
Serie di Ematologia di Laboratorio - a cura del GdS-E SIMeL

Gli analizzatori ematologici a flusso: storia di una tecnologia in continua evoluzione.

Parte I: il metodo ad impedenza

M. Buttarello

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Azienda USL 16, Padova
Segretariato del Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi Ematologici e di Laboratorio (CISMEL)

Riassunto

Nei laboratori clinici di tutto il mondo sono presenti analizzatori ematologici a flusso in grado di fornire decine di parametri a partire da una piccola aliquota di sangue.

I metodi di misura utilizzati sono riconducibili a due principi fondamentali: il principio ad impedenza e il principio ottico. Il principio ad impedenza venne formalmente inventato da W. Coulter nel 1949 e consentiva il conteggio e la misura del volume delle cellule analizzate.

Questo metodo è stato reso più affidabile e ne sono state estese le applicazioni grazie a numerosi miglioramenti: dalla focalizzazione idrodinamica alla correzione per la coincidenza, dalla ricognizione ed eliminazione degli impulsi anomali all'uso di lisanti selettivi per differenziare le varie popolazioni leucocitarie.

La commercializzazione del Coulter Model S, dotato di valvola campionatrice e di correzione automatica per la coincidenza, avvenuta nel 1968 ha rivoluzionato l'attività dei laboratori di ematologia. Un metodo simile ma basato su misure capacitive piuttosto che resistive venne messo a punto alla fine degli anni '50 in Giappone e costituì la base per i primi analizzatori commerciali prodotti dalla TOA (oggi Sysmex). Un'ulteriore estensione del principio Coulter è consistita nell'utilizzo contemporaneo di correnti a bassa e ad alta frequenza per sondare diverse caratteristiche cellulari: la dimensione con la prima e la composizione e la struttura interna con la seconda. Queste misure biparametriche sono state applicate commercialmente a partire dal 1986 con i trasduttori VCS di produzione Coulter e dal 1988 con gli analizzatori della serie NE di produzione Sysmex.

Parole chiave: analizzatori ematologici, metodo ad impedenza, principio Coulter.

Summary

Hematology flow analyzers: history of continuously evolving technology.

Part 1: the impedance method

Automated flow cytometers that provide dozens of parameters from a small sample of blood can be found in clinical laboratories the world over.

The methods used are based on two fundamental principles: electrical resistance or impedance and optical analysis. The principle of impedance was formally invented by W. Coulter in 1949 and enabled cytometers to count and measure the volume of cells analyzed.

This method was made more reliable and its application was extended thanks to many improvements: from hydrodynamic focusing to the correction for coincidence, from the recognition and elimination of abnormal signals to the use of lysing agents which are selective for various leukocyte populations.

The production in 1968 of the Coulter Model S, with sampling valve and automatic correction for coincidence, revolutionized the activity of hematological laboratories.

A similar method, based on capacitance rather than resistance measurements, was developed in the 1950s in Japan and constituted the basis for the first analyzers commercially produced by TOA (now Sysmex).

A further extension of Coulter's principle consisted of the contemporary use of low and high frequency current to examine different cell characteristics: size in the first case and composition and internal structure in the second. These biparametric measurements were applied commercially starting in 1986 with the VCS transducers produced by Coulter and in 1988 with the NE series of analyzers produced by Sysmex.

Key words: hematology analyzers, aperture impedance method, Coulter principle.

Introduzione

Gli analizzatori ematologici a flusso sono presenti nei laboratori clinici e in molti laboratori di ricerca di tutto il mondo. Quello che oggi appare come uno strumento relativamente semplice e in grado di fornire da una piccola aliquota di sangue decine di differenti parametri ha una storia evolutiva lunga e articolata. I metodi di misura utilizzati sono riconducibili a due principi fondamentali: il principio “ad impedenza” (o “electronic method”) e il principio a “dispersione di luce” (noto universalmente come “optical flow method”). In entrambi i casi le cellule da analizzare, allo stato nativo o preventivamente modificate, vengono sospese in un fluido di trasporto e introdotte sequenzialmente, per iniezione o aspirazione, nella zona sensibile dell'apparato di rilevazione (trasduttore). Qui è possibile, per ciascuna cellula, ottenere informazioni su alcune caratteristiche fisiche come la dimensione, la struttura, il colore o la fluorescenza, che ne consentono il conteggio e l'identificazione. In taluni casi è possibile avere ulteriori indicazioni sullo stato funzionale, sulla vitalità, sul contenuto in acidi nucleici, o, con l'utilizzo di anticorpi monoclonali, sulla presenza di determinati antigeni. Mentre a livello di prototipi o di strumenti da ricerca, si è cercato fin dall'inizio di associare i due metodi, per gli analizzatori ematologici commerciali l'applicazione e lo sviluppo sono avvenuti con modalità del tutto indipendenti e solo in tempi recenti si è giunti, su alcuni modelli, alla loro integrazione.

Il metodo ad impedenza

1) Analisi in corrente continua

Brevetto, teorie, esperimenti

Nel 1949 Wallace Coulter depositò un brevetto dal titolo “means for counting particles suspended in a fluid”¹, che, dopo alcune osservazioni e correzioni, venne concesso nel 1953². La prima descrizione formale del “principio Coulter” avvenne per opera dello stesso inventore nel 1956³. Il metodo proposto si basa sulla differenza di conducibilità elettrica fra una particella e il fluido in cui è sospesa. Se un foro, (“orifice” o “aperture”) di piccole dimensioni (diametro pari a circa 10 volte quello della particella e lunghezza variabile da 0.5 a 2.5 volte il diametro), riempito di fluido conduttore viene attraversato da una particella di minor conducibilità, di cui la cellula rappresenta un tipico esempio, si determina una variazione misurabile delle caratteristiche elettriche del circuito. In questo caso, trattandosi di un circuito resistivo, l'attraversamento dell'orifizio determina un aumento di resistenza che in accordo con la legge di Ohm, provoca una transitoria variazione di potenziale. Da questa idea derivò il primo analizzatore denominato Counter Model A, immesso sul mercato nel 1956 per opera dei fratelli Wallace e Joseph Coulter.

Poiché l'aumento di resistenza dipende dalla sostituzione da parte della cellula di un volume equivalente di

fluido conduttore, H.E. Kubitschek, nel 1958⁴, tentò di correlare l'ampiezza e l'area dell'impulso con il volume delle cellule analizzate. Questa proporzionalità venne accettata da molti ricercatori e iniziarono i primi tentativi di collegare allo strumento dei sistemi per raccogliere e analizzare l'altezza degli impulsi e ottenere le curve di distribuzione dei volumi cellulari. Nel caso degli eritrociti le distribuzioni dei volumi risultavano tutte invariabilmente asimmetriche e caratterizzate da una evidente deviazione verso i valori maggiori⁵⁻⁶. G. Brecher et al., nel 1962⁷, giustificarono questo comportamento con considerazioni di tipo biologico e sostennero che l'apparente distribuzione gaussiana dei diametri dei globuli rossi riportata da C. Price-Jones⁸ prediceva un'asimmetria nella distribuzione dei volumi. C.C. Lusbaugh et al.⁹ nello stesso anno evidenziarono che dalla distribuzione asimmetrica era possibile estrapolare due distinte popolazioni gaussiane e conclusero che nei soggetti normali dovevano coesistere due popolazioni eritrocitarie. All'epoca gli unici artefatti ammessi e tali da poter influenzare la distribuzione dei volumi erano i conteggi in coincidenza^{10,11}. Nel 1959 W. Coulter et. al.¹² depositarono un secondo brevetto che migliorava la parte elettronica: prevedeva infatti un amplificatore sensibile alla corrente piuttosto che alla tensione e questo permetteva di rendere gli impulsi indipendenti dalla conduttività dell'elettrolita; inoltre l'amplificatore era a doppia soglia (ciò consentiva di costruire una finestra elettronica modulabile), e, se collegato ad un plotter accessorio permetteva di cumulare la distribuzione degli impulsi su 25 canali. Questi miglioramenti resero più affidabile il dimensionamento cellulare, anche se non risolsero il problema della distribuzione asimmetrica, e vennero applicati all'analizzatore Counter Model B. Nel frattempo furono intrapresi numerosi esperimenti per analizzare il rapporto fra caratteristiche dell'impulso e dimensione delle particelle. M.A. Van Dilla et al.¹³ del Los Alamos National Laboratory nel 1964 migliorarono la distribuzione dei volumi eritrocitari usando orifizi “lunghi” ($L/D > 1.0$) che, sebbene aumentassero le coincidenze garantivano una maggior uniformità del campo elettrico, e conclusero per un'origine artefattuale dell'asimmetria. Nel 1965 M. Fulwyler¹⁴ che pure lavorava a Los Alamos, associò il principio ad impedenza con la tecnologia a getto d'inchiostro per stampanti (basata sulla deflessione elettrostatica di particelle cariche) appena sviluppata presso la Stanford University da R. Sweet, e costruì il primo cell-sorter. Una delle prime applicazioni di questo strumento fu lo studio della distribuzione dei volumi eritrocitari per verificare se la bimodalità fosse o meno fisiologica¹⁵. Separando e rianalizzando le cellule che costituivano le due distinte popolazioni ottenne per ciascuna di esse nuovamente una distribuzione bimodale dimostrandone finalmente l'origine artefattuale. Altri esperimenti, soprattutto ad opera di B. Bull¹⁶ e R. Thom¹⁷, condotti fra il 1968 e il 1969 evidenziarono che a parità di campione, mo-

Tabella I. Valori del fattore forma (F) per varie morfologie cellulari in relazione a quello di una sfera rigida.

<i>Cellula</i>	<i>Forma tipica nella zona sensibile</i>	<i>F</i>
- Eritrocita allo stato nativo	ellisse allungata	1.10
- Reticolocita	ellisse allungata	1.05
- Eritrociti conservati (sferoechinociti)	-	1.15
- Eritrocita fissato	disco biconcavo	1.20
- Sferocita	ellisse accorciata	1.25
- Leucocita	sferoide schiacciato	1.40
- Piastrina dopo permanenza in EDTA	sferoide schiacciato	1.40
- Sfera rigida	sfera	1.50

dificando le condizioni sperimentali, si poteva aumentare l'asimmetria della curva sino ad ottenere una netta distribuzione bimodale, o al contrario ridurla fino ad avere una simmetria quasi perfetta.

E.C. Gregg e K.D. Steidley nel 1965¹⁸ calcolarono il valore del "fattore forma" di una particella sferica ponendolo pari a 3/2 (1.5) e videro, senza peraltro fornire una spiegazione esauriente, che le caratteristiche dell'impulso a parità di altre condizioni quali il volume, variavano al variare della forma che la particella assumevano non solo all'interno ma anche intorno all'orifizio. La "zona sensibile" si estende infatti, da entrambi i lati oltre la lunghezza fisica dell'apertura.

J. Gutmann nel 1966¹⁹ ipotizzò che l'asimmetria delle distribuzioni dei volumi derivasse dal disomogeneo orientamento delle cellule nel flusso.

Nella seconda metà degli anni '60 L. Spielman e S.L. Goren a Berkeley²⁰ e R. Thom a Berlino¹⁷ misero a punto i primi metodi sperimentali di focalizzazione idrodinamica applicati al trasduttore Coulter. Questo accorgimento tecnico che obbliga le cellule ad una traiettoria assiale ebbe una prima applicazione commerciale con la compagnia AEG Telefunken di Ulm che lo applicò nel 1972 sul suo analizzatore "Partikelanalysegerat" basato sul principio resistivo. Il marchio venne successivamente acquistato dalla Coulter e lo strumento non venne più prodotto²¹. Anche l'analizzatore "Metricell" messo a punto da V. Kachel et al. nei primi anni '70 a Monaco²² utilizzava questo principio ma l'applicazione definitiva si ebbe nel 1983 con gli analizzatori della serie E prodotti dall'azienda giapponese TOA Medical Electronics. Più di recente anche altri Costruttori hanno adottato questo accorgimento, come la Abbott sugli analizzatori delle serie CD 4000 e Sapphire. L'effetto pratico più evidente della focalizzazione idrodinamica consisteva nel netto miglioramento delle curve di distribuzione dei volumi cellulari. Nel 1969 B.B. Shank et al.²³ utilizzando un apparato sperimentale che permetteva di predeterminare la traiettoria percorsa dalle cellule mentre attraversano l'orifizio, giustificavano la distribuzione asimmetrica dei volumi eritrocitari con la diversa deformazione che subiscono gli eritrociti in rapporto al percorso più o meno eccen-

trico rispetto all'asse dell'orifizio. Una completa elaborazione teorica del metodo ad impedenza si deve a N.B. Grover et al. che fra il 1969 e il 1972 pubblicarono alcuni lavori²⁴⁻²⁶ nei quali venivano discussi gli effetti del campo elettrico, del fattore forma e delle caratteristiche idrodinamiche del flusso sul dimensionamento cellulare. Il volume assoluto di una particella che attraversa l'orifizio si può ottenere con un'equazione basata sui calcoli di S. Velick e M. Goren²⁷, N.B. Grover²⁴, e riportata da V. Kachel²²:

$$v = \frac{s^2 \cdot f_k \cdot \Delta E}{\rho \cdot i \cdot F}$$

dove:

v: volume della particella

s: sezione trasversa dell'orifizio

f_k: fattore di correzione dipendente dalle dimensioni dell'orifizio e dal percorso della particella

ρ: resistività del mezzo di sospensione

i: corrente attraverso l'orifizio

F: fattore forma della particella

ΔE: ampiezza dell'impulso

Il valore di f_k è prossimo all'unità solo nel caso di orifizi lunghi e assume valori in aumento nel caso dei ben più diffusi (per limitare la coincidenza) orifizi corti. In quest'ultimo caso tuttavia il valore dipende dalla traiettoria poiché sono sufficienti lievi spostamenti laterali per avere significativi aumenti di f_k²⁸.

Fattore forma, impulsi anomali e coincidenza

Il valore numerico del fattore forma (F) può variare da 1.0 per particelle molto fini e allungate, a 1.5 per una sfera, fino a 2.8 per oggetti di forma appiattita che attraversino l'orifizio esponendo costantemente la sezione maggiore^{29,30} (Tab. I). Gli eritrociti allo stato nativo, per effetto dello stress idrodinamico assumono una forma affusolata, tuttavia la loro deformabilità, oltre che da eventuali alterazioni del citoscheletro, dipende dalla viscosità interna che è correlata alla concentrazione emoglobinica (HC). Il valore di questa varia nei singoli globuli rossi sia in condizioni fisiologiche che patologiche potendo essere compresa fra 25 e 50 g/dL³¹.

Le ampie oscillazioni di HC comportano altrettanti effetti sul valore di F , che varia dunque da cellula a cellula. Come conseguenza la misura del volume della singola cellula può risultare inaccurata e ciò si ripercuote sul calcolo del volume corpuscolare medio (MCV) e della concentrazione corpuscolare media (MCHC) che da questo deriva, specialmente quando il campione contiene un'elevata proporzione di cellule con valori estremi di HC. Per risolvere questi problemi sarebbe necessario conoscere il fattore forma di ogni cellula analizzata e correggere di conseguenza il volume misurato. R. Thom³² propose nel 1972 un metodo basato sull'utilizzo di due orifizi geometricamente diversi e posti in serie. Il primo, particolarmente "corto" (con una lunghezza di soli 15 micron), genera un impulso la cui durata dipende essenzialmente dalla lunghezza della particella, mentre il secondo lungo 40 micron è sensibile prevalentemente al volume. La differenza fra le caratteristiche dell'impulso (rapporto fra ampiezza e durata) nei due trasduttori permette di calcolare il fattore forma. Nell'uso pratico tuttavia questo sistema non ebbe applicazioni. Nel 1979 M.R. Groves e W. Coulter³³ brevettarono un apparato che permetteva di misurare la lunghezza, il volume, e di calcolare il valore di F , per singola cellula. Anche in questo contesto venivano utilizzati due trasduttori posti in serie: il primo era un tradizionale sensore ad impedenza mentre il secondo faceva riferimento alla tecnica "slit scanning", (utilizzava cioè una sorgente luminosa) che consentiva di determinare il tempo di transito della cellula (time of flight) dalla durata dell'impulso. Poiché la velocità della cellula poteva essere predeterminata era possibile correlare la durata di ciascun impulso alla lunghezza della particella e quindi calcolare il valore di F . Le critiche mosse a questo metodo derivano dal fatto che la lunghezza della cellula viene misurata in un momento successivo rispetto al transito attraverso il sensore ad impedenza e, poiché le forze idrodinamiche nei due sensori posti in serie sono differenti, è improbabile che la lunghezza della cellula resti invariata. Gli analizzatori ematologici correnti utilizzano un unico valore di F prefissato dai singoli Costruttori e caratteristico dello strumento e del tipo di cellule da analizzare: per gli eritrociti umani questo valore è prossimo a 1.1.

Altri ricercatori, soprattutto di Scuola Tedesca, investigarono ulteriori aspetti del metodo ad impedenza: fra questi vanno ancora ricordati R. Thom³⁰, e V. Kachel et al.²⁹. Il primo fra il 1968 e il 1972 pubblicò degli studi relativi all'influenza "dell'effetto bordo" sulle curve di distribuzione dei volumi (formazione di impulsi di forma e dimensione anomala, i cosiddetti impulsi a M, caratterizzati da 2 picchi, quando le cellule attraversano l'apertura in prossimità dei bordi dove è maggiore l'intensità del campo elettrico), e osservò l'impossibilità di discriminare dalla forma dell'impulso cellule in coincidenza orizzontale da cellule singole ma con traiettorie eccentriche. I secondi nei primi anni '70 con l'uso di tecniche fotografiche documentarono l'orientazione, la

rotazione e la deformazione che subiscono le cellule fluenti entro l'orifizio e studiarono dettagliatamente l'influenza della traiettoria delle singole cellule sull'ampiezza e forma dell'impulso.

Impulsi di forma anomala (solitamente di ridotta ampiezza e di durata aumentata) possono essere generati anche da particelle che pur avendo già attraversato l'apertura, a seguito della turbolenza che si crea in prossimità dei bordi per la brusca decelerazione, rientrano nella zona sensibile. Questi impulsi sono problematici quando si debbano eseguire contemporaneamente misure su popolazioni cellulari di volume molto differente come nel caso della coesistenza di eritrociti e piastrine. Per evitarne gli effetti sono disponibili due soluzioni: 1) la rimozione elettronica degli impulsi di maggior durata e, 2) la prevenzione del fenomeno con vari accorgimenti basati su flussi di liquido che allontanano le cellule (ne sono esempi lo "sweep flow" della Coulter o il "back sheath" della Sysmex), o con il metodo proposto da W Von Behrens³⁴ applicato sugli analizzatori Cell Dyn 3000, prodotti dalla Sequoia-Turner e caratterizzato da un secondo orifizio "inerte" collimato a quello di conteggio attraverso il quale vengono aspirate le cellule già analizzate impedendo il loro rientro nella zona sensibile.

Il problema del riconoscimento e dell'eliminazione ("editing") degli impulsi di forma anomala ha ricevuto particolare attenzione ed è stato oggetto di numerosi brevetti a partire da quello di W. Hogg del 1970³⁵. In ogni caso i metodi proposti si fondano su circuiti elettronici che verificano l'altezza, la durata o la forma dell'impulso. Il metodo basato sulla durata parte dal presupposto che le cellule con percorso eccentrico impieghino più tempo ad attraversare l'orifizio (la velocità del flusso diminuisce progressivamente avvicinandosi alle pareti) e generano perciò un impulso più lungo. La verifica della forma e dell'altezza dell'impulso è basata o sulla ricerca di impulsi con più di un picco, o sulla valutazione del tempo intercorso (o dell'area sottesa) fra l'inizio dell'impulso e il primo picco (ridotti negli impulsi a "M"). Un altro accorgimento esegue la misura dell'ampiezza nella sola zona centrale dell'impulso (metodo "center-finder"). I risultati portano a una notevole riduzione dell'asimmetria delle curve di distribuzione dei volumi eritrocitari ma risulterebbero meno accurati delle tecniche di focalizzazione³⁶.

Le cellule da analizzare dovrebbero idealmente transitare una alla volta attraverso la zona sensibile, ma la contemporanea presenza di più cellule è un fatto inevitabile. Questo evento, noto come "coincidenza", ha come conseguenza sia la riduzione del conteggio cellulare a causa del mascheramento di alcuni impulsi, che la produzione di impulsi anomali per forma e ampiezza, tali da influenzare le misure di volume. Tradizionalmente^{10,11} vengono distinte la coincidenza orizzontale in cui le cellule sono in rapida successione, dalla coincidenza verticale in cui la cellule entrano affiancate nella

zona sensibile. L'errore dovuto alla coincidenza aumenta con l'aumentare della concentrazione delle cellule nel campione ma è possibile dedurre statisticamente l'entità in base alla concentrazione e al volume dell'orifizio. I conteggi possono pertanto essere corretti automaticamente con l'uso di metodi elettronici che sono stati oggetto di svariati brevetti (una interessante rassegna bibliografica è contenuta nel brevetto di H. Bader³⁷). Questi accorgimenti possono correggere i conteggi, ma soltanto la rimozione degli impulsi anomali può migliorare le curve di distribuzione dei volumi. La focalizzazione idrodinamica, quando utilizzata, contribuisce a ridurre anche questo fenomeno.

La conquista dei laboratori clinici

Dall'utilizzo del metodo ad impedenza per il conteggio e dimensionamento di un'unica popolazione cellulare alla produzione di analizzatori multiparametrici il passo fu breve. Una tappa rivoluzionaria fu la commercializzazione nel 1968 dell'analizzatore Coulter Model S. Si trattava del primo analizzatore in grado di eseguire contemporaneamente il conteggio degli eritrociti e dei leucociti in due distinti canali analitici grazie all'uso della valvola campionatrice, e di correggere automaticamente i conteggi per l'errore di coincidenza. Nella prima via analitica, previa lisi dei globuli rossi, venivano eseguiti il conteggio dei leucociti e la determinazione della concentrazione emoglobinica. Nella seconda venivano conteggiati i globuli rossi ed era calcolato il volume medio. L'ematocrito, il contenuto e la concentrazione emoglobinica media erano ottenuti per calcolo. In tal modo l'analizzatore poteva fornire ben sette parametri in un'unica seduta analitica. Una seconda data importante è stato il 1977, anno in cui venne commercializzato il Coulter Model S Plus, che, dall'analisi della dimensione e forma dei singoli impulsi, permetteva il conteggio piastrinico e quello eritrocitario, contemporaneamente. Il metodo resistivo è stato ed è tutt'ora ampiamente utilizzato per la differenziazione leucocitaria cosiddetta "parziale". In questo caso i leucociti vengono pretrattati con sostanze tensioattive che determinano una lisi parziale e selettiva sulle varie popolazioni leucocitarie che possono quindi essere differenziate in base al volume residuo. I primi studi risalgono al 1967 quando M.A. Van Dilla et al. a Los Alamos³⁸, e, indipendentemente, J. Gauthier e P. Harel in Canada³⁹ dimostrarono che per mezzo dell'analisi dell'altezza degli impulsi era possibile separare una popolazione di minor volume (comprendente in prevalenza linfociti) da una a volume maggiore costituita dalle altre cellule. Le prime applicazioni pratiche risalgono a J. England et al. che nel 1975 utilizzando un analizzatore d'impulsi di produzione commerciale (Coulter channelyzer) e previa lisi dei globuli rossi con saponina ottennero una distribuzione bimodale dei leucociti, questa poteva essere elaborata statisticamente permettendo la quantificazione delle due popolazioni costituenti⁴⁰. Nel 1979 S.L. Ledis et al.⁴¹ brevettarono un meto-

do che utilizzava come lisante un sale dell'ammonio quaternario e prevedeva un accurato controllo del tempo di reazione permettendo di ottenere una distribuzione bimodale. Questo metodo venne applicato all'analizzatore commerciale Coulter S plus II che forniva la quantificazione del picco corrispondente alla popolazione linfocitaria. Bisogna però attendere fino al 1982 perché, con il modello S plus IV, la Coulter, grazie ad una ulteriore modifica dei reagenti⁴² e ad un software dedicato all'analisi dell'istogramma, rendesse disponibile una distribuzione trimodale dei volumi leucocitari con quantificazione delle singole popolazioni che approssimativamente corrispondono a linfociti, monociti, e granulociti totali. Nello stesso periodo la TOA ha posto in commercio gli analizzatori della serie E, pure in grado di fornire una tripartizione volumetrica dei leucociti, separandoli tuttavia in modo differente: linfociti, cellule intermedie (monociti, eosinofili e basofili), e granulociti neutrofili.

Molti altri Costruttori a partire dagli anni '70 hanno fatto uso di trasduttori di tipo resistivo per le più svariate applicazioni (clinica, ricerca, industria), ma il "trasduttore Coulter" resta l'eponimo di riferimento per questa metodologia analitica.

2) Le correnti ad alta frequenza

Un'alternativa poco conosciuta

Verso la fine degli anni 50 una piccola azienda giapponese sviluppò un metodo concettualmente simile a quello brevettato da W. Coulter ma differente nel principio di misura in quanto sfruttava prevalentemente le variazioni di capacità (con una corrente alla frequenza di 3.5 MHz) piuttosto che di resistenza indotte dal passaggio della cellula attraverso l'orifizio. Tale metodo è stato successivamente sviluppato e utilizzato a partire dal 1963 dalla TOA sul suo primo analizzatore commerciale: il Micro Cell Counter. In questo caso le particelle da analizzare, sospese nel fluido di trasporto (non necessariamente conduttore di corrente come nel metodo resistivo) vengono aspirate attraverso un'apertura cilindrica, di diametro variabile fra 30 e 100 micron, nella cui parete sono immersi 2 elettrodi isolati che attribuiscono all'apertura le caratteristiche di un condensatore⁴³. La lunghezza dell'apertura facilitava tuttavia la deposizione di scorie difficili da rimuovere e i costi di produzione e manutenzione erano superiori a quelli del corrispondente trasduttore resistivo, pertanto, dal 1976, con il venir meno dei vincoli imposti dal brevetto Coulter, la TOA (oggi Sysmex) ha deciso di applicare il metodo resistivo anche sui propri analizzatori⁴⁴.

Misure biparametriche

Nel 1966 W. Coulter e R. Hogg⁴⁵ e nel corso degli anni '70 R.C. Leif e R.A. Thomas^{46,47} proposero l'uso simultaneo della corrente continua e di una corrente oscillante ad alta frequenza per investigare differenti caratteristiche fisiche delle cellule in sospensione: la dimensione con la prima e la composizione e la struttura

interna con la seconda. I fondamenti teorici per analizzare le caratteristiche cellulari in funzione della frequenza sono riconducibili alla possibilità di equiparare una cellula (ad esempio un leucocita) ad una particella sferoidale composta da citoplasma più o meno omogeneo racchiuso da una sottile membrana dotata di una elevata resistività. Sebbene la membrana cellulare sia ritenuta non conduttrice, presenta tuttavia una certa capacità. In corrente continua (metodo resistivo puro) la cellula appare perciò come un isolante perfetto simile ad una particella di plastica avente stessa forma e dimensione, ma ad elevata frequenza la membrana viene cortocircuitata ed è misurata la variazione di potenziale dovuta all'impedenza complessiva della cellula:

$$Z = \frac{R}{1 + j \omega R C}$$

dove:

Z = impedenza

R = resistenza (prevalentemente citoplasmatica)

J = $\sqrt{-1}$

$\omega = 2\pi f$ (con f frequenza della corrente)

C = capacità

Per definire questo comportamento alle alte frequenze vennero proposti i termini "opacity" o il suo contrario "transparency". Poiché l'impedenza della cellula dipende anche alle alte frequenze dalla dimensione cellulare, il parametro "opacity" utilizzato sugli analizzatori Coulter venne normalizzato mediante l'utilizzo del rapporto fra la misura in radiofrequenza e quella in corrente continua, in modo da depurare il segnale dall'influenza della dimensione.

Misure sperimentali su vari tipi di cellule (eritrociti, leucociti, cellule tumorali in coltura) hanno fornito valori di capacità e di resistività interna piuttosto diversi⁴⁸. L'ampia variabilità delle componenti capacitiva e resistiva suggerisce quindi la possibilità che l'analisi con correnti ad alta frequenza possa discriminare cellule differenti a parità di altre condizioni. Bisogna però giungere al 1986 perché l'uso combinato di queste due misure sia adottato commercialmente con gli analizzatori VCS di produzione Coulter (nei quali è prevista anche una contemporanea misura di light-scattering). Anche la Sysmex nel 1988 con gli analizzatori della serie NE ha riutilizzato, con modifiche, il metodo a variazione di impedenza messo a punto negli anni 60, associandolo a misure in corrente continua. In entrambi gli analizzatori queste misure sono utilizzate per differenziare le diverse popolazioni leucocitarie: i granulociti basofili dai linfociti nel primo caso e i granulociti totali dai linfociti e dai monociti nel secondo.

Bibliografia

1. Coulter WH. 1949 Means for counting particles suspended in a fluid. U.S. patent n° 2656508, Filed August 1949.
2. Graham MD. The Coulter principle: foundation of an industry. JALA 2003 ; 8:72- 81.
3. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter

- and cell size analyzer. Proc. Natl. Electron. Conf. Chicago 1956. 1957 ; 12 : 1034-40.
4. Kubitschek HE. Electronic measurement of particle size. Research (London) 1960; 13:128-35.
5. Mattern CFT, Bracket FS , Olson BJ. Determination of number and size of particles by electrical gating: blood cells. J. Appl. Physiol. 1957; 10 : 56-70.
6. Grant JL, Britton MC Jr, Kurtz TE. Measurement of red blood cell volume with the electronic cell counter. Am. J. Clin. Pathol. 1960; 33 : 138-43.
7. Brecher G, Jakobek EF, Schneiderman MA , Williams GZ, Schmidt PJ. Size distribution of erythrocytes. N.Y.Acad.Sci. 1962; 99 : 242-61.
8. Price-Jones C. The variation in sizes of red blood cells. Br. Med. J. 1910; 2 : 1418-9.
9. Lushbaugh CC, Basmann NJ, Glascock B. Electronic measurement of cellular volumes. II.frequency distribution of erythrocyte volumes. Blood 1962;20 : 241-8.
10. Wales M, Wilson JN. Theory of coincidence in Coulter particle counters. Rev. Scient. Instr. 1961; 32:1132-36.
11. Princen LH, Kwolek WF. Coincidence correction for particle size determinations with the Coulter counter. Rev. Scient. Instr. 1965 ; 36 : 646-53.
12. Coulter WH, Hogg WR, Moran JP, Claps WA. Particle analyzing device. U.S. patent.n. 3259842, Filed August 1959.
13. Van Dilla MA, Basmann NJ, Fulwyler MJ. Electronic cell sizing. Los Alamos Scientific Laboratory Report 1964; LA3132MS : 182-204.
14. Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. Science 1965 ; 150 : 910-1.
15. Robinson JP. Flow cytometry . In: Encyclopedia of biomaterials and biomedical Engineering. Marcel Dekker 2004 : 630-40.
16. Bull BS. On the distribution of red cell volumes. Blood 1968; 31: 503-15.
17. Thom R, Kachel V. Fortschritte fur die elektronische grossenbestimmung von blutkorperchen. Blut 1970; 21: 48-50.
18. Gregg EC, Steidley KD. Electrical counting and sizing of mammalian cells in suspension. Biophys. J. 1965; 5: 393-405.
19. Gutmann J. Elektronische verfahren zur ermittlung statistischer maszahlen einiger medizinisch wichtiger daten. Elektromedizin 1966; 11: 62-79.
20. Spielman L, Goren SL. Improving resolution in Coulter counting by hydrodynamic focusing. J Colloid Interface Sci 1968; 26: 175-182.
21. Valet G. Past and present concepts in flow cytometry : a European perspective. J Biol Regul Homeost Agents 2003; 17: 213 – 22.
22. Kachel V. Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization on the new instrument Metricell. J Histochem. Cytochem 1976; 24: 211- 30.
23. Shank BB, Adams RB, Steidley KD, Murphy JR. A physical explanation of the bimodal distribution obtained by electronic sizing of erythrocytes. J Lab Clin Med 1969; 74: 630-41.
24. Grover NB, Naaman J, Ben-Sasson S, Doljanski F. Electrical sizing of particles in suspensions. I Theory. Biophys. J. 1969; 9: 1398- 414.
25. Grover NB, Naaman J, Ben-Sasson S, Doljanski F, Nadav E. Electrical sizing of particles in suspensions.II. Experi-

- ments with rigid spheres. *Biophys J.* 1969;9:1415-25.
26. Grover NB, Naaman J, Ben-Sasson S, Doljanski F. Electrical sizing of particles in suspension. III . Rigid spheroid and red blood cells. *Biophys J* 1972; 12:1099-117.
 27. Velick S, Gorin M. The electrical conductance of suspensions of ellipsoid and its relation to the study of avian erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* 1940; 23:753-71.
 28. Kachel V, Metzger H, Ruhenstroth-Bauer G. The interference of the particle path on the volume distribution curves according to the coulter method. *Z. Ges. exp med* 1970; 15: 331- 47.
 29. Kachel V. Methodology and results of optical investigations of form factors during the determination of cell volumes according to Coulter. *Microsc. Acta* 1974;75: 419- 28.
 30. Thom R, Hampe A, Sauerbrey G. Die elektronische volumenbestimmung von blutkoerperchen und ihre fehlerquellen. *Z.Ges. Exp Med.* 1969;151:331-49.
 31. Mohandas N, Kim JR, Tycko DH, Orlik J, Wyatt J, Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood* 1986;68:506-13.
 32. Thom R, Schulz J. Particle volume and cross-section measurement. U.S.Patent n. 3793587, Filed Mar,8,1972.
 33. Groves MR, Coulter WH. Particle shape determination. U.S.Patent n. 4298836 , Filed Nov, 23,1979.
 34. Von Behrens WE. Particulate matter analyzing apparatus and method. U.S. Patent n.4710021, Filed Mar,5, 1986.
 35. Hogg WR. Pulse analyzing apparatus. U. S.Patent n. 3668531, Filed Jun,15,1970.
 36. Von Behrens WE, Edmonson S. Comparison of techniques improving the resolution of standard Coulter cell sizing systems. *J Histochem Cytochem* 1976;24: 247-56.
 37. Bader H. Methods and apparatuses for correcting coincidence count errors in a particle analyzer having sensing zone through which the particles flow. U.S. Patent n. 3949197, Filed Sept,26, 1972.
 38. Van Dilla MA, Fulwyler MJ, Boone N. Volume distribution and separation of normal human leucocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol* 1967; 125:367-70.
 39. Gauthier J, Harel P. Human leukocytes: their size distribution and mean corpuscular Volume. *Can. Med. Ass. J.* 1967; 97:793-6.
 40. England JM, Hewer MG, Bashford CC, Hughes-Jones NC, Down MC. Simple method for automating the differential leukocyte count. *Lancet* 1975;1:492-3.
 41. Ledis SL., Chastain Jr DL, Crews HR. Differential lymphoid-myeloid determination of leukocytes in whole blood. U.S.Patent n.4286963 , Filed Nov 23,1979.
 42. Ledis SL, Sena T, Crews HR, Carter JH. Method for three-volume differential determination of lymphocyte, monocyte and granulocyte populations of leucocytes. U.S.Patent n.4485175, Filed Jan. 3, 1983.
 43. Imadate H. Particle counting device including fluid conducting means breaking up particle clusters. U. S. Patent n. 3390326, Filed Nov.14, 1962.
 44. Okada T. Development and problem of automated Hematology Analyzers. *Sysmex Journal International* 1999; 9: 52-7.
 45. Coulter WH, Hogg WR. Signal modulated apparatus for generating and detecting resistive and reactive changes in a modulated current path for particle classification on analysis. U.S. patent n. 3502974, Filed May 1966.
 46. Leif RC, Thomas RA. Electronic cell volume analysis by use of the AMAC I transducer *Clin Chem* 1973; 19:853-70.
 47. Thomas RA, Yopp TA, Watson BD, Hindman DHK, Cameron BF, Leif SB et al. Combined optical and electronic analysis of cells with the AMAC transducer. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 827-35.
 48. Hoffman RA, Britt WB. Flow-system measurement of cell impedance properties. *J Histochem Cytochem* 1979; 27 : 234-40.