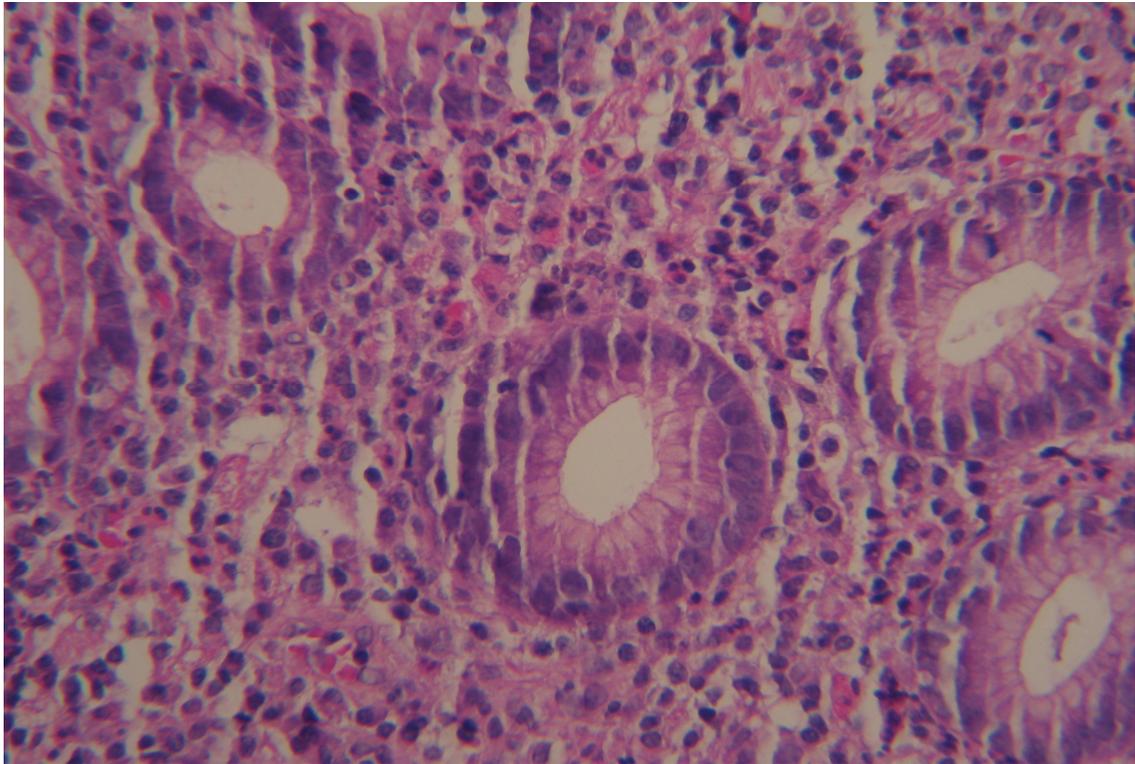


Figura 7. Immagini istologiche di stomaco (in alto) e duodeno (in basso) di un paziente con storia di MALToma. La diagnosi istologica corrispondente a queste immagini è stata di “quadro reattivo”, ma la positività della FCM ha indotto a ripetere dopo poco la biopsia che ha rivelato la recidiva del MALToma.
Colorazione Ematossilina-Eosina; ingrandimenti 63X (in alto) e 40X (in basso).

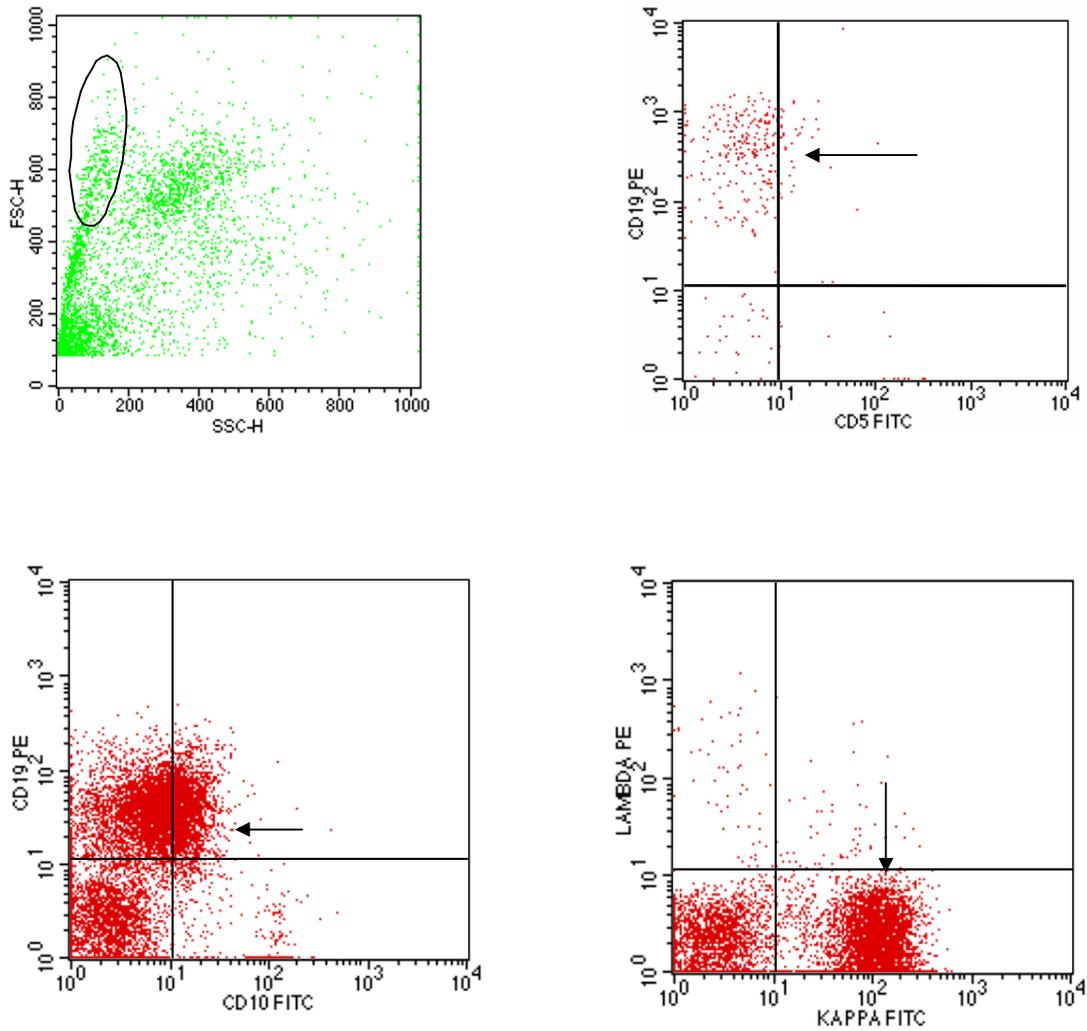


Figura 8.

Grafici citometrici di stomaco e duodeno relativi alla stessa biopsia della figura 7.

I grafici in alto mostrano a sinistra il *gate* (area delimitata) sui linfociti e a destra la prevalenza di linfociti B (CD19+>CD5+) (freccia).

I grafici in basso mostrano a sinistra una debole positività per CD10 e a destra la evidente restrizione clonale per la catena k (freccie).

L'insieme di queste informazioni depone per un LNH marginale-MALToma. Questo dato, non in sintonia con la diagnosi istologica negativa, ha determinato la decisione di ripetere a breve tempo la biopsia che ha rivelato la recidiva del MALToma.

Per gentile concessione del Prof. Luigi Del Vecchio

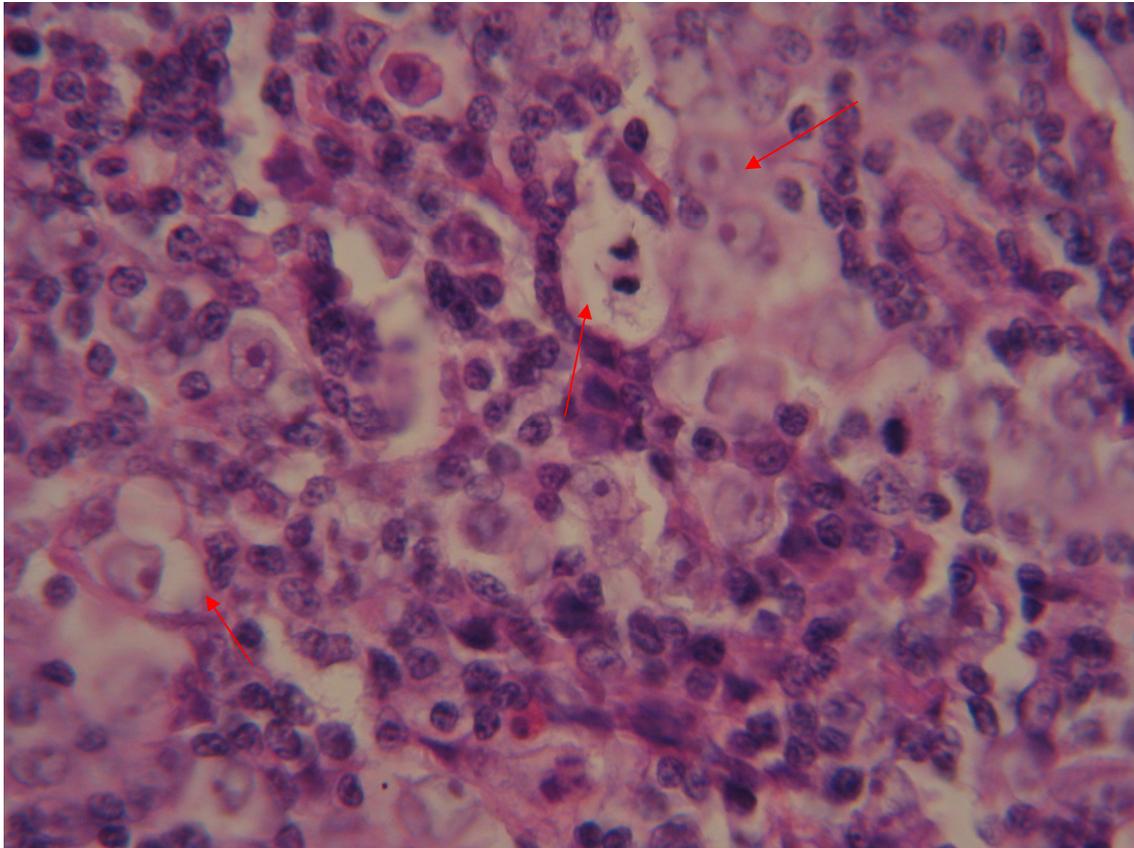


Figura 9.
Immagine istologica di un linfonodo di un paziente affetto da linfoma di Hodgkin.
Le frecce indicano le cellule di *Reed-Sternberg*.
Colorazione Ematossilina-Eosina; ingrandimento 63X.

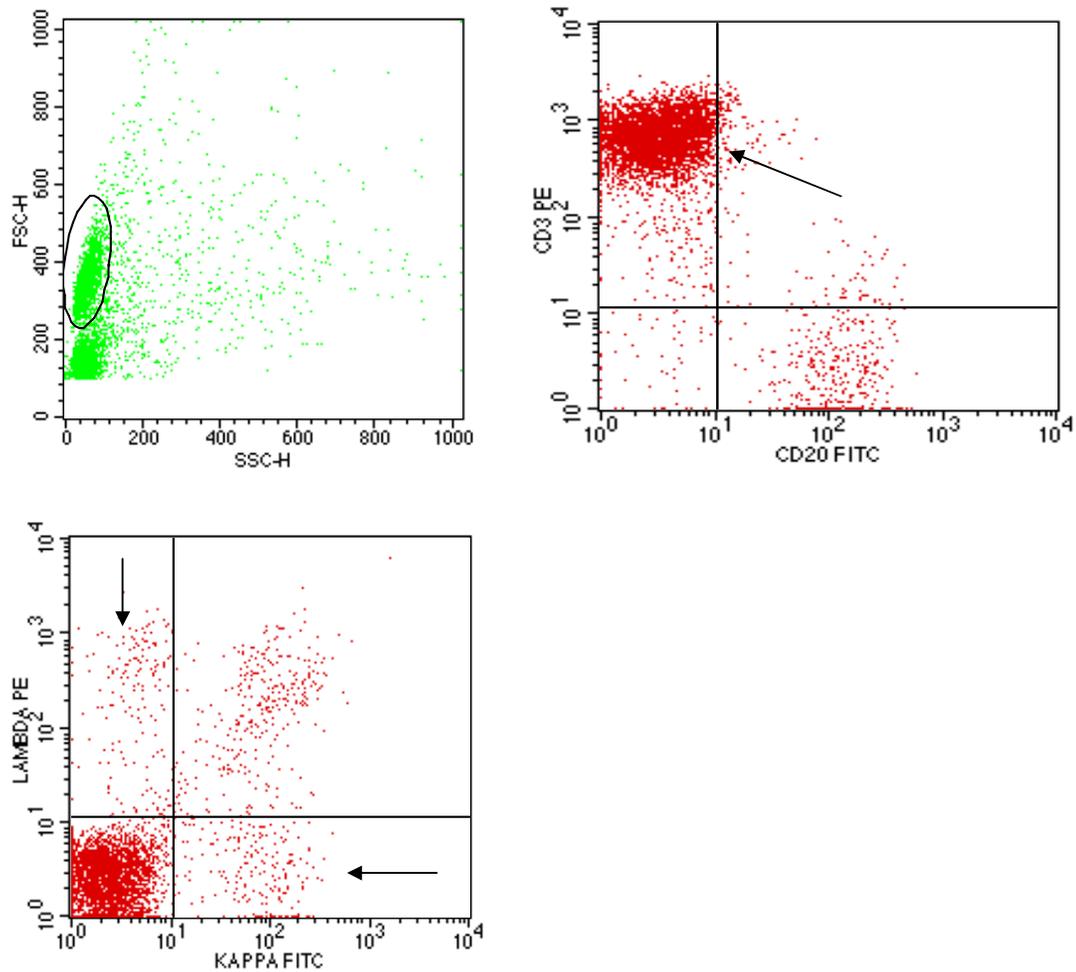


Figura 10.

Grafici citometrici di cellule di linfonodo (lo stesso della figura 9) di un paziente affetto da linfoma di Hodgkin.

I grafici in alto mostrano a sinistra il *gate* (area delimitata) sui linfociti e a destra la prevalenza di linfociti T (CD3+) (freccia), tipica dei tessuti interessati da LH.

Il grafico in basso mostra l'assenza di restrizione clonale di κ o λ (freccie).

Dai tre grafici emerge quindi un quadro di proliferazione reattiva, che giustifica la scarsa sensibilità della citofluorimetria per il linfoma di Hodgkin.

Per gentile concessione del Prof. Luigi Del Vecchio

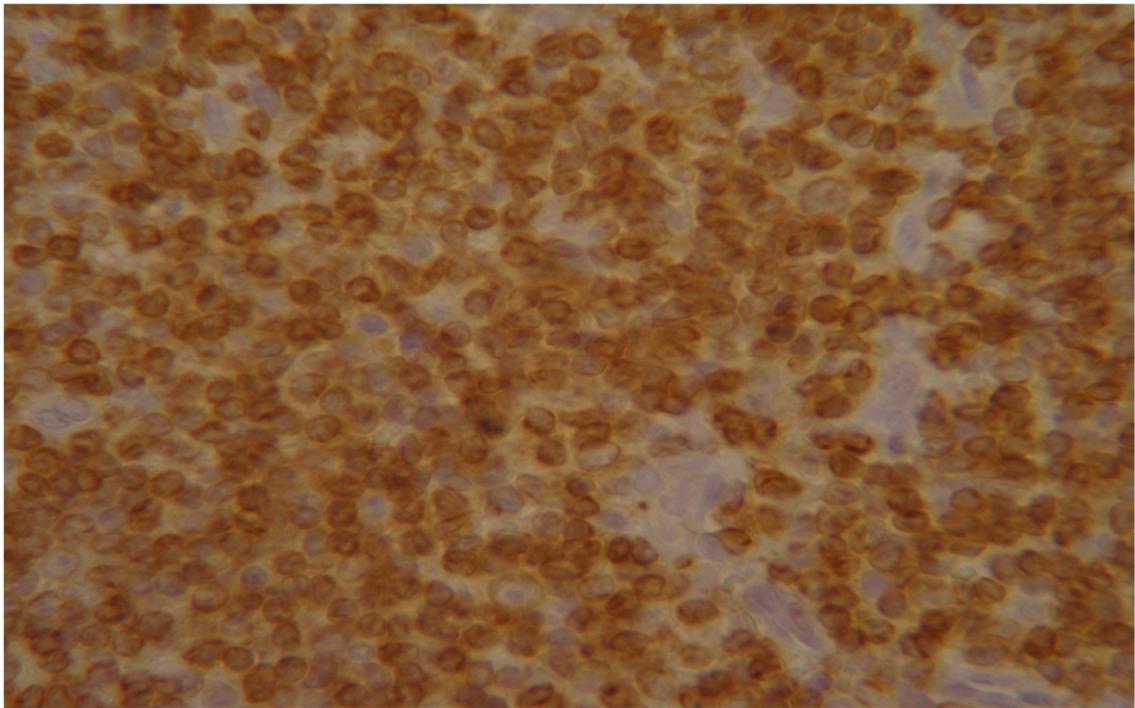
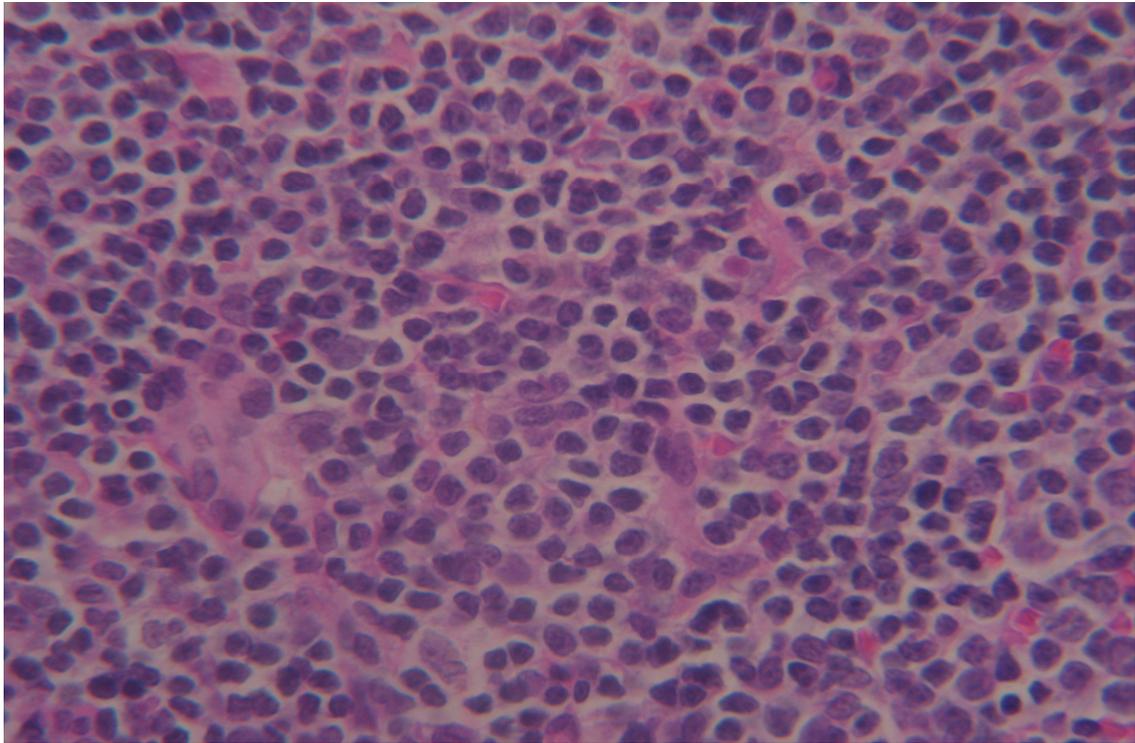


Figura 11.
Immagini istologiche di un linfonodo di un paziente affetto da LNH follicolare.
In alto, colorazione Ematossilina-Eosina.
In basso, l'immunoistochimica per BCL-2.
Ingrandimenti 63X.

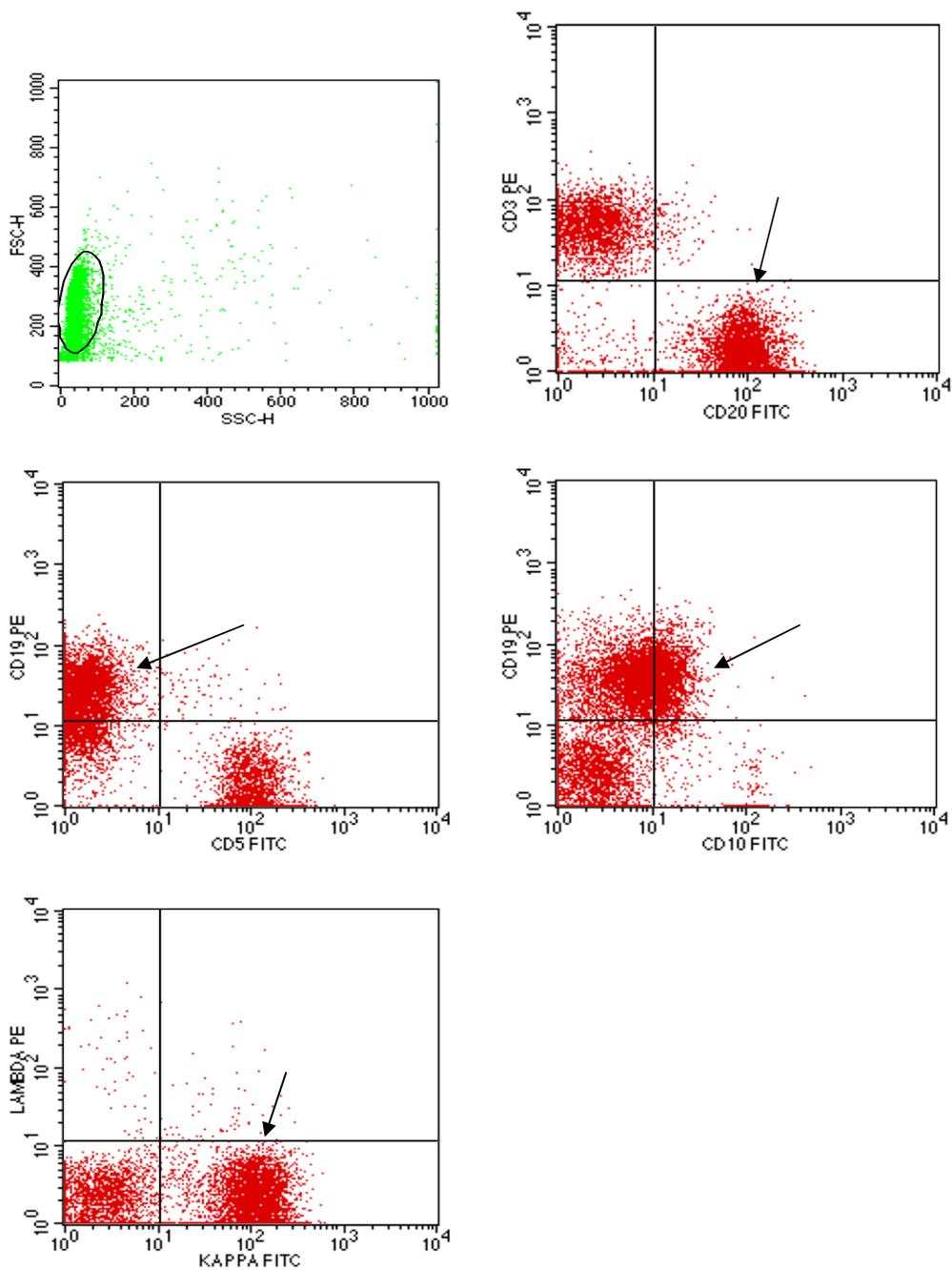


Figura 12.

Grafici citometrici di cellule di linfonodo (lo stesso della figura 11) di un paziente affetto da LNH follicolare.

I grafici in alto mostrano a sinistra il *gate* (area delimitata) sui linfociti e a destra la prevalenza di linfociti B (CD20+>CD3+) (freccia).

I grafici al centro mostrano a sinistra la negatività dei linfociti B (CD19+) per il CD5, e a destra la loro positività per il CD10 (freccie).

Il grafico in basso mostra l'evidente restrizione clonale per la catena k (freccia).

L'insieme di queste informazioni depone per un LNH follicolare.

Per gentile concessione del Prof. Luigi Del Vecchio

Capitolo 7 - DISCUSSIONE

La diagnosi di linfoma e di altre SLP si basa principalmente sulla morfologia, ma l'accuratezza diagnostica è notevolmente aumentata per l'uso di tecniche ancillari quali l'immunofenotipizzazione e l'analisi genetica. Questo approccio multiparametrico è raccomandato dalla recente classificazione REAL/WHO¹³⁻¹⁵ dei tumori linfoidei. Sebbene l'immunofenotipizzazione sia solitamente praticata a mezzo dell'esame immunoistochimico, la FCM rappresenta un metodo alternativo rapido ed affidabile, come testimoniano i numerosi lavori presenti in letteratura; di questi, tuttavia, pochi hanno riguardato l'applicazione della metodica a biopsie di tessuti sospetti per SLP.

Nel nostro studio abbiamo ottenuto da 56 pazienti 65 biopsie di tessuti sospettati di essere sede di SLP. In tutti i casi sono stati ricavati almeno 2 frammenti da ciascuna biopsia, da destinarsi all'esame istologico-immunoistochimico ed alla tipizzazione citofluorimetrica.

Nel complesso, la FCM ha individuato 27 delle 39 SLP processate, rivelando una **sensibilità** del 67%. Se si considera che dei restanti 12 casi 7 sono stati LH, neoplasia per la quale è oramai riconosciuta l'impossibilità di una individuazione basata sull'immunofenotipo, la sensibilità della FCM per LNH sale all'84,3% (27/32), ed i LNH falsamente negativi si riducono a sole 5 biopsie. Due di queste sono risultate negative anche all'esame istologico (la diagnosi è

scaturita da un FNAC successivo), dato, questo, che suggerisce fortemente che la zona biopsizzata non era sede di malattia. Pertanto le biopsie verosimilmente sedi di LNH che sono risultate negative alla FCM si riducono a solo 3.

La sensibilità per LH è stata nulla, ma il dato non tragga in inganno: un *pattern* reattivo alla FCM in presenza di dati clinici, laboratoristici e strumentali suggestivi di linfoma dovrebbe infatti andarsi a configurare come un elemento a disposizione del clinico e dell'Anatomopatologo nella esclusione di un non Hodgkin. Con questa affermazione non si vuole utilizzare un risultato negativo per trarre, per esclusione, conclusioni positive; sarebbe clinicamente, statisticamente e deontologicamente scorretto. In realtà è la conoscenza della biologia del LH ad indicare come in questa neoplasia la massa tumorale sia, per oltre il 99%, costituita da cellule reattive: si dovrà quindi in questi casi interpretare un dato immunofenotipico di quadro reattivo come un elemento suggestivo di proliferazione reattiva ad uno stimolo cellulare tumorale.

Il **valore predittivo positivo** (VPP) per SLP della FCM è stato, escludendo le diagnosi definitive inconclusive, del 100% (24/24).

Il **valore predittivo negativo** (VPN) per SLP della FCM è stato del 64% (21/33); questa percentuale sale all'81% (21/26) escludendo i LH.

La **specificità** per SLP si è rivelata del 100% (21/21), e questo dato concorda pienamente con i lavori analoghi presenti in letteratura.

Ma cosa ha aggiunto in sostanza la FCM alla tradizionale diagnosi istologica?

Il dato più eclatante riguarda le **revisioni**.

In 2 casi, la evidente positività per SLP della FCM, in presenza di un referto istologico negativo ha indotto l'Anatomopatologo a rivisitare il campione ed a rivedere la prima diagnosi e propendere per un quadro di malignità.

In un altro caso la revisione ha riguardato la diagnosi istologica di istotipo (da LNH follicolare a mantellare), alla luce del dato citofluorimetrico di positività per il CD5 (vedi tabella 2, pagg. 18-19).

Un altro dato importante è relativo alle **diagnosi definitive inconclusive**.

Nei 4 campioni (6,1%) in cui è risultata positiva la sola FCM, l'opzione relativa ad un monitoraggio clinico e strumentale intensivo è stata dettata da tale riscontro; senza il doppio studio, un routinario monitoraggio avrebbe potuto condurre ad una diagnosi intempestiva. In uno dei 4 campioni sopra descritti (frammento di circa 25 mm³), la diagnosi di linfoma dell'orbita è stata posta con una ripetizione della biopsia effettuata in tempi relativamente brevi perché, nonostante il

riscontro istologico di tessuto normale di ghiandola lacrimale, la FCM aveva indicato un'atipica proliferazione linfocitaria. Il monitoraggio oculistico ha, in questo caso, rinunciato ad una prolungata terapia antinfiammatoria, preferendo la rivisitazione chirurgica dell'orbita.

Relativamente al **tipo di biopsia**, i risultati riportati aprono il campo ad alcune considerazioni.

I linfonodi sono gli organi sottoposti con maggiore frequenza a biopsia nel sospetto di linfoma. Su 34 biopsie **linfonodali**, il contributo determinante della FCM è consistito nell'induzione di una revisione istologica di natura (da iperplasia reattiva a LNH) e di una di istotipo (da LNH follicolare a mantellare). Per il resto, fatta eccezione dei LH, la FCM ha sempre avallato (in 1 caso dopo revisione), col suo dato immunofenotipico, la diagnosi istologica. In effetti, la consueta ampia disponibilità di materiale per l'esame istologico in biopsie generalmente ottenute da organi (appunto i linfonodi) di dimensioni aumentate ed il fatto che il LH (per la cui diagnosi è imprescindibile l'aspetto morfologico) si localizzi quasi sempre nei linfonodi, indicano come l'Istologia rimanga un cardine insostituibile nella diagnostica delle SLP a sede linfonodale.

Un discorso diverso meritano invece le biopsie **gastrointestinali**, sempre più indagate, con l'aumentare delle conoscenze biologiche in materia di SLP, quali probabili sedi

di LNH (principalmente MALTomi). Su 24 biopsie gastrointestinali, la FCM ha concordato con la diagnosi istologica in 20 casi. Nei restanti casi ha svolto un ruolo determinante nell'indurre una revisione istologica di natura (da iperplasia reattiva a MALToma) in un caso, mentre in 3 casi è stata la sua positività per SLP a far optare, in presenza di una persistente negatività alla istologia, per uno stretto monitoraggio in un paziente con storia di MALToma (quindi presumibilmente interessato da recidiva minima di malattia). Quest'ultima considerazione è corroborata dal dato, oramai affermato in letteratura,^{40, 43, 44} della virtuale assenza di falsi positivi all'esame citofluorimetrico: è assai improbabile che un'immunofenotipizzazione ben condotta possa indicare come maligna una cellula che non lo è. Se poi si considera che le biopsie gastrointestinali forniscono generalmente scarso materiale per l'esame istologico e che la localizzazione gastrointestinale del LH (per il quale, lo ripetiamo, la FCM è ancora una tecnica cieca) sia una vera rarità, si può dedurre come oggi la FCM rappresenti particolarmente nelle biopsie gastrointestinali un ausilio fondamentale, così come sottolineato in un altro lavoro.⁴¹

Le biopsie **cutanee** sono state solo 5, poche per poter trarre conclusioni significative. Possiamo però sottolineare che in 3 dei 4 LNH cutanei la diagnosi è scaturita dal solo risultato istologico, con una FCM negativa.

Anche se solo 2, le biopsie da ghiandola lacrimale possono essere indicate quali esempio del nuovo ruolo suggerito per la diagnostica combinata. Infatti, in assenza del dato citofluorimetrico di proliferazione linfocitaria atipica, la negatività istologica della prima di queste 2 biopsie avrebbe potuto far optare per un follow-up a lunga scadenza con terapia solo sintomatica, anziché per una nuova biopsia, come in effetti è stato, che ha evidenziato un LNH.

Inoltre, come già osservato da Martinez et al,³⁵ sottolineiamo come la diagnosi di **linfoma composito** sia emersa solo grazie alla integrazione delle due metodiche, avendo l'istologia ravvisato un interessamento da LH, e la FCM una SLP del tipo LNH.

Infine è d'uopo segnalare come in due casi di LNH entrambe le metodiche si siano rivelate negative e la diagnosi sia giunta solo grazie ad un **FNAC** praticato in ragione del persistere della sintomatologia e delle alterazioni di laboratorio; è possibile che la biopsia abbia riguardato una parte di tessuto non interessato da malattia, e ciò conferma l'importanza del ruolo del FNAC quale utile strumento diagnostico, ottimizzato dalla guida ecografica.¹ L'insegnamento più costruttivo probabilmente è anche nel fatto che nessuna tecnica, per quanto affidabile, potrà mai sostituirsi all'intuizione ed al ragionamento clinico.

Capitolo 8 - CONCLUSIONI

Di seguito si riportano le principali conclusioni del lavoro.

- *Fattibilità della diagnosi combinata.*

La diagnosi combinata è stata agevolmente possibile dedicando attenzione alla correttezza delle operazioni di biopsia, conservazione e trasporto del campione da analizzare.

- *Metodologia solo apparentemente più impegnativa.*

La necessità di una maggiore quantità di tempo è uno svantaggio minimo rispetto ai vantaggi in termini di risultati.

- *Sinergia delle due metodiche.*

Le due metodiche, integrandosi, forniscono un contributo nettamente superiore a quanto si potrebbe ottenere da una sola di esse, venendosi a realizzare un effetto che, con linguaggio matematico, potremo definire sinergico più che additivo.

- *Buona sensibilità e specificità della FCM.*

La FCM ha dimostrato una sensibilità per SLP del 67% (83% escludendo i LH) ed una specificità del 100%.

- *Ruolo della FCM nelle revisioni.*

Una FCM positiva è un fondato motivo per rivisitare un preparato istologico dato inizialmente per negativo.

- *FCM: "l'altra campana".*

Una FCM positiva con istologia negativa non permette di fare diagnosi, ma è un importante campanello d'allarme che suggerisce un serrato monitoraggio.

- *Alta efficacia della FCM per pezzi piccoli e dubbi.*

Campioni di dimensioni minime come quelli gastrointestinali o biopsie dalla dubbia interpretazione istologica beneficiano più di altri del contributo della FCM.

- *Contributo della FCM nei linfomi compositi.*

- *Scarsa efficacia della FCM nei linfomi cutanei.*

Nel complesso, i risultati di questo studio hanno dimostrato l'efficacia della diagnostica combinata nella caratterizzazione estesa di fenotipi cellulari patologici.

La rapida acquisizione con FCM (in media 2 ore) di un fenotipo di membrana è, senza ombra di dubbio, un dato estremamente costruttivo a predisporre l'osservazione della struttura di un tessuto patologico, anche per accelerarne gli specifici approfondimenti con le metodiche istologiche, intrinsecamente bisognose di tempi più lunghi.

La procedura combinata consente anche allo studio istologico del tessuto di procedere da uno stadio più avanzato, avendo già acquisito i dati del fenotipo cellulare. Se questo è vero, appare ancor più evidente, allora, l'efficacia della metodica combinata relativa soprattutto ad esigui pezzi bioptici.

BIBLIOGRAFIA

1. Picardi M, Gennarelli N, Ciancia R, De Renzo A, Gargiulo G, Ciancia G, Sparano L, Zeppa P, Martinelli V, Pettinato G, Lobello R, Pane F, Rotoli B
Randomized comparison of power Doppler ultrasound-directed excisional biopsy with standard excisional biopsy for the characterization of lymphadenopathies in patients with suspected lymphoma
J Clin Oncol 2004; 22: 3733-3740
2. Slap GB, Brooks JSJ, Schwartz JS
When to perform biopsies of enlarged peripheral lymph nodes in young patients
JAMA 1994; 252: 1321-1326
3. Slap GB, Connor JL, Wigton RS, Schwarz JS
Validation of a model to identify young patients for lymph node biopsy
JAMA 1996; 255: 2768-2773
4. Landgren O, Porwit MacDonald A, Tani E, Czader M, Grimfors G, Skoog L, Ost A, Wedelin C, Axedorph U, Svedmyr E, Bjorkholm M
A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas
Hematol J. 2004; 5: 69-76
5. Jeffers MD, Milton J, Herriot R, McKean M
Fine needle aspiration cytology in the investigation of non-Hodgkin's lymphoma
J Clin Pathol 1998; 51: 189-196
6. Zardawi IM, Jain S, Bennett G
Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy
Diagn Cytopathol 1998; 19: 274-278
7. Meda BA, Buss DH, Woodruff RD, Cappellari JO, Rainer RO, Powell BL, Geisinger KR
Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytology and flow cytometry
Am J Clin Pathol 2000; 113: 688-699
8. Ravinsky E, Morales C, Kutryk E, Chrobak A, Paraskevas F
Cytodiagnosis of lymphoid proliferations by fine needle aspiration cytology. Adjunctive value of flow cytometry
Acta Cytol 1999; 23: 1070-1078

9.Rappaport H

Tumours of the hematopoietic system

Armed Forces Institute of Pathology 1966; Publication 91: 97-98

10.Lukes RJ

Functional classification of malignant lymphoma of Lukes and Collins

Recent Results Cancer Res. 1978; 64: 19-30

11.Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G, Sundstrom C, Lennert K, van Unnik JA, Mioduszezwska O, et al

Updated Kiel classification for lymphomas

Lancet 1988; 1: 292-3

12.National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project

Cancer 1982 May 15; 49: 2112-35

13.Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA

A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group

Blood 1994; 84: 1361-1392

14.Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J

Lymphoma classification-From controversy to consensus: The REAL and WHO classification of lymphoid neoplasms

Ann Oncol 2000; 11: 3-10

15.Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD

The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissue: report of the clinical advisory committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997

Histopathology 2000; 36: 69-87

16.Mouraud WA, Tulbah A, Shoukri M, Al Dayel F, Akhtar M, Ali MA, Hainau B, Martin J

Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine needle aspiration: cytomorphic and immunophenotypic approach

Diagn Cytopathol 2003; 28: 191-195

17. Picardi M, Del Vecchio L, De Renzo A, Zeppa P, Luciano L, Rotoli B
Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology combined with flow cytometric immunophenotyping for rapid characterization of deep-seated non-Hodgkin's lymphoma recurrence
Haematologica 2003; 88: 356-358
18. Zeppa P, Marino G, Troncone G, Fulciniti F, De Renzo A, Picardi M, Benincasa G, Rotoli B, Vetrani A, Palombini L
Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin's lymphoma. A critical review of 307 cases with technical suggestions
Cancer 2004; 102: 55-65
19. Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB
Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma: a retrospective analysis of the utility of cytomorphology and flow cytometry
Mod Pathol 2001; 14: 472-481
20. Chen Y, Savargaonkar P, Fuchs A, Wasserman P
Role of flow cytometry in the diagnosis of lymphadenopathy in children.
Diagn Cytopathol 2002; 26: 5-9
21. Catovsky D
Symposium: classification of leukemia. 1. The classification of acute leukaemia.
Pathology 1982; 14: 277-281
22. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Van't Veer MB
Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)
Leukemia 1995; 9: 1783-1786
23. Glaser SL, Jarret RF
The epidemiology of Hodgkin's Disease
Baillieres Clin Haematol 1996; 9: 401-416
24. Compton CC, Ferry JA, Ross DW
Protocol for the examination of specimen from patients with Hodgkin's disease
Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 75-80
25. Tilly H, Bastard C, Delastre T, Duval C, Bizet M, Lenormand B, Dauce JP, Monconduit M, Piguet
Cytogenetic Studies in Untreated Hodgkin's Disease
Blood 1991; 77: 1298-1304

26. Jennings CD, Foon KA
Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy
Blood 1997; 90: 2863-2892
27. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M
Report of the committee on Hodgkin's disease staging
Cancer Res 1971; 31: 1860-1
28. Mounter PJ, Lennard AL
Management of non-Hodgkin's lymphoma
Postgrad Med J 1999; 75: 2-6
29. Fisher RI
Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging and treatment
Semin Oncol 2003; 30: 3-9
30. Stetler-Stevenson M, Braylan RC
Flow cytometry analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders
Semin Hemat 2001; 38: 111-123
31. Braylan RC
Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias
Cytometry 2004; 58A: 57-61
32. Brando B
L'immunofenotipizzazione cellulare in citometria a flusso
Biochimica clinica, 1990; 14: 489-497 e 1709-1718
33. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy Jr P, Lovett EJ, Schwartz A
U.S.-Canadian consensus recommendation on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures
Cytometry 1997; 30: 214-230
34. Kaleem Z, Zehnbauser BA, White G, Zutter MM
Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B-cell non-Hodgkin lymphoma
Am J Clin Pathol 2000; 113: 399-405
35. Li S, Eshlman JR, Borowitz MJ
Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma
Am J Clin Pathol 2002; 118: 229-234

36. Chizuka A, Kanda Y, Nannya Y, Oshima K, Kaneko M, Yamamoto R, Suguro M, Hamaki T, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Togawa A
The diagnostic value of kappa/lambda ratios determined by flow cytometry analysis of biopsy specimens in B-cell lymphoma
Clin Lab Haem 2002; 24: 33-36
37. Fukushima PI, Nguyen PK, O'Grady P, Stetler-Stevenson M
Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia
Cytometry 1996; 26: 243-52
38. Gorczyca W, Weisberger J, Liu Z, Tsang P, Hossein M, Wu CD, Dong H, Wong J, Tugulea S, Dee S, Melamed MR, Darzynkiewicz Z
An Approach to Diagnosis of T-cell Lymphoproliferative Disorders by Flow Cytometry
Cytometry 2002; 50: 177-190
39. Sánchez I, Serrano J, García JM, Román J, Casaño J, Torres A
Flow cytometry of cell suspensions from lymphnodes: immunophenotype, DNA content and proliferative rate are strongly correlated with histopathology diagnosis.
Haematologica 1999; 84: 762-763
40. Martinez A, Aymerich M, Castillo M, Colomer D, Bellosillo B, Campo E, Villamor N
Routine use of immunophenotype by flow cytometry in tissues with suspected hematological malignancies
Cytometry 2003; 56: 8-15
41. Almasri NM, Zaer FS, Iturraspe JA, Braylan RC
Contribution of flow cytometry to the diagnosis of gastric lymphomas in endoscopic biopsy specimens
Mod Pathol 1997; 10: 650-656
42. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, Rothe G, Lacombe F, Lanza F, Papa S, Lucio P, San Miguel JF
Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions
Clinical Chemistry 1999; 45: 1708-1717
43. Dunphy CH
Application of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic Hematopathology
Arch Pathol Lab Med 2004; 182: 1004-1022
44. Morse EE, Yamase GT, Greenberg BR, Sporn J, Harshaw SA, Kiraly TR, Ziemba RA, Fallon MA
The role of flow cytometry in the diagnosis of lymphoma: a critical analysis
Ann Clin Lab Sci 1994; 24: 6-11

45. Dunphy CH
Contribution of flow cytometry immunophenotyping to the evaluation of tissues with suspected lymphoma
Cytometry 2000; 42: 296-306
46. Wu H, Smith M, Millenson MM, Nicolaou N, Van Deerlin VM, Addya K, Lessin S, Al Saleem T
Contribution of flow cytometry to the diagnosis of cutaneous lymphoid lesions
J Invest Dermatol 2003; 121: 1522-1530
47. Ravoet C, Demartin S, Gerard R, Dehon M, Peny MO, Petit B, Delannoy A, Husson B
Contribution of flow cytometry to the diagnosis of malignant and non malignant conditions in lymph node biopsies
Leuk Lymphoma 2004; 45: 1587-1593
48. Sun XM, Chen JH, Xu JY, Zhang YF, Xie PH, Fan XN, Xie W
Immunophenotype analysis in 121 patients with lymphoproliferative diseases by flow cytometry
Ai Zheng 2004; 23: 955-957
49. Hsu RM, Raine L, Fanger H
The use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures
J hist cytochem 1981; 29: 577-580
50. Davis BH, Foucar K, Szczarkowski W, Ball E, Witzig T, Foon KA, Wells D, Kotylo P, Johnson R, Hanson C, Bessman D
U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications.
Cytometry 1997; 30: 249-263
51. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker JW, Picker L, Stetler-Stevenson M
U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data analysis and interpretation
Cytometry 1997; 30: 236-244
52. Harrison, **Principi di Medicina Interna**, McGraw-Hill Editore, Milano, 2002
53. Djulbegovic, **Il processo decisionale in ematologia**, Centro Scientifico Editore, Milano, 1994
54. Hoffmann, **Hematology**, Churchill Livingstone Editore, New York, 2002