

**XXXIV**  
**CONFERENZA NAZIONALE**  
**DI CITOMETRIA**  
**CORSO BASE CITOMETRIA**

CONOSCERE IL CITOMETRO: I COMPONENTI



# CITOMETRIA A FLUSSO (CFM)

La citometria a flusso (FCM, acronimo di Flow CytoMetry) è una tecnica analitica sviluppatasi negli anni'60 per lo studio delle caratteristiche chimiche e fisiche di cellule eucariote e più tardi di cellule procariote.

La CFM consente l'analisi automatica di sospensioni monodisperse, sia di natura cellulare che "non cellulare" (es. microsfere di vario genere, nuclei, mitocondri e cromosomi in sospensione).



## H. Shapiro "Practical Flow Cytometry", 3rd Ed. Wiley-Liss, 1994

This is a book about **cytometry**, in general, emphasizing **flow cytometry**, in particular. In it, I hope to tell you what cytometry is, how it works, why and how to use it, when you should favor one type of cytometry or another, and when cytometry won't solve your problem. This chapter, like the overture to an opera or a musical, presents important themes from the body of the work, but may also stand alone.

### 1.1 WHAT (AND WHAT GOOD) IS CYTOMETRY?

**Cytometry** is a process in which physical and/or chemical characteristics of **single cells**, or by extension, of other biological or nonbiological particles in roughly the same size range, are **measured**. In **flow cytometry**, the measurements are made as the cells or particles pass through the measuring apparatus, a **flow cytometer**, in a fluid stream. A **cell sorter**, or **flow sorter**, is a flow cytometer that uses electrical and/or mechanical means to divert and collect cells (or other small particles) with measured characteristics that fall within a user-selected range of values.

Neither the cells nor the apparatus are capable of putting the process of cytometry in motion; the required critical element for that is a **human interested in obtaining information** about a cell sample and, in the case of sorting, **extracting cells of interest from the sample**. At the most basic level, a cytometer might be considered to be a "black box" with cells as "inputs" and numbers as "outputs"; the **outputs of a cell sorter would include both numbers and cells**. However, while some modern cytometers (and some modern users) can obtain the desired results while running unattended in "black box" mode, it is fair to say that most of the applica-

tions, and all of the interesting applications, of cytometry call for some understanding and some intellectual effort on the part of the user.

### Tasks and Techniques of Cytometry

From the time of van Leeuwenhoek and Hooke until the mid-20th century, determining:

- 1) whether cells were present in a specimen,
- 2) how many were there,
- 3) what kinds of cells were represented, and
- 4) what their functional characteristics might be

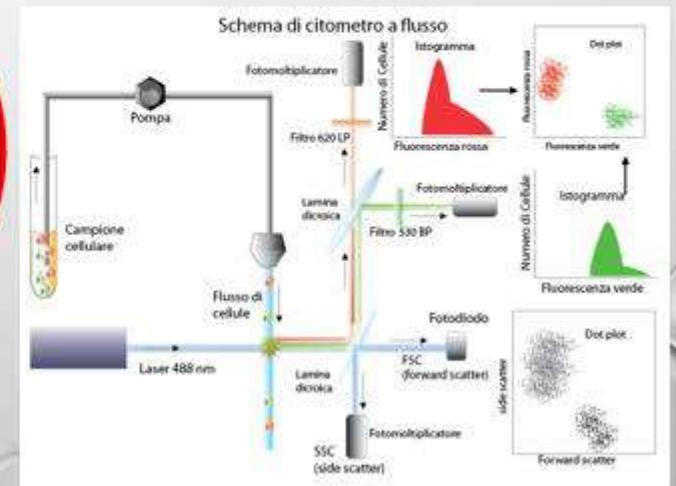
required that a human observer interpret a microscope image. The same tasks remain for modern cytometry.

Although electrical and acoustic properties of, and nuclear radiation emission from, **single cells** can be measured, it is fair to say that **optical measurements** are by far the most common in cytometry. A typical cytometer is thus a specialized **microscope**; the degree of physical resemblance is dictated by the requirements of the measurement(s) to be made, which in turn are dictated by what the user needs to know about the cell sample. In successful applications of cytometry, **electro-optics, electronics, and computers** are employed to improve on what could be obtained "by eye," although interpretation is required more often than not. The successful applications are many, increasing in number, and commonplace in locales as diverse as clinical laboratories and breweries.

### Some Notable Applications

Cytometry is currently used to obtain the helper T lymphocyte counts needed to monitor the course and treatment of HIV infection, and to determine tumor cell DNA content

# AMICI O NEMICI????





## Vantaggi

- possibilità' di analisi multiparametrica
- elevato numero di cellule esaminate
- rapidita' dei tempi di analisi (oltre 1000 cellule/sec)
- obiettività, riproducibilità e affidabilità statistica delle letture
- i campioni possono essere processati senza perdere la vitalità cellulare
  - analisi di cellule molto rare, che a causa del loro ridotto numero in confronto agli eventi analizzati potrebbero essere difficilmente separabili dal "rumore di fondo"

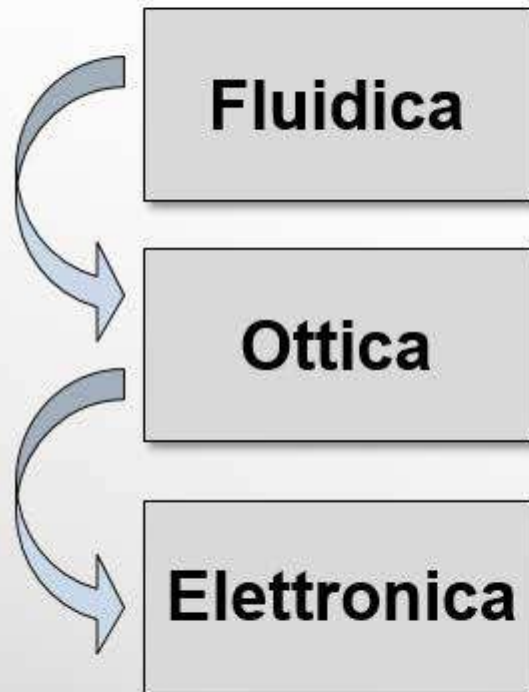
## Limiti

- Analisi di cellule che esprimono poco le componenti studiate,
- necessita' di dover lavorare con campioni in fase monodispersa,
  - Perdita della visione diretta del campione

## IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità

- ✓ Con tale metodica è possibile acquisire e memorizzare più parametri analitici per ogni cellula analizzata (volume, complessità cellulare e parametri di fluorescenza). Utilizzando questi parametri a confronto si ottengono differenti rappresentazioni elettroniche di analisi ed è possibile così discriminare differenti sottopopolazioni cellulari.
- ✓ Il principio di funzionamento del citometro a flusso (CF) si basa sulla capacità di raccogliere la fluorescenza emessa dalle cellule in seguito ad opportuna eccitazione luminosa, sia per mezzo di sostanze naturalmente presenti nel campione che per mezzo di proteine fluorescenti artificialmente introdotte.

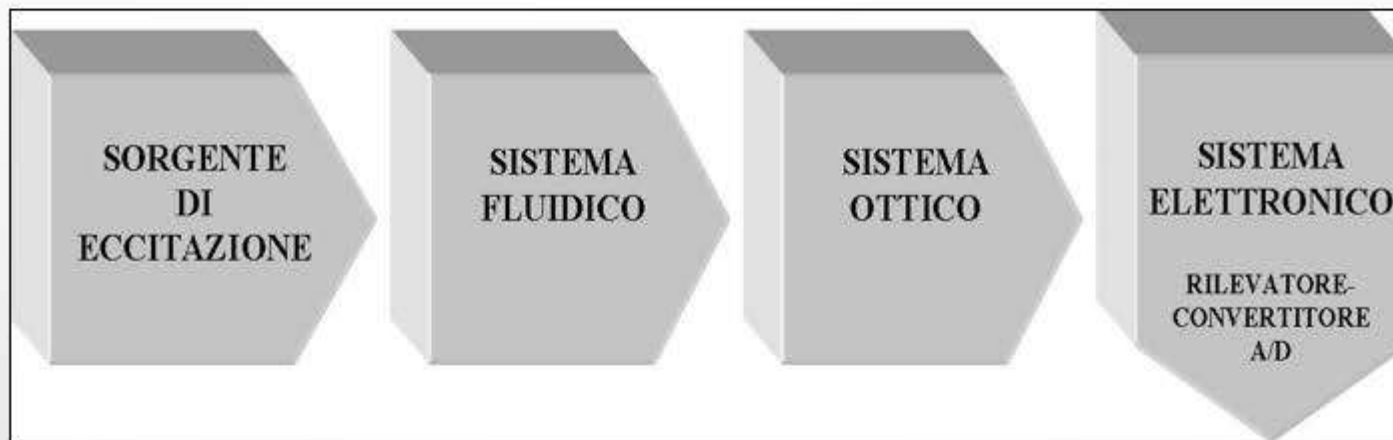
## IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità



Cellule in sospensione monodispersa scorrono in singola fila attraverso un punto di interrogazione illuminato, dove “riflettono” luce ed emettono fluorescenze che vengono raccolte, filtrate e convertite in Segnali Digitali (valori numerici) che sono inviati ad un computer dove sono memorizzati per poi elaborarli



# IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità





# IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità

**Evento (Oggetto) Biologico**



**Allestimento del Campione**



**Misura Citometrica**



**Analisi delle Distribuzioni**



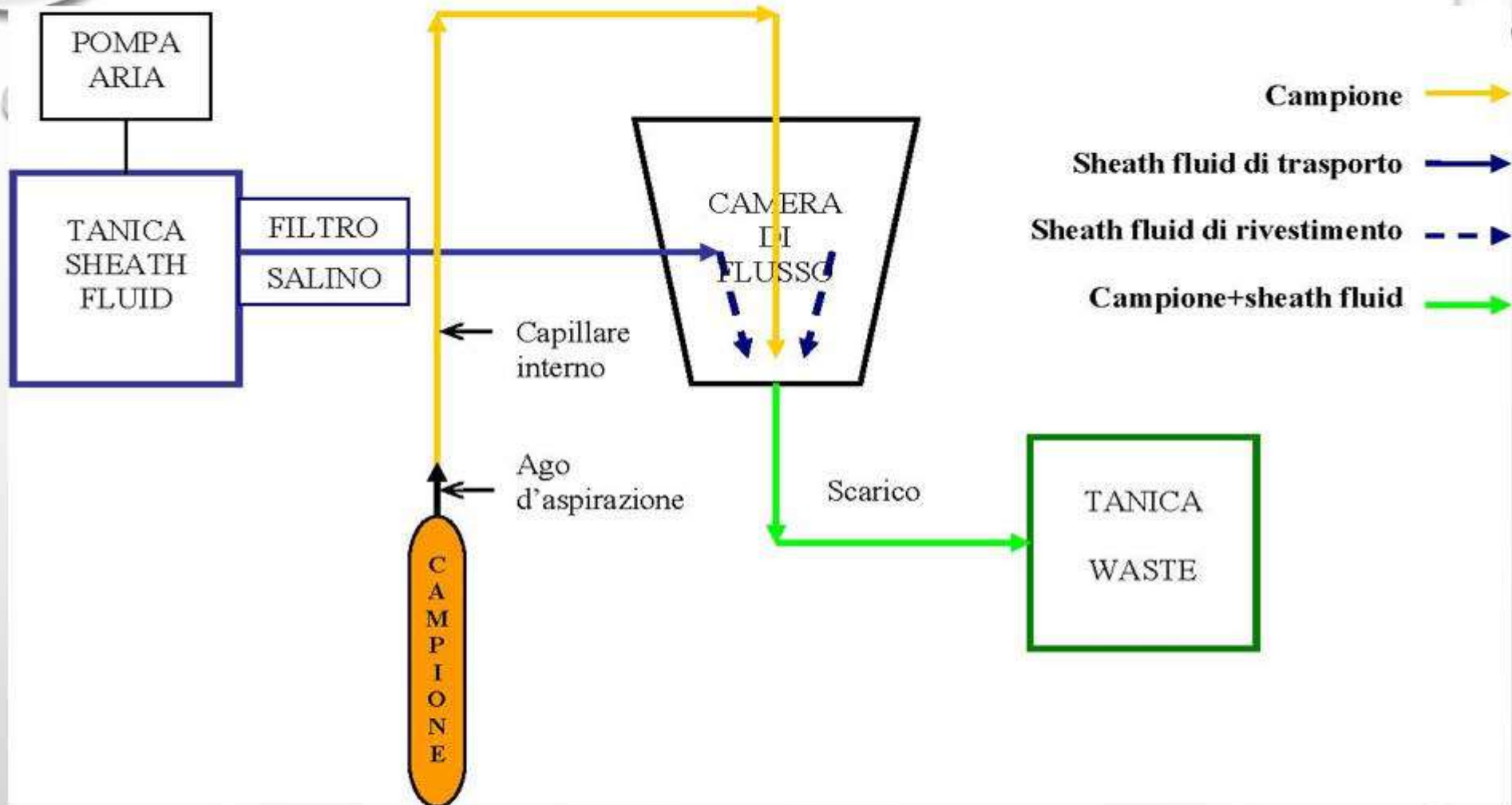
**Interpretazione, Risultato**

Il risultato di una misura citometrica deve essere proporzionale al fenomeno biologico esplorato.

Questa proporzionalità deve venire mantenuta lungo tutto il percorso

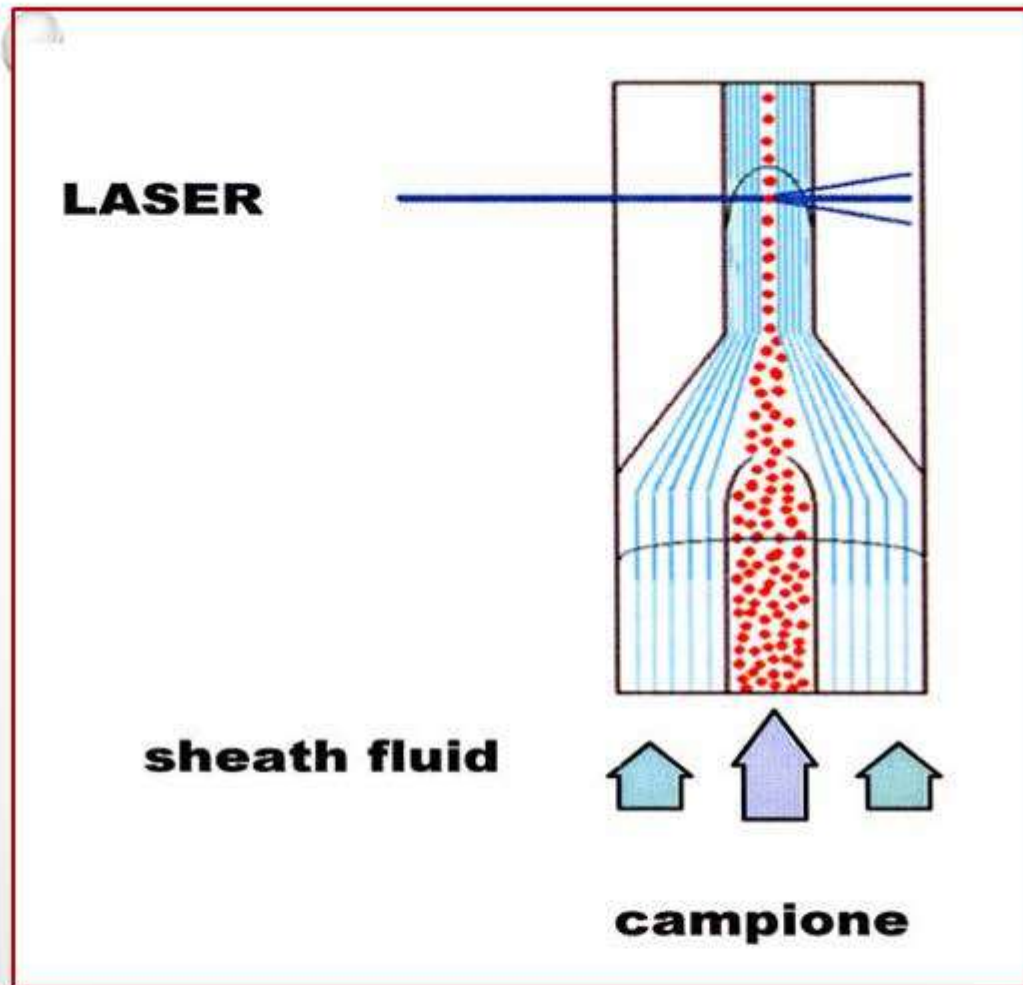
# COMPONENTI DEL CITOMETRO A FLUSSO





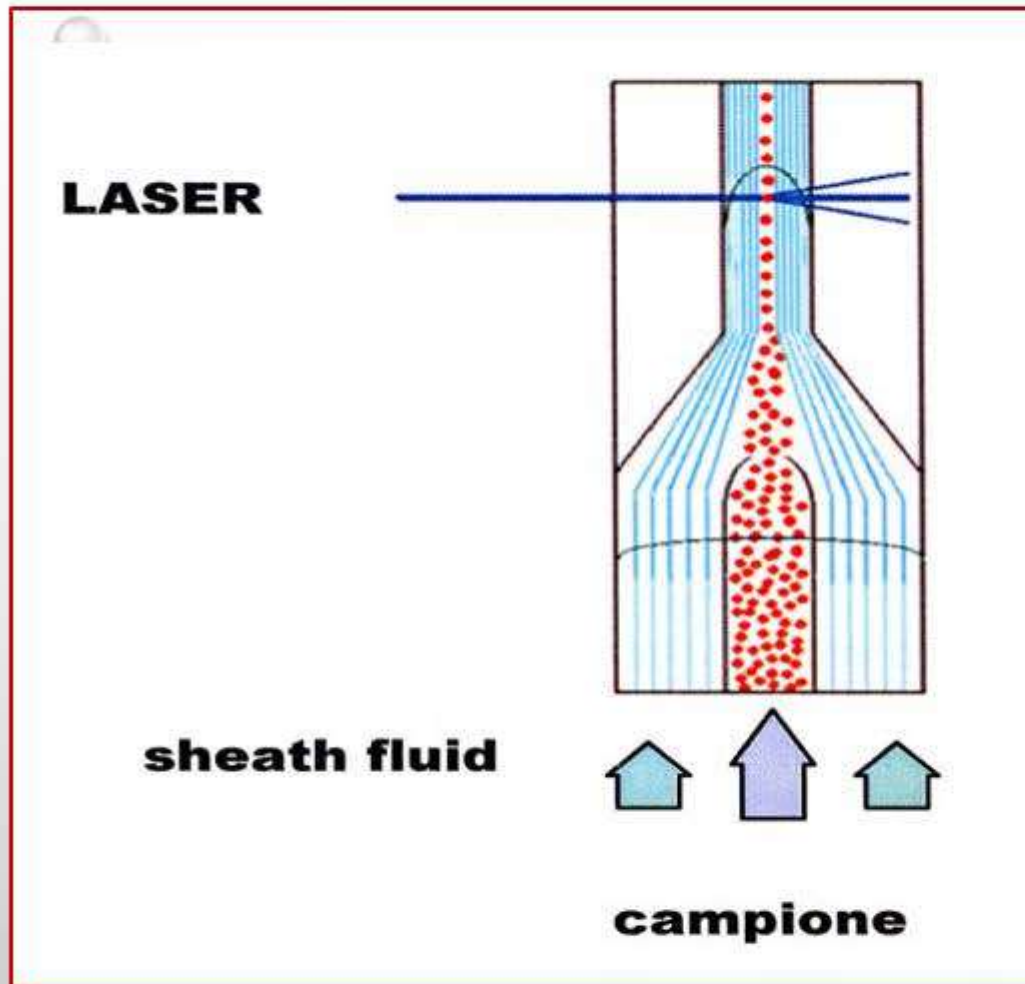
- **Le particelle da analizzare devono essere una soluzione monodispersa**





Le particelle devono essere in sospensione monodispersa in modo da potersi disporre ordinatamente allineate in singola fila e passare per il «punto di interrogazione» dove è focalizzato il fascio di luce di eccitazione.

Il campione una volta all'interno della camera di/a flusso viene inguainato dallo *sheath fluid* di rivestimento ed entra in una prima regione chiamata *nozzle*



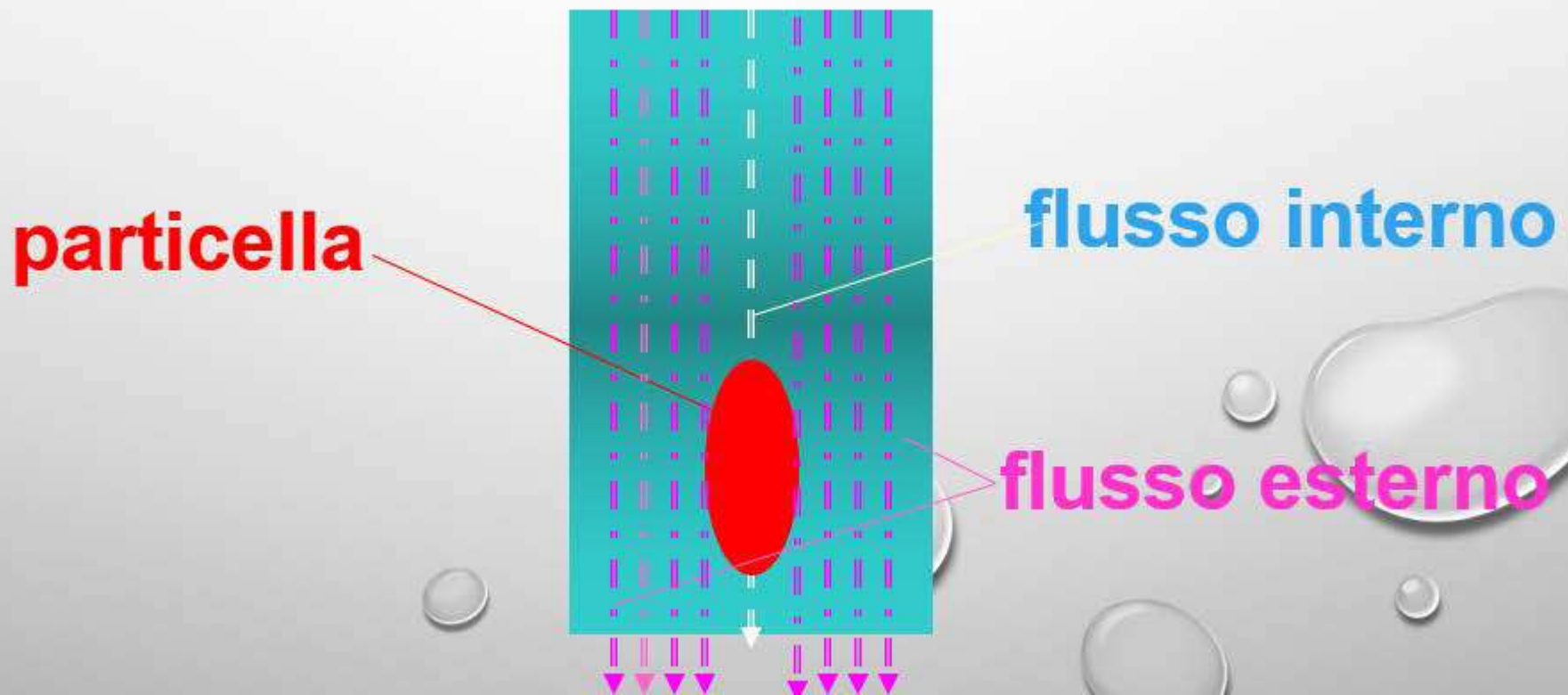
- IL *NOZZLE* È LA COMPONENTE “CRUCIALE” E PIÙ DELICATA DI UN CITOMETRO A FLUSSO, IN QUANTO AL SUO INTERNO IL CAMPIONE VIENE SOTTOPOSTO AD UN PROCESSO DI

**FOCALIZZAZIONE IDRODINAMICA,**

IL QUALE RISULTA ESSERE IL PRINCIPIO SU CUI SI FONDA L'ANALISI CITOFUORIMETRICA

# Flusso laminare

IN TALI CONDIZIONI DI FLUSSO SI POSSONO CONSIDERARE DUE REGIMI FLUIDICI COASSIALI: QUELLO INTERNO (*CORE FLOW*) CONTIENE LE PARTICELLE, QUELLO ESTERNO (*SHEAT FLOW*) MANTIENE QUESTE ULTIME LUNGO L'ASSE IDEALE DI FLUSSO.





# Moto laminare e moto turbolento

Il passaggio dal moto laminare a quello turbolento è caratterizzato da un parametro detto **Numero di Reynolds**: che è funzione della densità, viscosità, velocità del liquido e diametro del condotto.

$$Re = \frac{\rho V d}{\mu}$$

Diagram illustrating the Reynolds number formula  $Re = \frac{\rho V d}{\mu}$  with labels and arrows pointing to the variables:

- Velocità'** (Velocity) points to  $V$ .
- Diametro del condotto** (Pipe diameter) points to  $d$ .
- densità** (Density) points to  $\rho$ .
- viscosità** (Viscosity) points to  $\mu$ .

Il numero di Reynolds è adimensionale  
 $Re < 2000$  MOTO LAMINARE  
 $Re > 4000$  MOTO TURBOLENTO

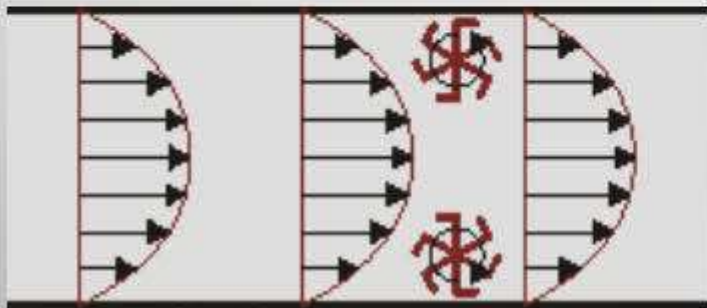
In fluidodinamica, la **legge di Poiseuille** (o anche di **Hagen-Poiseuille**) indica che la resistenza fluidodinamica ( $r$ , cioè la forza che si oppone al moto in un fluido) è inversamente proporzionale alla sezione della condotta ( $S$ ) e direttamente proporzionale alla viscosità ( $\mu$ ) .

Per tale legge il profilo di velocità del fluido sarà parabolico con una velocità massima centrale.

$$r = \mu / S$$

← Sezione condotta

← viscosità

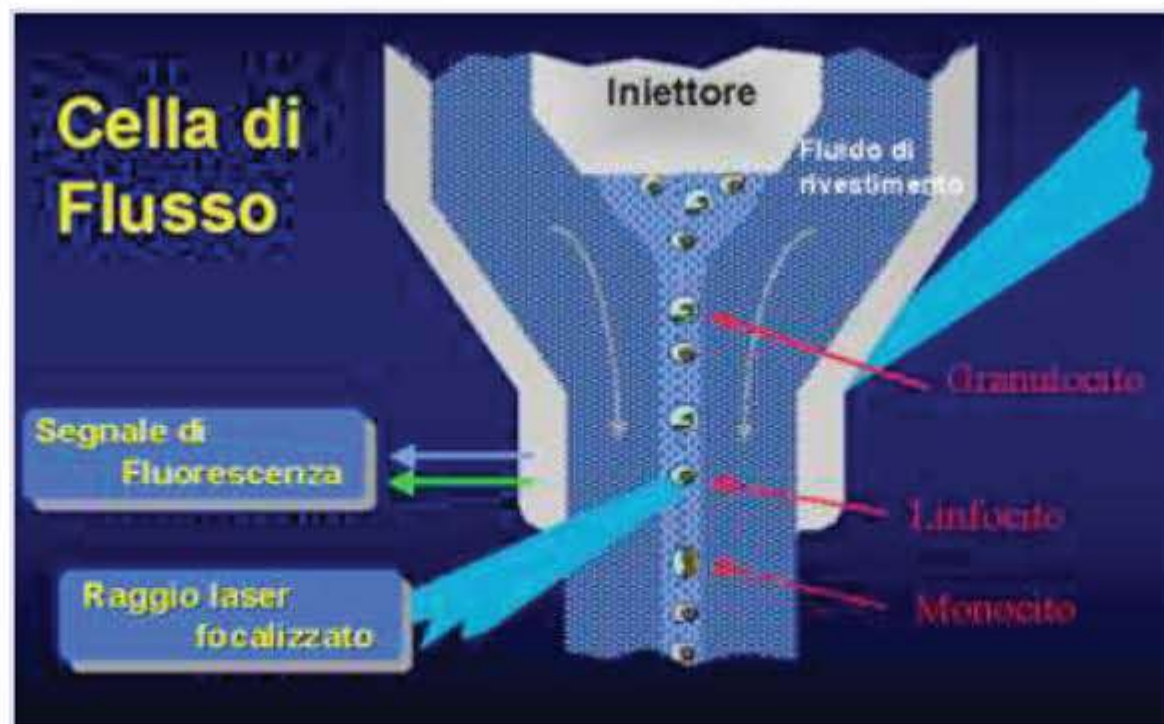


# CAMERA A FLUSSO

Cella a flusso: nozzle+capillare

Nel nozzle si crea un moto laminare, in cui il flusso aumenta laddove si restringe la sezione.

Importante che il flusso del CORE (cilindretto) sia costante





# FLUIDICA - LE CAMERE DI FLUSSO

## QUATTRO TIPI BASE DI CAMERE:

### – **Jet - in - Air**

- Sistemi aperti, ottimi per sorting, scadenti proprietà ottiche.

### – **Cuvette di Quarzo**

- Sistemi chiusi, le più diffuse, ottime proprietà ottiche, *possono supportare sorting piezoelettrico (stream - in air)*.

### – **Flusso Aperto su Superficie Verticale**

- Buone proprietà ottiche, molto instabili, no sorting

### – **Flusso Chiuso**

- Tipo vetrino di microscopio, eccellenti qualità ottiche, no sorting, solo su strumenti antiquati.

# CAMERE A FLUSSO

## QUARZO

## GETTO IN ARIA

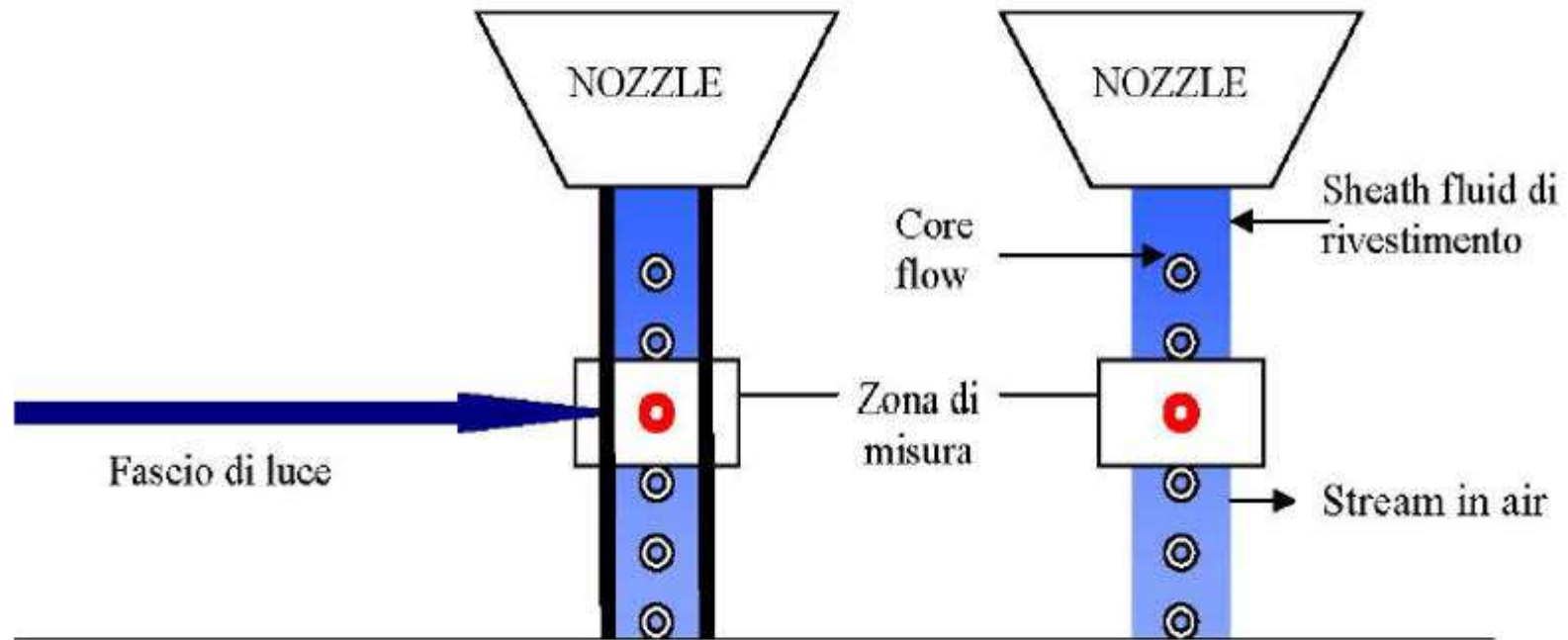


Fig. 1.6. Cella a flusso con capillare in quarzo o chiusa (sinistra) e a getto libero o aperta (destra).

# COME REALIZZIAMO L'INIEZIONE DEL CAMPIONE NEL FLUSSO?

1. A PRESSIONE NEGATIVA, ***ASPIRAZIONE DEI LIQUIDI***;
2. A PRESSIONE POSITIVA, ***DI TIPO DIFFERENZIALE***;
3. ***AD INIEZIONE VOLUMETRICA***.

Il **sistema ad aspirazione** dei liquidi è oggi il meno utilizzato, in quanto si è osservato che applicando una pressione negativa sui liquidi in scorrimento si può verificare l'insorgenza di bolle gassose tali da diminuire la risoluzione analitica. Questo sistema è quindi ormai superato dagli altri due tipi.



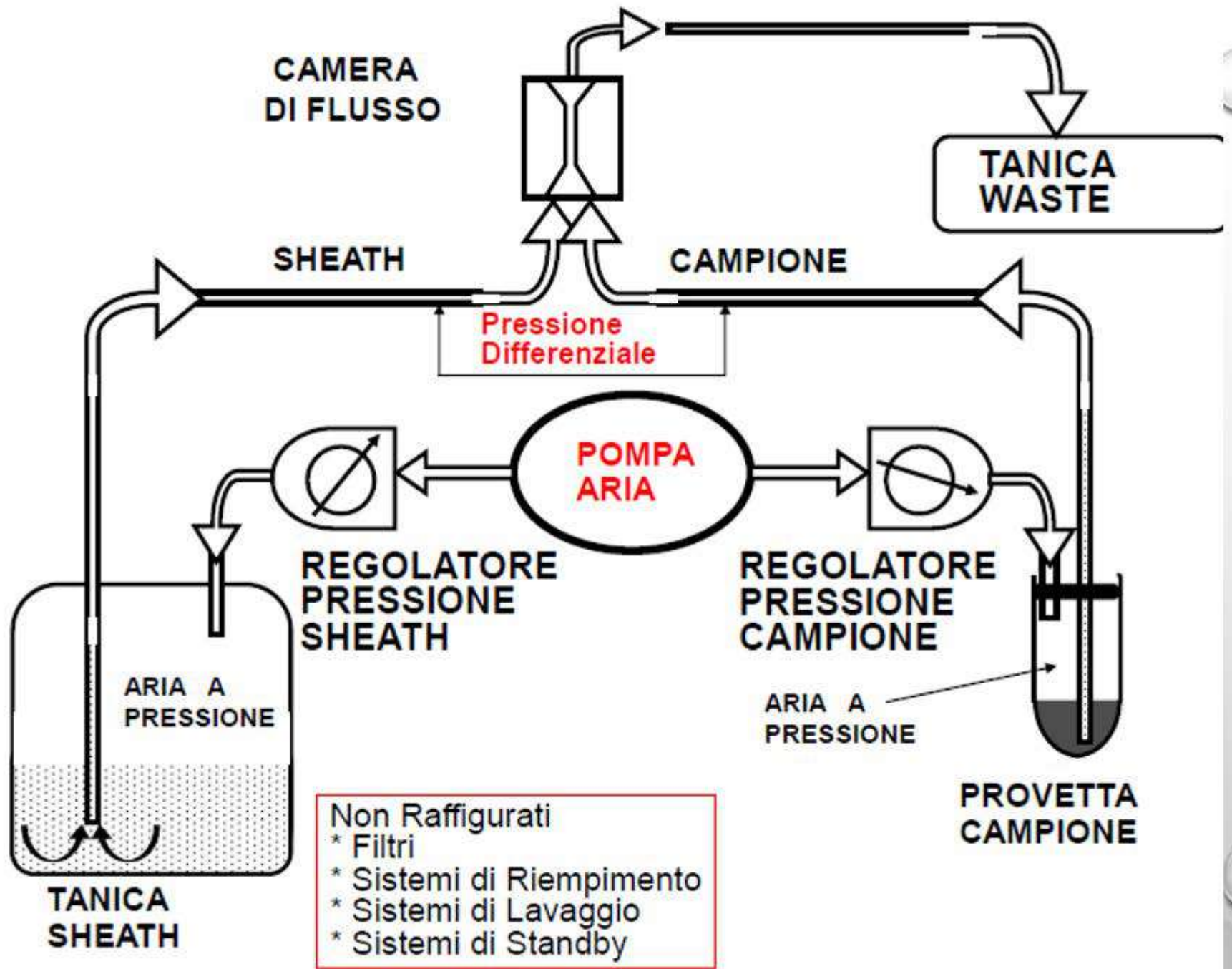
## 2. LA PRESSIONE DIFFERENZIALE

- IL MOTORE AD ARIA COMPRESSA (O AZOTO) PRESSURIZZA SHEATH E

CAMPIONE MENTRE DEI REGOLATORI DI PRESSIONE CONTROLLANO IN PRIMO LUOGO LA PRESSIONE E IL FLUSSO DELLO SHEATH E CREANO UNA

PRESSIONE DIFFERENZIALE =  $P \text{ CAMPIONE} / P \text{ SHEATH}$ .

- LA PRESSIONE DEL CORE CENTRALE ALL'USCITA DAL CAPILLARE NEL NOZZLE È LEGGERMENTE INFERIORE A QUELLA DEL FLUIDO ESTERNO (*SHEATH FLUID*). QUESTA DIFFERENZA DI PRESSIONE PUÒ ESSERE VARIATA E REGOLA IL **FLOW RATE**, VELOCITÀ DEL FLUSSO DELLE PARTICELLE.



L'operatore può variare la velocità d'analisi modificando solamente la pressione sul core centrale. La velocità del campione è preimpostata negli strumenti su più livelli definiti manualmente o dal software:  
**LOW, MEDIUM e HIGH.**

- LA RIDUZIONE DELLA PRESSIONE (RATE) DELLO SHEATH AUMENTA LA QUANTITA' DI LUCE RACCOLTA E QUINDI LA SENSIBILITA'



# AL CRESCERE DELLA VELOCITÀ DI FLUSSO AUMENTA IL COEFFICIENTE DI VARIAZIONE (CV) A DISCAPITO DELLA RISOLUZIONE ANALITICA

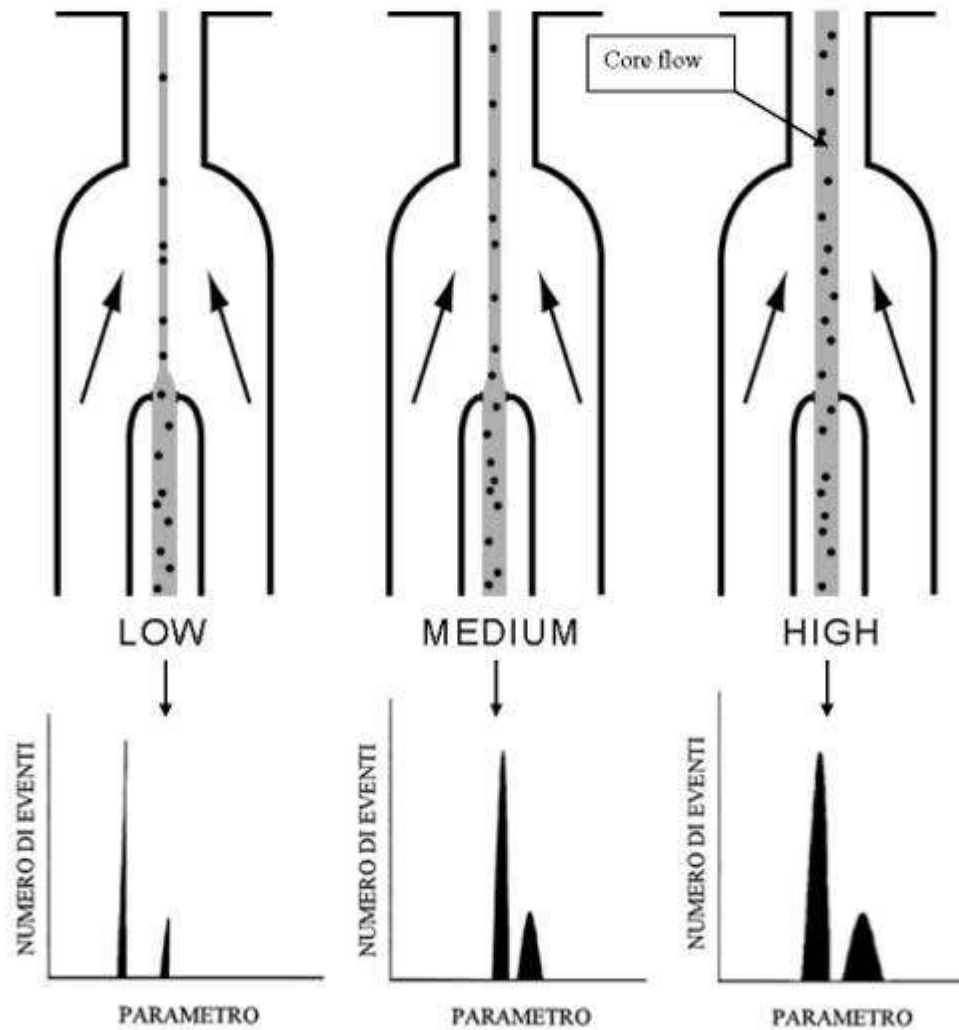
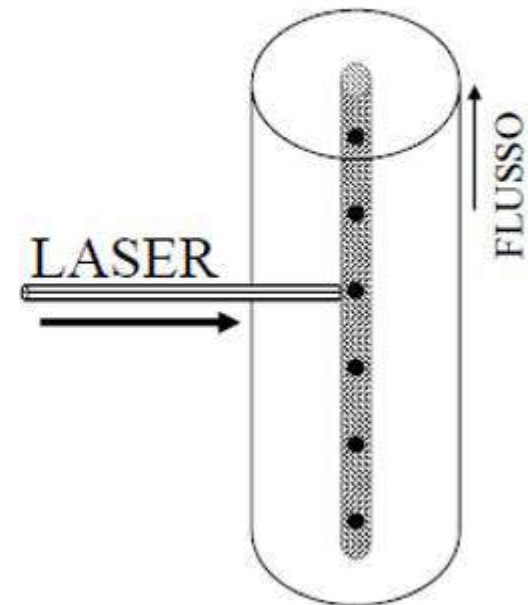


Fig. 1.10. Flusso del campione a diverse velocità ed incremento del CV del picco da sinistra verso destra.

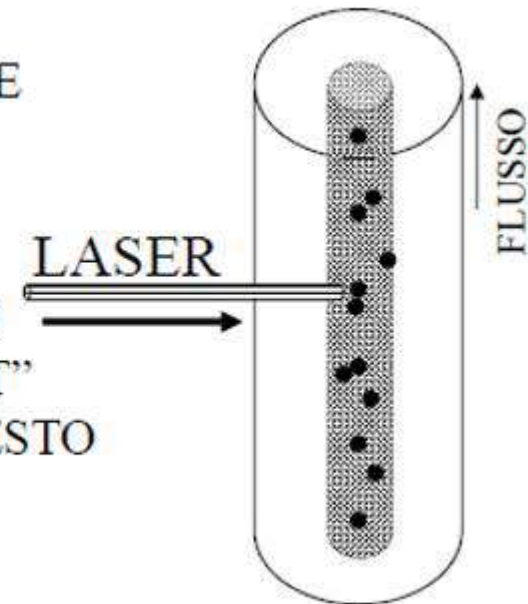
## **RATE BASSO (200-500 Eventi/sec)**

LE CELLULE VENGONO "CENTRATE" REGOLARMENTE DAL LASER E GENERANO SEGNALI UGUALI A PARITA' DI CARATTERISTICHE PERCHE' VENGONO INTERCETTATI DALLA STESSA QUANTITA' DI ENERGIA



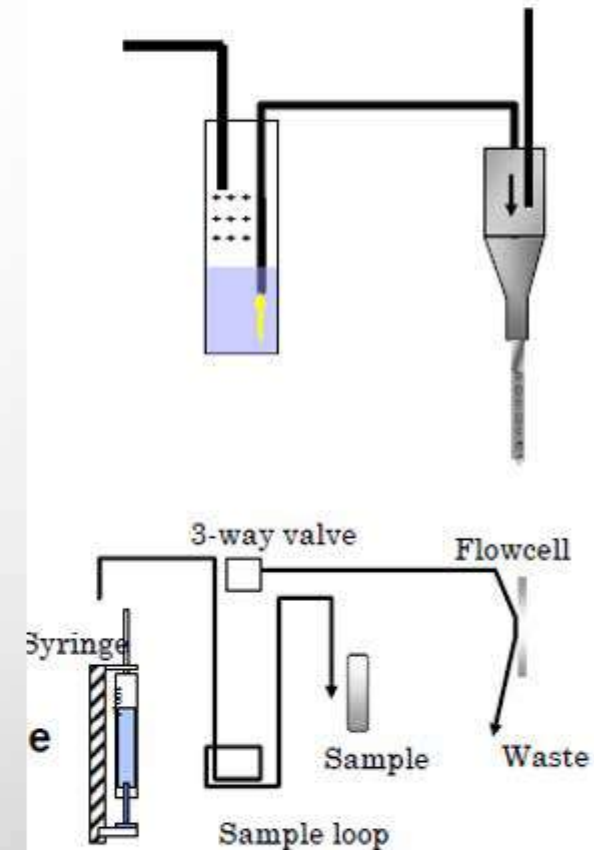
## **RATE ALTO (2000-3000 Eventi/sec)**

LE CELLULE SCORRONO IN ZONE DIVERSE DEL CORE E INTERCETTANO REGIONI A DIVERSA ENERGIA DELLO "SPOT" DEL LASER SULLO STREAM. A PARITA' DI CARATTERISTICHE VENGONO GENERATI SEGNALI DISUGUALI. LO "SPOT" ELLITTICO RIDUCE ULTERIORMENTE QUESTO ERRORE STRUMENTALE. **I Sorter ad alta pressione/velocità hanno risolto il problema aumentando la pressione di sheath**



# 3. INIEZIONE VOLUMETRICA

- IL FLUSSO DEL CAMPIONE E' LIBERO E CONTINUO
- QUESTO SISTEMA, PERMETTE DI REGOLARE CON PRECISIONE IL FLUSSO DEL CAMPIONE FINO AD UNA VELOCITÀ DI 0.2 ML/MINUTO.
- CONOSCENDO IL VOLUME DELLA SIRINGA ED IL NUMERO DI PARTICELLE REGISTRATE, SI PUÒ RISALIRE AL NUMERO DI PARTICELLE PER UNITÀ DI VOLUME DEL CAMPIONE.
- LA QUALITA' DELLE MISURE ASSOLUTE SI BASA SUL CONTROLLO ELETTRONICO DI PRESSIONI E VOLUMI





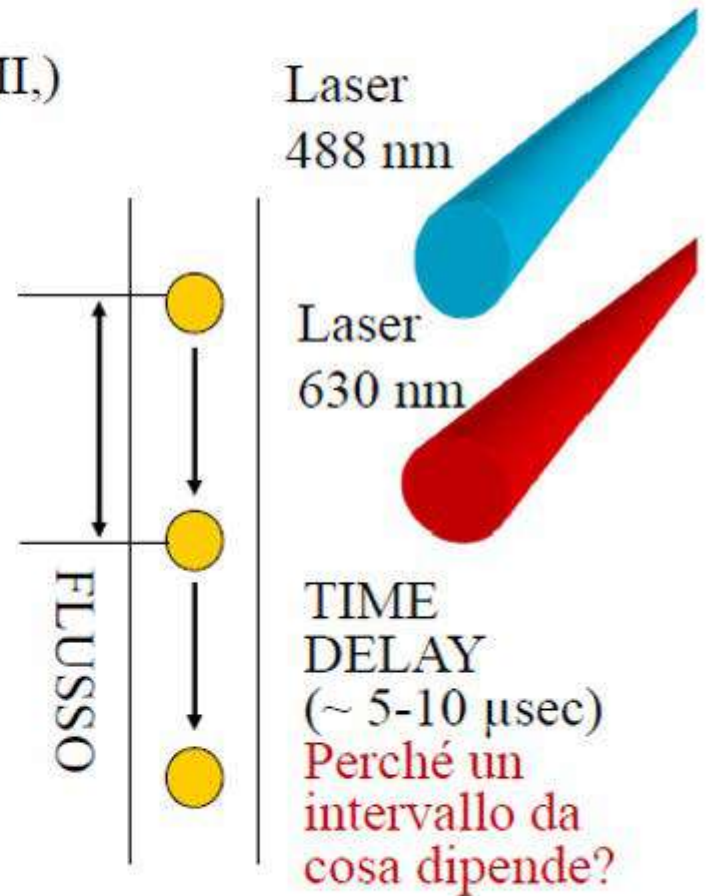
## CONTROLLO ELETTRONICO DELLA FLUIDICA

### La Fluidica Condiziona il Corretto Funzionamento della Parte Ottica, Specialmente nei sistemi a Doppio o Triplo Laser

Nei sistemi a doppio o triplo laser (ARIA II,) (MoFlo) è essenziale che la fluidica sia perfettamente in sincronia con l'elettronica.

Per questo il FLUSSO è sotto stretto controllo elettronico (pompa digitale).

La stessa cellula deve passare dal primo al secondo laser in un tempo NOTO e STABILE, in modo da essere riconosciuta e ricondotti i suoi diversi impulsi (2 o 3) come UN SINGOLO EVENTO Laser (riferito al primario 488 nm)



## PROBLEMI FLUIDICI:



- ✓ bolle d'aria presenti nel circuito/nozzle
- ✓ occlusione da aggregati cellulari o corpuscoli di grande diametro (prevalentemente in sorter)
- ✓ residui nelle tubazioni che convogliano il campione, come può avvenire con un precedente passaggio di coloranti per il DNA
- ✓ perdita di pressurizzazione in vari punti del circuito, come nei resistori per crescita algale
- ✓ reflusso di liquido in parti del circuito che normalmente contengono aria
- ✓ contaminazione dello sheath fluid e/o inadeguata azione del suo filtro con generazione di rumore di fondo fluidica, in questo caso gli eventi vengono acquisiti anche senza campione!

**XXXIV**  
**CONFERENZA NAZIONALE**  
**DI CITOMETRIA**  
**CORSO BASE CITOMETRIA**

CONOSCERE IL CITOMETRO: I COMPONENTI





## CITOMETRIA A FLUSSO (CFM)

La citometria a flusso (FCM, acronimo di Flow CytoMetry) è una tecnica analitica sviluppatasi negli anni '60 per lo studio delle caratteristiche chimiche e fisiche di cellule eucariote e più tardi di cellule procariote.

La CFM consente l'analisi automatica di sospensioni monodisperse, sia di natura cellulare che "non cellulare" (es. microsfere di vario genere, nuclei, mitocondri e cromosomi in sospensione).

## H. Shapiro "Practical Flow Cytometry", 3rd Ed. Wiley-Liss, 1994

This is a book about **cytometry**, in general, emphasizing **flow cytometry**, in particular. In it, I hope to tell you what cytometry is, how it works, why and how to use it, when you should favor one type of cytometry or another, and when cytometry won't solve your problem. This chapter, like the overture to an opera or a musical, presents important themes from the body of the work, but may also stand alone.

### LI WHAT (AND WHAT GOOD) IS CYTOMETRY?

**Cytometry** is a process in which physical and/or chemical characteristics of **single cells**, or by extension, of other biological or nonbiological particles in roughly the same size range, are **measured**. In **flow cytometry**, the measurements are made as the cells or particles pass through the measuring apparatus, a **flow cytometer**, in a fluid stream. A **cell sorter**, or **flow sorter**, is a flow cytometer that uses electrical and/or mechanical means to divert and collect cells (or other small particles) with measured characteristics that fall within a user-selected range of values.

Neither the cells nor the apparatus are capable of putting the process of cytometry in motion; the required critical element for that is a **human interested in obtaining information** about a cell sample and, in the case of sorting, extracting cells of interest from the sample. At the most basic level, a cytometer might be considered to be a "black box" with cells as "inputs" and numbers as "outputs"; the outputs of a cell sorter would include **both numbers and cells**. However, while some modern cytometers (and some modern users) can obtain the desired results while running unattended in "black box" mode, it is fair to say that most of the applica-

tions, and all of the interesting applications, of cytometry call for some understanding and some intellectual effort on the part of the user.

### Tasks and Techniques of Cytometry

From the time of van Leeuwenhoek and Hooke until the mid-20th century, determining:

- 1) whether cells were present in a specimen,
- 2) how many were there,
- 3) what kinds of cells were represented, and
- 4) what their functional characteristics might be

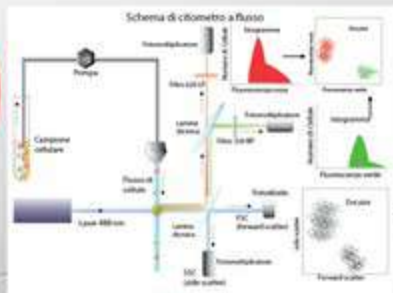
required that a human observer interpret a microscope image. The same tasks remain for modern cytometry.

Although electrical and acoustic properties of, and nuclear radiation emission from, **single cells** can be measured, it is fair to say that **optical measurements** are by far the most common in cytometry. A typical cytometer is thus a specialized **microscope**; the degree of physical resemblance is dictated by the requirements of the measurement(s) to be made, which in turn are dictated by what the user needs to know about the cell sample. In successful applications of cytometry, **electro-optics**, electronics, and computers are employed to improve on what could be obtained "by eye," although interpretation is required more often than not. The successful applications are many, increasing in number, and commonplace in locales as diverse as clinical laboratories and breweries.

### Some Notable Applications

Cytometry is currently used to obtain the helper T lymphocyte counts needed to monitor the course and treatment of HIV infection, and to determine tumor cell DNA content

# AMICI O NEMICI???





## Vantaggi

- possibilità' di analisi multiparametrica
- elevato numero di cellule esaminate
- rapidita' dei tempi di analisi (oltre 1000 cellule/sec)
- obiettività, riproducibilità e affidabilità statistica delle letture
- i campioni possono essere processati senza perdere la vitalità cellulare
- analisi di cellule molto rare, che a causa del loro ridotto numero in confronto agli eventi analizzati potrebbero essere difficilmente separabili dal "rumore di fondo"

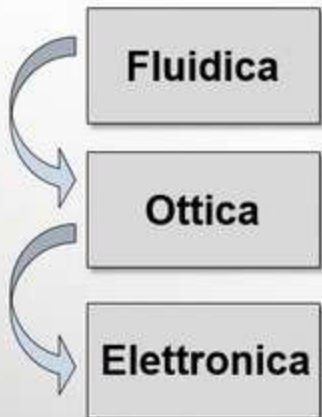
## Limiti

- Analisi di cellule che esprimono poco le componenti studiate,
- necessita' di dover lavorare con campioni in fase monodispersa,
- Perdita della visione diretta del campione

## IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità

- ✓ Con tale metodica è possibile acquisire e memorizzare più parametri analitici per ogni cellula analizzata (volume, complessità cellulare e parametri di fluorescenza). Utilizzando questi parametri a confronto si ottengono differenti rappresentazioni elettroniche di analisi ed è possibile così discriminare differenti sottopopolazioni cellulari.
- ✓ Il principio di funzionamento del citometro a flusso (CF) si basa sulla capacità di raccogliere la fluorescenza emessa dalle cellule in seguito ad opportuna eccitazione luminosa, sia per mezzo di sostanze naturalmente presenti nel campione che per mezzo di proteine fluorescenti artificialmente introdotte.

## IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità



Cellule in sospensione monodispersa scorrono in singola fila attraverso un punto di interrogazione illuminato, dove "riflettono" luce ed emettono fluorescenze che vengono raccolte, filtrate e convertite in Segnali Digitali (valori numerici) che sono inviati ad un computer dove sono memorizzati per poi elaborarli.



## IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità



**ELABORATORE DATI**  
SOFTWARE

## IL CITOMETRO A FLUSSO: generalità

**Evento (Oggetto) Biologico**



**Allestimento del Campione**



**Misura Citometrica**



**Analisi delle Distribuzioni**



**Interpretazione, Risultato**

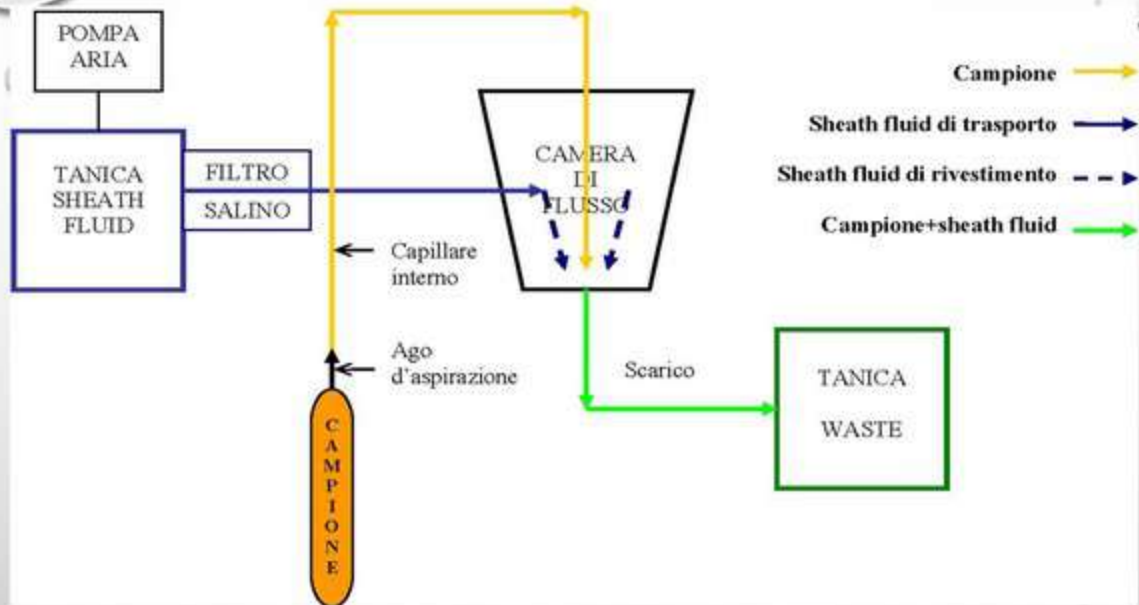
Il risultato di una misura citometrica deve essere proporzionale al fenomeno biologico esplorato.

Questa proporzionalità deve venire mantenuta lungo tutto il percorso

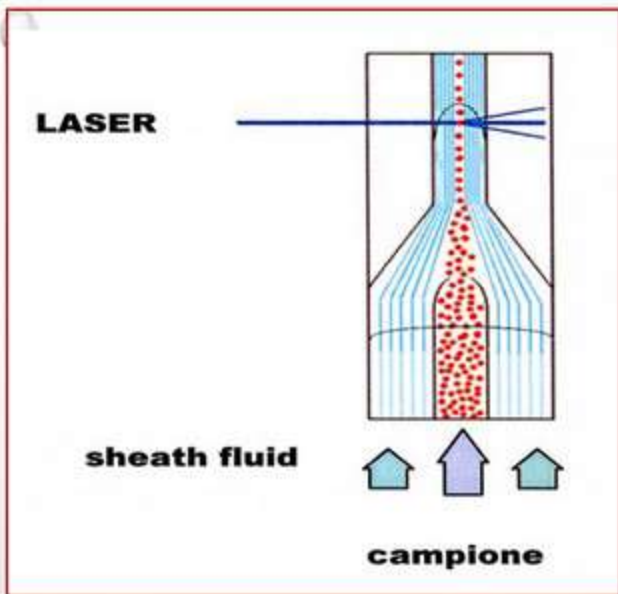
# COMPONENTI DEL CITOMETRO A FLUSSO





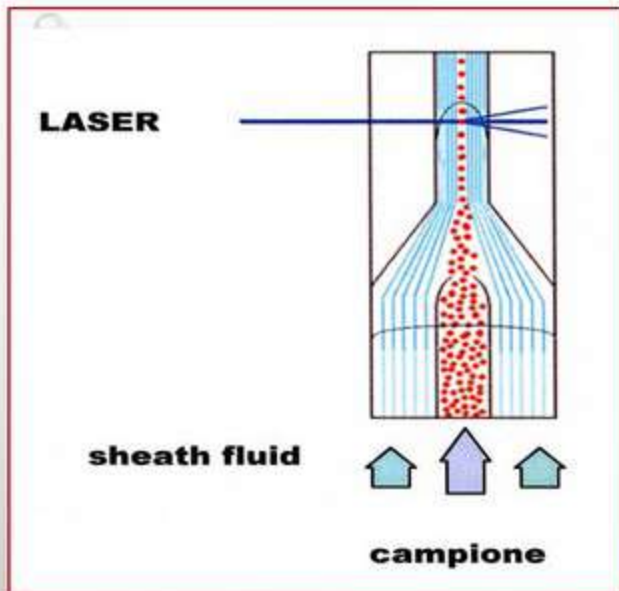


- **Le particelle da analizzare devono essere una soluzione monodispersa**



Le particelle devono essere in sospensione monodispersa in modo da potersi disporre ordinatamente allineate in singola fila e passare per il «punto di interrogazione» dove è focalizzato il fascio di luce di eccitazione.

Il campione una volta all'interno della camera di/a flusso viene inguainato dallo *sheath fluid* di rivestimento ed entra in una prima regione chiamata *nozzle*



- IL NOZZLE È LA COMPONENTE "CRUCIALE" E PIÙ DELICATA DI UN CITOMETRO A FLUSSO, IN QUANTO AL SUO INTERNO IL CAMPIONE VIENE SOTTOPOSTO AD UN PROCESSO DI

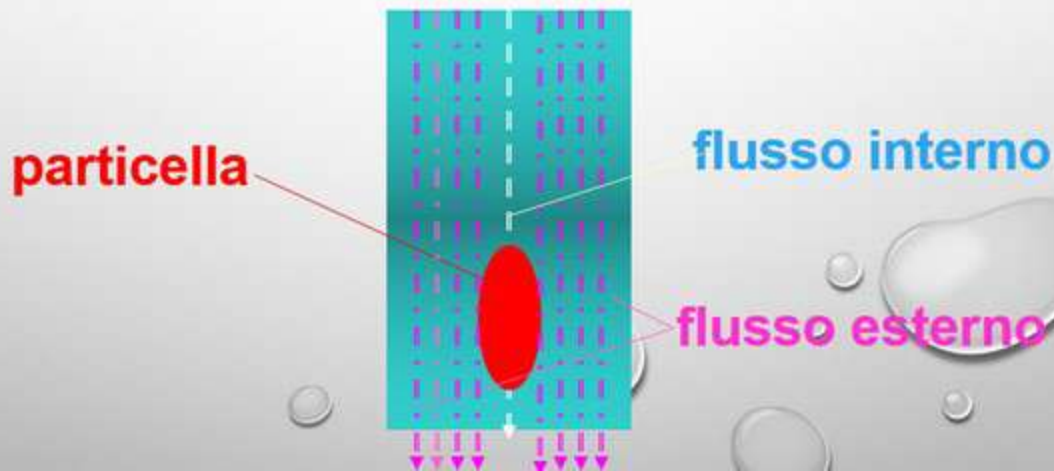
## **FOCALIZZAZIONE IDRODINAMICA,**

IL QUALE RISULTA ESSERE IL PRINCIPIO SU CUI SI FONDA L'ANALISI CITOFUORIMETRICA



# Flusso laminare

IN TALI CONDIZIONI DI FLUSSO SI POSSONO CONSIDERARE DUE REGIMI FLUIDICI COASSIALI: QUELLO INTERNO (*CORE FLOW*) CONTIENE LE PARTICELLE, QUELLO ESTERNO (*SHEAT FLOW*) MANTIENE QUESTE ULTIME LUNGO L'ASSE IDEALE DI FLUSSO.



# Moto laminare e moto turbolento

Il passaggio dal moto laminare a quello turbolento è caratterizzato da un parametro detto **Numero di Reynolds**: che è funzione della densità, viscosità, velocità del liquido e diametro del condotto.

$$Re = \frac{\rho V d}{\mu}$$

Diagram illustrating the components of the Reynolds number equation:

- $\rho$ : densità
- $V$ : Velocità
- $d$ : Diametro del condotto
- $\mu$ : viscosità

Il numero di Reynolds è adimensionale  
 $Re < 2000$  MOTO LAMINARE  
 $Re > 4000$  MOTO TURBOLENTO

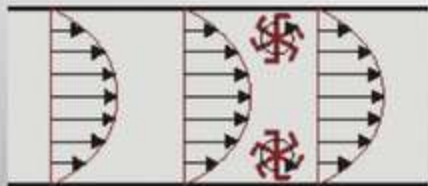
In fluidodinamica, la **legge di Poiseuille** (o anche di **Hagen-Poiseuille**) indica che la resistenza fluidodinamica ( $r$ , cioè la forza che si oppone al moto in un fluido) è inversamente proporzionale alla sezione della condotta ( $S$ ) e direttamente proporzionale alla viscosità ( $\mu$ ) .

Per tale legge il profilo di velocità del fluido sarà parabolico con una velocità massima centrale.

$$r = \mu / S$$

Sezione  
condotta

viscosità



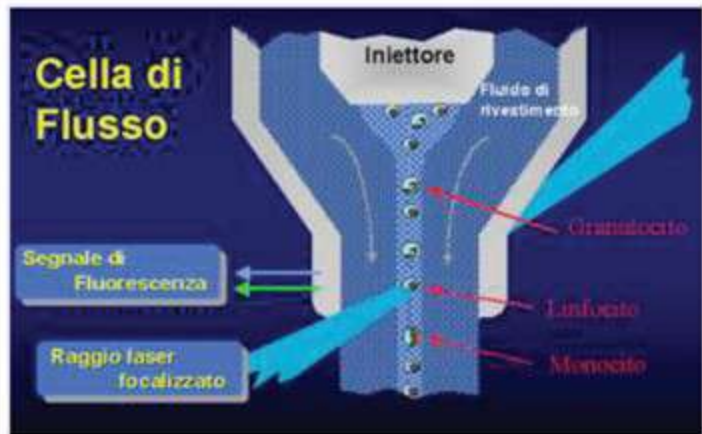


# CAMERA A FLUSSO

Cella a flusso: nozzle+capillare

Nel nozzle si crea un moto laminare, in cui il flusso aumenta laddove si restringe la sezione.

Importante che il flusso del CORE (cilindretto) sia costante



# FLUIDICA - LE CAMERE DI FLUSSO

## QUATTRO TIPI BASE DI CAMERE:

### – **Jet - in - Air**

- Sistemi aperti, ottimi per sorting, scadenti proprietà ottiche.

### – **Cuvette di Quarzo**

- Sistemi chiusi, le più diffuse, ottime proprietà ottiche, *possono supportare sorting piezoelettrico (stream - in air)*.

### – **Flusso Aperto su Superficie Verticale**

- Buone proprietà ottiche, molto instabili, no sorting

### – **Flusso Chiuso**

- Tipo vetrino di microscopio, eccellenti qualità ottiche, no sorting, solo su strumenti antiquati.

## CAMERE A FLUSSO

### QUARZO

### GETTO IN ARIA

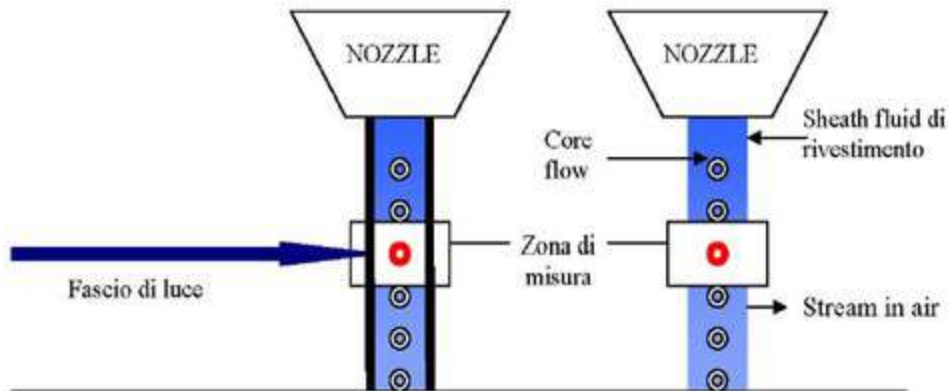


Fig. 1.6. Cella a flusso con capillare in quarzo o chiusa (sinistra) e a getto libero o aperta (destra).



## COME REALIZZIAMO L'INIEZIONE DEL CAMPIONE NEL FLUSSO?

1. A PRESSIONE NEGATIVA, **ASPIRAZIONE DEI LIQUIDI**;
2. A PRESSIONE POSITIVA, **DI TIPO DIFFERENZIALE**;
3. **AD INIEZIONE VOLUMETRICA**.

Il **sistema ad aspirazione** dei liquidi è oggi il meno utilizzato, in quanto si è osservato che applicando una pressione negativa sui liquidi in scorrimento si può verificare l'insorgenza di bolle gassose tali da diminuire la risoluzione analitica. Questo sistema è quindi ormai superato dagli altri due tipi.

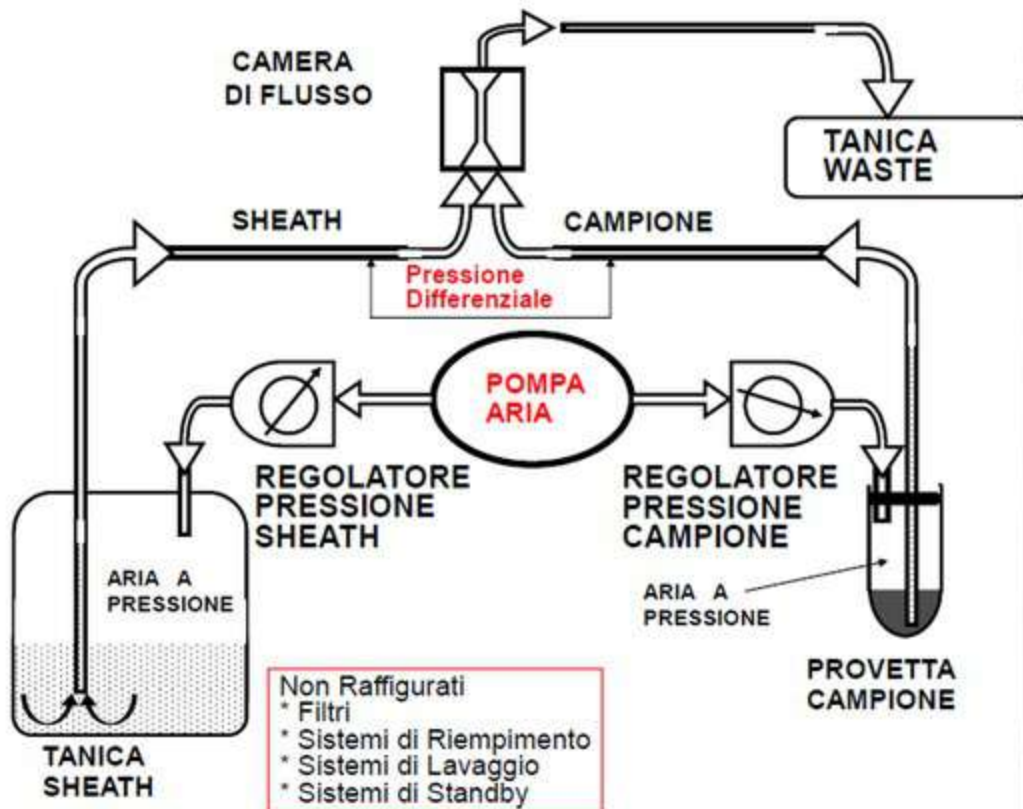
## 2. LA PRESSIONE DIFFERENZIALE

- IL MOTORE AD ARIA COMPRESSA (O AZOTO) PRESSURIZZA SHEATH E

CAMPIONE MENTRE DEI REGOLATORI DI PRESSIONE CONTROLLANO IN PRIMO LUOGO LA PRESSIONE E IL FLUSSO DELLO SHEATH E CREANO UNA

PRESSIONE DIFFERENZIALE =  $P \text{ CAMPIONE} / P \text{ SHEATH}$ .

- LA PRESSIONE DEL CORE CENTRALE ALL'USCITA DAL CAPILLARE NEL NOZZLE È LEGGERMENTE INFERIORE A QUELLA DEL FLUIDO ESTERNO (*SHEATH FLUID*). QUESTA DIFFERENZA DI PRESSIONE PUÒ ESSERE VARIATA E REGOLA IL **FLOW RATE**, VELOCITÀ DEL FLUSSO DELLE PARTICELLE.



L'operatore può variare la velocità d'analisi modificando solamente la pressione sul core centrale. La velocità del campione è preimpostata negli strumenti su più livelli definiti manualmente o dal software:  
**LOW, MEDIUM e HIGH.**

- LA RIDUZIONE DELLA PRESSIONE (RATE) DELLO SHEATH AUMENTA LA QUANTITA' DI LUCE RACCOLTA E QUINDI LA SENSIBILITA'



**AL CRESCERE DELLA VELOCITÀ DI FLUSSO AUMENTA IL COEFFICIENTE DI VARIAZIONE (CV) A DISCAPITO DELLA RISOLUZIONE ANALITICA**

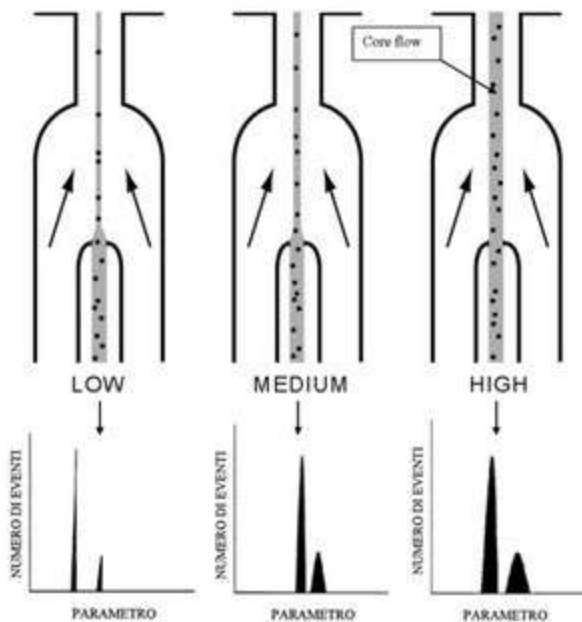
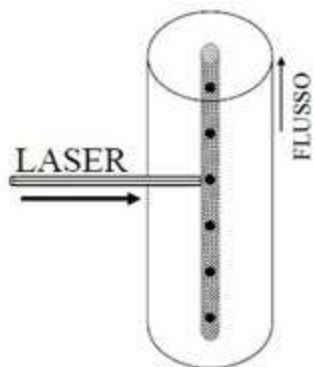


Fig. 1.10. Flusso del campione a diverse velocità ed incremento del CV del picco da sinistra verso destra.

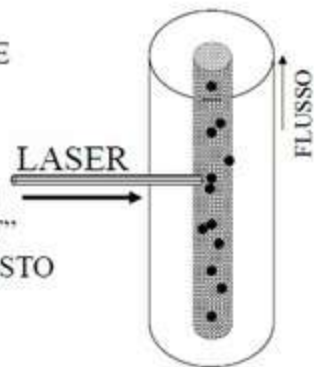
### **RATE BASSO (200-500 Eventi/sec)**

LE CELLULE VENGONO "CENTRATE" REGOLARMENTE DAL LASER E GENERANO SEGNALI UGUALI A PARITA' DI CARATTERISTICHE PERCHE' VENGONO INTERCETTATI DALLA STESSA QUANTITA' DI ENERGIA



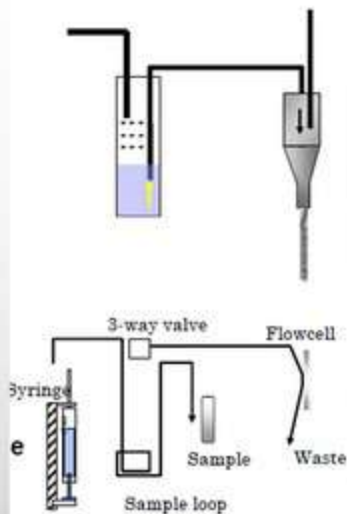
### **RATE ALTO (2000-3000 Eventi/sec)**

LE CELLULE SCORRONO IN ZONE DIVERSE DEL CORE E INTERCETTANO REGIONI A DIVERSA ENERGIA DELLO "SPOT" DEL LASER SULLO STREAM. A PARITA' DI CARATTERISTICHE VENGONO GENERATI SEGNALI DISUGUALI. LO "SPOT" ELLITTICO RIDUCE ULTERIORMENTE QUESTO ERRORE STRUMENTALE. I Sorter ad alta pressione/velocità hanno risolto il problema aumentando la pressione di sheath



### 3. INIEZIONE VOLUMETRICA

- IL FLUSSO DEL CAMPIONE E' LIBERO E CONTINUO
- QUESTO SISTEMA, PERMETTE DI REGOLARE CON PRECISIONE IL FLUSSO DEL CAMPIONE FINO AD UNA VELOCITÀ DI 0.2 ML/MINUTO.
- CONOSCENDO IL VOLUME DELLA SIRINGA ED IL NUMERO DI PARTICELLE REGISTRATE, SI PUÒ RISALIRE AL NUMERO DI PARTICELLE PER UNITÀ DI VOLUME DEL CAMPIONE.
- LA QUALITA' DELLE MISURE ASSOLUTE SI BASA SUL CONTROLLO ELETTRONICO DI PRESSIONI E VOLUMI



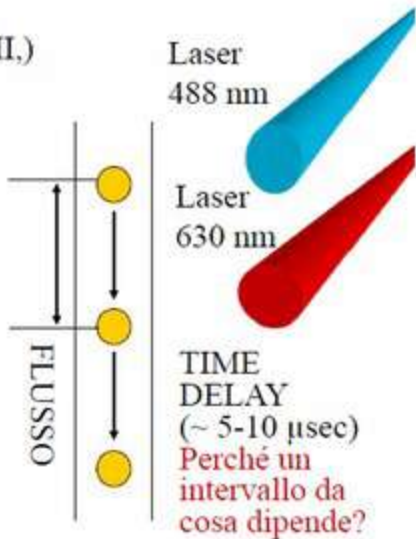
## CONTROLLO ELETTRONICO DELLA FLUIDICA

### La Fluidica Condiziona il Corretto Funzionamento della Parte Ottica, Specialmente nei sistemi a Doppio o Triplo Laser

Nei sistemi a doppio o triplo laser (ARIA II,) (MoFlo) è essenziale che la fluidica sia perfettamente in sincronia con l'elettronica.

Per questo il FLUSSO è sotto stretto controllo elettronico (pompa digitale).

La stessa cellula deve passare dal primo al secondo laser in un tempo NOTO e STABILE, in modo da essere riconosciuta e ricondotti i suoi diversi impulsi (2 o 3) come UN SINGOLO EVENTO Laser (riferito al primario 488 nm)





## PROBLEMI FLUIDICI:



- ✓ bolle d'aria presenti nel circuito/nozzle
- ✓ occlusione da aggregati cellulari o corpuscoli di grande diametro (prevalentemente in sorter)
- ✓ residui nelle tubazioni che convogliano il campione, come può avvenire con un precedente passaggio di coloranti per il DNA
- ✓ perdita di pressurizzazione in vari punti del circuito, come nei resistori per crescita algale
- ✓ reflusso di liquido in parti del circuito che normalmente contengono aria
- ✓ contaminazione dello sheath fluid e/o inadeguata azione del suo filtro con generazione di rumore di fondo fluidica, in questo caso gli eventi vengono acquisiti anche senza campione!