

## RICERCHE DI CITOMETRIA SUI GRANULOCITI EOSINOFILI PERIFERICI (\*)

(Con due figure)

VITTORIO GALLO

**SUMMARIVM.** — Citometricum examen granulocytorum eosynophilorum periphericorum peracta est, per diametri quingentorum elementorum mensionem, aequa ratione distributorum, in decem casibus. Ita supputatae sunt praecipuae biometricae constantes, et functio critica Pearsoniana. Quaesitae etiam sunt causae, quibus diversitas inter diametra habetur. Postremo investigatum est de mutua necessitudine inter diametrum et gradum segmentationis nuclearis.

Scarsi e discordanti sono nella letteratura i dati concernenti le dimensioni dei granulociti eosinofili periferici (BAILEY, BUNTING, HALLIBURTON, LOVE, MAXIMOW) (1). Dal ROVERSI che in accurate ricerche citometriche si è prevalentemente occupato dalla serie neutrofila non possiamo assumere ulteriori informazioni al riguardo. La ragione principale di tutto ciò deve ricercarsi nella difficoltà di raccogliere un numero sufficiente di dati per la scarsità degli elementi eosinofili sullo striscio.

Dato però l'interesse fisiopatologico che presentano tali cellule, ho pensato che uno studio sistematico citometrico della serie in questione non sarebbe solo stato fine a se stesso, ma avrebbe giovato ad una conoscenza più profonda della loro biologia. Pertanto ho pensato

---

(\*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio S. E. Antonio Pensa il 31 Luglio 1947.

(1) Secondo BAILEY  $\mu$  12-14, secondo BUNTING  $\mu$  10-12, secondo HALLIBURTON  $\mu$  12-15, secondo LOVE  $\mu$  14,3 (media), secondo MAXIMOW  $\mu$  12 (media).

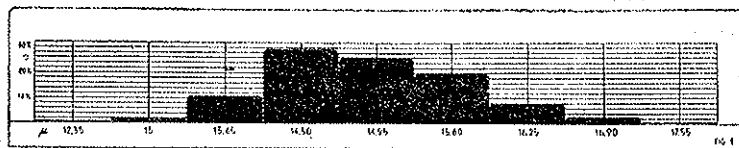
di riesaminare gli elementi eosinofili normali con una più dettagliata analisi biometrica onde avere un termine sicuro di confronto per ulteriori indagini in campo patologico.

Si sono svolte le ricerche su dieci casi normali (adulti e maschi), misurando per ogni caso cinquanta cellule. Dopo 10' dal prelievo gli strisci vennero colorati col May Grünwald-Giemsa osservando scrupolosamente i tempi (3', 6', 18'). Come dimensione da misurare ho scelto la media aritmetica di due diametri incrociati, scelti nel modo più opportuno.

Nella seguente tabella sono riportate le seriazioni relative ai singoli casi e al gruppo statistico, formato dal loro insieme, con l'istogramma delle frequenze.

## FREQUENZE

Diametri	Caso I°	Caso II°	Caso III°	Caso IV°	Caso V°	Caso VI°	Caso VII°	Caso VIII°	Caso IX°	Caso X°	Tutti
12,85	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
13,00	3	4	3	—	—	—	—	—	—	—	10
13,65	7	9	13	3	4	7	2	1	4	2	52
14,30	16	14	17	14	12	15	23	11	6	20	148
14,95	16	15	7	12	14	15	14	15	13	10	131
15,60	5	4	10	13	12	10	8	12	18	8	100
16,25	1	1	—	6	6	3	2	8	7	7	41
16,90	2	1	—	2	1	—	1	3	1	2	13
17,55	—	—	—	—	1	—	—	—	1	1	3



Come valori rappresentativi sintetici dei diametri misurati ho scelto la media aritmetica ( $A$ ) e la moda ( $N_m$ ), che sono le medie più usate in campo biometrico. La moda, anzichè identificarla con il valore centrale della classe più frequente, per essere più corretta, è stata ottenuta per interpolazione con il metodo dei momenti, sul quale, per brevità, non mi intrattengo; tale metodo ha servito anche per il calcolo delle altre costanti biometriche di cui andremo trattando.

Come misura della variabilità ho scelto lo scarto quadratico medio, simboleggiato dalla lettera  $\sigma$  e dato, per  $n$  (<sup>1</sup>) abbastanza grande, da:

$$\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - A)^2}$$

essendo  $n$  il numero degli scostamenti  $(x_i - A)$  dalla media aritmetica.

Come indice di variabilità relativa ho scelto il coefficiente di variabilità, ossia:

$$v = \frac{\sigma \times 100}{A}$$

In quanto all'asimmetria delle distribuzioni di frequenza, come sua misura ho impiegato lo skewness di Pearson, dato da:

$$\alpha = \frac{A - N_a}{\sigma}$$

Per esprimere, in base al numero delle osservazioni ( $n$ ), il grado di fiducia che dobbiamo accordare alle costanti biometriche ricavate, si è calcolata per ciascuna di esse il suo errore medio. Il vero valore della costante riferita alla popolazione infinita si ritiene praticamente compreso entro il triplo del suo errore medio.

Alle formule seguenti corrispondono gli errori medi della media aritmetica ( $\epsilon_A$ ), della moda ( $\epsilon_D$ ), inteso come errore della differenza  $A - N_a$ , dello scarto quadratico medio ( $\epsilon_\sigma$ ), del coefficiente di variabilità ( $\epsilon_v$ ), e infine dell'indice di asimmetria ( $\epsilon_\alpha$ ):

$$\epsilon_A = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad \epsilon_D = \pm \sigma \sqrt{\frac{3}{2n}}, \quad \epsilon_\sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2n}},$$

$$\epsilon_v = \frac{v}{\sqrt{2n}} \left[ 1 + 2 \left( \frac{v}{100} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}, \quad \epsilon_\alpha = \sqrt{\frac{3}{2n}}$$

Dato che  $2 \left( \frac{v}{100} \right)^2$  risulta nel nostro caso una quantità piuttosto piccola si è calcolato il valore approssimativo di  $\epsilon_v$  secondo l'espressione  $\pm \frac{v}{\sqrt{2n}}$ .

Nella seguente tabella vengono riportati i valori delle costanti biometriche relativi alle seriazioni studiate.

(<sup>1</sup>) Per un numero di osservazioni piccolo in luogo di  $n$  va posto  $n-1$ .

A ciascuna costante segue il triplo del suo errore medio.

Caso	$A \pm 3\epsilon_A$	$N_a \pm 3\epsilon_D$
I	14,61 $\pm$ 0,358	14,44 $\pm$ 0,438
II	14,39 $\pm$ 0,385	14,39 $\pm$ 0,472
III	14,40 $\pm$ 0,328	14,07 $\pm$ 0,402
IV	15,09 $\pm$ 0,345	14,86 $\pm$ 0,422
V	15,09 $\pm$ 0,362	14,87 $\pm$ 0,444
VI	14,79 $\pm$ 0,306	14,64 $\pm$ 0,374
VII	14,79 $\pm$ 0,284	14,29 $\pm$ 0,348
VIII	15,28 $\pm$ 0,336	15,00 $\pm$ 0,412
IX	15,29 $\pm$ 0,350	15,29 $\pm$ 0,428
X	15,05 $\pm$ 0,382	13,70 $\pm$ 0,467
TUTTI	14,89 $\pm$ 0,117	14,78 $\pm$ 0,143

Caso	$\sigma \pm 3\epsilon_\sigma$	$\nu \pm 3\epsilon_\nu$	$\alpha \pm 3\epsilon_\alpha$
I	0,845 $\pm$ 0,253	5,78% $\pm$ 1,73	0,204 $\pm$ 0,519
II	0,910 $\pm$ 0,274	6,32% $\pm$ 1,90	0,005 $\pm$ 0,519
III	0,774 $\pm$ 0,232	5,38% $\pm$ 1,61	0,435 $\pm$ 0,519
IV	0,815 $\pm$ 0,245	5,40% $\pm$ 1,62	0,285 $\pm$ 0,519
V	0,855 $\pm$ 0,256	5,66% $\pm$ 1,70	0,261 $\pm$ 0,519
VI	0,721 $\pm$ 0,266	4,88% $\pm$ 1,46	0,210 $\pm$ 0,519
VII	0,670 $\pm$ 0,201	4,53% $\pm$ 1,36	0,753 $\pm$ 0,519
VIII	0,734 $\pm$ 0,239	5,20% $\pm$ 1,56	0,356 $\pm$ 0,519
IX	0,824 $\pm$ 0,248	5,40% $\pm$ 1,62	0,000 $\pm$ 0,519
X	0,904 $\pm$ 0,272	6,00% $\pm$ 1,80	1,531 $\pm$ 0,519
TUTTI	0,874 $\pm$ 0,083	5,86% $\pm$ 0,556	0,137 $\pm$ 0,164

Come si può osservare, in nove casi i valori modali si presentano costantemente inferiori alle corrispondenti medie aritmetiche, mentre in un caso solo i due parametri, con l'approssimazione da noi raggiunta, si identificano. Il fatto però di trovare su nove un solo caso in cui si dovrebbe parlare di perfetta simmetria ci lascia molto in dubbio sull'at-

tribuirgli tale proprietà e ci fa piuttosto pensare che il valore nullo dell'indice  $\alpha$  anzichè corrispondere alla realtà (riferendosi alla rispettiva popolazione infinita), sia una variazione accidentale intorno ad un valore positivo dello stesso. Possiamo così esprimere, come regola, che le seriazioni dei diametri dei granulociti eosinofili si presentano asimmetriche con massimi di frequenza spostati verso il limite inferiore della curva di frequenza.

Sappiamo del resto come la simmetria perfetta o quasi sia un evento piuttosto raro in biologia.

Ammettendo allora la sistematicità dell'asimmetria nelle nostre seriazioni e scartando perciò l'equazione della curva gaussiana per rappresentare nel continuo le serie di frequenza studiate, ciò che implicherebbe come condizione necessaria, sebbene non sufficiente, la simmetria delle stesse, si presenta il problema della scelta di un'altra funzione che si adatti allo scopo. In casi simili già da tempo i biologi ricorrono al sistema delle curve di Pearson la cui scelta è subordinata al calcolo di una particolare costante detta funzione critica del Pearson o funzione  $F$  (qualcuno la chiama anche costante  $K$ ) e alle costanti  $\beta_1$  e  $\beta_2$ .

Le espressioni delle tre costanti sono le seguenti:

$$F = \frac{\beta_1(\beta_2 + 3)^2}{4(4\beta_2 - 3\beta_1)(2\beta_2 - 3\beta_1 - 6)}$$

$$\beta_1 = \frac{\mu_3^2}{\mu_2^3}$$

$$\beta_2 = \frac{\mu_4}{\mu_2^2}$$

#### ERRATA CORRIGE (PAG. 191)

Le espressioni

$$\mu_2 = \sum_{i=1}^n y_i (x_i - A)^2 \text{ ecc.}$$

vanno corrette come segue

$$\mu_2 = \sum_{i=1}^n y_i \left( \frac{x_i - A}{\lambda} \right)^2 \text{ ecc.}$$

essendo  $\lambda$  l'ampiezza di classe e  $y_i$  le frequenze relative.

La distribuzione gaussiana costituisce un caso particolare del sistema delle curve Pearson (quando  $F = 0$ ,  $\beta_1 = 0$  e  $\beta_2 = 3$ ).

I valori sperimentali di  $F$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , sono risultati i seguenti:

Casi	F	$\beta_1$	$\beta_2$
I	0,294	0,233	3,665
II	0,000	0,000	3,327
III	-0,014	0,036	2,065
IV	-0,322	0,063	2,340
V	-0,283	0,187	3,020
VI	-0,015	0,030	2,270
VII	-0,627	0,865	3,662
VIII	-0,087	0,076	2,305
XI	0,000	0,000	3,190
X	-0,222	0,545	2,730
TUTTI	-0,515	0,070	3,053

Nell'ipotesi che si tratti qui di serie pearsoniane, i valori negativi di  $F$  indicano come equazione da adottarsi la seguente (tipo 1°):

$$y = y_0 \left(1 + \frac{x}{a_1}\right)^{\nu a_2} \left(1 - \frac{x}{a_2}\right)^{\nu a_1}$$

relativa ad una curva limitata ai due estremi, asimmetrica e con origine al valore modale.

Nel caso 1° in cui  $F$  è positivo e minore di uno la funzione di frequenza sarebbe invece la seguente (tipo 4°):

$$y = y_0 \left(1 + \frac{x^2}{a^2}\right)^{-m} e^{-\nu \operatorname{arctg} \frac{x}{a}}$$

relativa ad una curva asintotica in entrambe le direzioni e asimmetrica. - Nel caso II e IX in cui la funzione  $F$ , almeno con il nostro

grado di approssimazione, risulta nulla, essendo  $\beta_2 < 3$  l'equazione da adottarsi sarebbe (tipo II):

$$y = y_0 \left(1 - \frac{x^2}{a^2}\right)^m$$

relativa ad una curva limitata ai due estremi, simmetrica e con origine al valore modale.

Va però notato che i valori della funzione critica  $F$  e delle costanti  $\beta_1$  e  $\beta_2$  costituiscono una condizione necessaria ma non sufficiente per la scelta di una curva entro il sistema delle curve di Pearson, nel senso che, una volta stabilitone il tipo, resta ancora da provarne l'adattamento con i valori sperimentali mediante il test  $\chi^2$  di Pearson. Quest'ultima indagine, connessa ad altre questioni relative all'argomento troverà luogo in una mia ulteriore nota.

Viste le principali costanti biometriche riferite ai singoli casi e al gruppo statistico risultante dal loro insieme e fatto un breve cenno sulle equazioni di Pearson che potrebbero rappresentare nel continuo le serie di frequenza studiate, nel caso che esse siano pearsoniane, occupiamoci ora di un dettaglio di tecnica che, da quanto si dirà, risulta di una certa importanza e può costituire una causa d'errore quando si presentasse l'eventualità di paragonare i nostri risultati con quelli di altri autori.

Si tratta della disposizione degli elementi eosinofili sullo striscio rispetto alle loro dimensioni. È noto già da tempo che i globuli bianchi si distribuiscono sul vetrino in modo irregolare (Gyllenward); per cui, eliminata l'eventuale causa d'errore consistente in una disposizione non casuale delle dimensioni diametriche in senso trasversale avendo percorso il vetrino a partire da due centimetri dall'estremo ove si è iniziato lo striscio e proceduto a serpentina verso il centro toccando alternativamente i due margini, restava ancora da controllare se, man mano che si procedeva longitudinalmente verso il centro del vetrino, le dimensioni tendevano o no a variare sistematicamente in più o in meno.

Per risolvere il problema, nei primi cinque casi si sono compilate due distinte seriazioni per ciascuno di essi, l'una costituita dai primi 25 elementi misurati e l'altra dai restanti 25 e se ne sono paragonate le rispettive medie, osservando se le differenze tra le medie

dei due gruppi erano sempre in un senso e paragonando i risultati con quelli che si sarebbero avuti per effetto del caso.

Si riportano i risultati ottenuti, ove  $A_1$  corrisponde alla media aritmetica dei primi 25 elementi misurati e  $A_2$  corrisponde alla media aritmetica degli altri 25 elementi:

Casi	$A_1$	$A_2$	$A_2 - A_1$
I	14,40	14,82	+ 0,42
II	14,03	14,75	+ 0,72
III	14,18	14,62	+ 0,44
IV	14,82	15,39	+ 0,57
V	15,09	15,12	+ 0,03

Le differenze che si presentano costantemente di egual segno, con prevalenza delle medie  $A_2$ , fanno concludere per una distribuzione non casuale delle cellule sullo striscio, rispetto alle loro dimensioni, in modo che procedendo longitudinalmente verso il centro del vetrino e oltre, le dimensioni tendono a variare in più. Per dare una valutazione quantitativa alla nostra conclusione chiediamoci con quale probabilità si sarebbe ottenuto per effetto del caso un simile risultato. Si tratta di applicare il problema del calcolo delle probabilità inerente alle prove ripetute di eventi indipendenti.

Chiamando allora con E l'evento di trovare  $A_2 > A_1$  ed F l'evento contrario, ossia di trovare  $A_2 \leq A_1$ , aventi rispettivamente le probabilità  $p$  e  $q$ , ci chiediamo quale è la probabilità di trovare  $n$  volte E essendo  $n$  stesso il numero delle prove.

Nella ipotesi della casualità è  $p = q = 0,50$ ,  $n$  nel nostro caso corrisponde a 5, onde la probabilità cercata risulterà:

$$\binom{n}{n} p^n q^{n-n} \quad \text{ossia} \quad \binom{5}{5} p^5 q^{5-5} = p^5$$

e quindi  $0,50^5$ , che corrisponde a una probabilità percentuale del 3% circa, per cui possiamo con una certa sicurezza confermare il nostro giudizio sulla sistematicità dell'errore che si compie procedendo dall'inizio dello striscio verso il centro.



Dobbiamo ora dedicarci ad un'altra questione. Come si può osservare dalla tavola 2 i diametri medi riferiti a ciascun caso appaiono generalmente differenti. Si pone allora il problema di stabilire se, pensando di portare all'infinito il numero delle osservazioni, i diversi valori tendono ad un valore unico o rimangono ancora distinti, ciò che in linguaggio statistico moderno equivale a dire se i singoli casi costituiscono altrettanti campioni provenienti da un medesimo universo e da universi in tutto o in parte distinti.

Per poter rispondere al nostro quesito applichiamo la cosiddetta « analisi della varianza » (analysis of variance) introdotta in metodologia statistica da R. A. FISHER.

Il metodo può così brevemente riassumersi:

Si considerano  $m$  campioni ciascuno costituito di  $n$  elementi e sia  $x$  il carattere misurato. Si pensi di disporre allora le  $m n$  misure in  $m$  colonne ed  $n$  righe. Le colonne corrispondono a ciascun caso (o campione). Le righe invece collegano elementi ciascuno di un caso diverso, ordinati in modo causale od arbitrario.

$x_{1,1}$	$x_{1,2}$	$x_{1,3} \dots x_{1,m}$
$x_{2,1}$	$x_{2,2}$	$x_{2,3} \dots x_{2,m}$
$x_{3,1}$	$x_{3,2}$	$x_{3,3} \dots x_{3,m}$
.....	.....	.....
$x_{n,1}$	$x_{n,2}$	$x_{n,3} \dots x_{n,m}$

Qualora gli  $m$  campioni provengano da universi in tutto o in parte differenti, la variabilità nel senso delle colonne, ossia entro ciascun gruppo (o caso), sarebbe di regola inferiore alla variabilità nel senso delle righe (tra i gruppi) cioè in collettività formate da elementi di ciascun campione, per il fatto che, mentre nel senso delle colonne gli elementi provengono da uno stesso universo e sono perciò omogenei, in quest'ultimo caso provengono da distinti universi e sono perciò eterogenei. Nel caso di provenienza da un comune universo le due variabilità tendono ad identificarsi.

Si tratta allora di giudicare se è significativa o meno la differenza tra le due variabilità in questione.

Le grandezze da considerare sono:

1. la varianza di tutti gli  $m n$  elementi ( $\sigma^2$ )

2. la varianza delle colonne  $\sigma_n^2 = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \sigma_{i,j}^2$  dove  $\sigma_{i,j}^2$  sono le varianze di ogni caso

3. la varianza delle righe  $\sigma_m^2 = \frac{n \sum_{j=i}^m (\bar{x}_{i,j} - \bar{x})^2}{m - 1}$  dove  $\bar{x}_{i,j}$  sono le medie relative ad ogni caso ed  $\bar{x}$  la media generale.

La varianza  $\sigma^2$  si ottiene elevando al quadrato lo scarto quadratico medio del gruppo statistico formato dall'insieme dei casi.

Convien riassumere le diverse grandezze considerate nel seguente specchio:

Causa della variazione	Somma dei quadrati degli scarti	Gradi di libertà	Varianze (col. 2: col. 3)
col. 1	col. 2	col. 3	col. 4
Varianza nei gruppi	$(n-1) \sum_{j=1}^m \sigma_{i,j}^2$	$(n-1)m$	$\sigma_n^2$
Varianza tra i gruppi	$n \sum_{j=1}^m (\bar{x}_{i,j} - \bar{x})^2$	$m-1$	$\sigma_m^2$
Varianza totale	$(nm-1) \sigma^2$	$nm-1$	$\sigma^2$

Si mettono allora a confronto le due varianze  $\sigma_n^2$  e  $\sigma_m^2$  facendo il rapporto della varianza maggiore alla varianza minore, ossia:

$$F = \frac{\sigma_m^2}{\sigma_n^2}$$

La costante  $F$  dicesi di SNEDECOR, autore che ne ha anche tabulati i valori a limiti di significato 5% e 1% ricavandoli da corrispondenti valori del test  $z$  di FISHER che equivale a:

$$\frac{1}{2} (\log_e \sigma_m^2 - \log_e \sigma_n^2)$$

Per stabilire se la differenza tra  $\sigma_m^2$  e  $\sigma_n^2$  sia sistematica e quindi se i nostri campioni provengono da distinti universi si confronta il valore sperimentale di  $F$  con quelli tabulati dallo SNEDECOR scegliendo la colonna corrispondente ai gradi di libertà della varianza maggiore e la linea corrispondente ai gradi di libertà della varianza minore.

All'incrocio della colonna con la linea sonvi due numeri che danno rispettivamente i limiti del rapporto  $F$  che si ottiene per effetto del caso nel 5% e nell'1% delle prove. Si conviene di stabilire significativa la differenza tra le due varianze e quindi la provenienza dei campioni da universi in tutto o in parte

distinti quando l' $F$  sperimentale corrisponde circa al valore limite 5%, si ritiene ancora più fondata l'ipotesi quando l' $F$  sperimentale supera quello tabulato corrispondente al limite 1%.

Applicando quanto è detto nel caso nostro si è ottenuto il seguente specchietto che corrisponde a quello testè riportato:

Causa della variazione	Somma dei quadrati degli scarti	Gradi di libertà	Varianza
Varianza nei gruppi	324,00	490	0,664
Varianza tra i gruppi	48,90	9	5,44
Varianza totale	379,00	499	0,760

La costante di SNEDECOR risulta 8,2. Entrando allora nella tavola di detto autore con i gradi di libertà corrispondenti a 490 e 9 (interpolando linearmente tra 8 e 12) osserviamo che i valori corrispondenti ai limiti di significato 5% e 1% sono di gran lunga inferiori a quello sperimentale, onde possiamo concludere con buon margine di sicurezza che i 10 casi esaminati provengono da universi in parte distinti. Diciamo in parte distinti perchè non tutti i diametri medii sono disuguali l'uno dall'altro e perchè non passiamo a priori escludere che una o più combinazioni a due a due dei casi sia formata da valori corrispondenti a un comune universo.

Si tratta ora di indagare sulle cause che intervengono nel determinismo di questa variabilità dei diametri medii, superiore a quella che si sarebbe dovuta attendere nel caso che i campioni studiati fossero provenuti da un comune universo.

Se non eliminata, pensando di aver resa almeno pressochè costante la causa d'errore dovuta alla distribuzione non casuale degli elementi sullo striscio, ciò che permette nondimeno la comparabilità dei risultati ottenuti con la stessa tecnica, si può ancora pensare all'esistenza d'altre cause sperimentali di errore (spessore diverso dello striscio, diversa velocità nello strisciare il sangue, ecc.), sebbene si abbia avuto l'intenzione di mantenerle il più possibile costanti.

Devesi poi pensare al fatto che i dieci casi sono stati ricavati da soggetti di diversa età e ciò può costituire un'altra causa di variabilità dei diametri medii.

Come ultima ma più importante causa dobbiamo considerare la stessa variabilità biologica del diametro medio analoga a quella di altri caratteri biologici diversi nella loro misura da individuo a individuo. Per valutare l'effetto delle cause sperimentali d'errore, nei casi 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, si sono misurati gli elementi su due vetrini, 25 in uno e 25 nell'altro, e per poter fornire risultati comparabili per tecnica con quelli degli altri cinque casi trattati come detto sopra in rapporto alla distribuzione non casuale delle cellule sullo striscio, si sono misurati gli elementi su strisce trasversali alternate anzichè contigue come sopra.

I valori ricavati si riassumono nella seguente tabella:

Caso	I° vetrino	II° vetrino
6°	14,85	14,72
7°	14,79	14,79
8°	15,30	15,20
9°	15,25	15,30
10°	15,60	15,51

Si tratta allora di stabilire se le differenze tra le medie corrispondenti a ciascun vetrino siano da considerarsi significative o meno. Nel primo caso si concluderà per un effetto tangibile di dette cause sperimentali, nel secondo caso invece, si dovrà ritenere la loro influenza nulla o trascurabile.

La significatività delle differenze in questione è stata valutata con il test *t* di FISHER (o di STUDENT):

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sigma_2} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

essendo  $x_1$ , e  $x_2$  nel nostro caso le rispettive medie corrispondenti alle cellule misurate nel primo o nel secondo vetrino e  $\sigma_2$  lo scarto quadratico medio del campione somma dei due.

Da apposite tabelle si ricava la probabilità  $P'$  che traendo a caso un valore di  $t$  esso sia minore di quello calcolato, onde la probabilità  $P$  che dall'universo si estragga un campione con valore uguale o maggiore di  $t$  sperimentale (in valore assoluto) equivarrà a  $2(1 - P')$ . L'ingresso alle tavole si fa con i seguenti gradi di libertà  $\nu = n_1 + n_2 - 2$  essendo  $n_1$  e  $n_2$  i numeri di osservazioni rispettivamente corrispondenti alle medie  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$ . Per  $\nu > 30$  come nel caso nostro, valgono con buona approssimazione le tavole dell'integrale della probabilità. Solo quando la probabilità  $P$  risulti piccola (convenzionalmente inferiore al 5% e, a maggior ragione, all'1%) pensiamo che la differenza  $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$  sia sistematica.

Applicando quanto detto al caso nostro troviamo i seguenti valori delle medie, del test  $t$  e della rispettiva probabilità  $P$  (in %)

Caso	$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	$t$	$P\%$
6°	14,85	14,72	0,64	52
7°	14,79	14,79	0,00	100
8°	15,30	15,20	0,46	65
9°	15,25	15,30	0,33	63
10°	15,60	14,51	0,28	61

Con tali valori di  $P$  non ci sentiamo di concludere per una influenza tangibile delle suddette cause sperimentali di errore.

In quanto all'influenza dell'età del soggetto sulla variabilità dei diametri medii si riportano i valori medii dei diametri con le corrispondenti età:

Anni	Diametri	Anni	Diametri
25	14,61	58	15,28
36	14,79	60	15,05
47	15,09	61	15,09
49	14,79	62	14,39
54	15,29	64	14,40

L'impressione che si riporta osservando la serie dei diametri è che essi tendono a crescere fino a un certo limite per poi diminuire. Un legame tra età del soggetto e diametro medio dei granulociti eosinofili sembrerebbe pertanto probabile sebbene dai dati riportati non ci sentiamo ancora in grado di precisarne la forma, nè confermarne la sistematicità. In conclusione, provata, con la tecnica seguita, l'influenza trascurabile o nulla delle cause sperimentali di errore sulla variabilità dei diametri da caso a caso restano in campo l'età del soggetto e tutto quell'insieme di cause che provocano la variabilità dei caratteri biologici e che, come è noto, si fanno consistere in fattori genotipici e fenotipici. A quale dei due ordini di cause (età e cause di variabilità biologica) spetti maggior importanza non possiamo ancora dire per i limiti delle nostre osservazioni.

Occupiamoci da ultimo della correlazione tra diametro e grado di segmentazione del nucleo, intendendo con questa locuzione il numero delle lobature nucleari corrispondenti a ciascun elemento, e permettendoci di considerare tale grandezza come se fosse una variabile continua.

Nella seguente tavola a doppia entrata sono riportate le frequenze delle varie combinazioni del numero delle lobature con le classi dei diametri <sup>(1)</sup>.

Alla tavola segue un grafico costituito da uno stereogramma <sup>(2)</sup> corrispondente al gruppo statistico formato dall'insieme dei dieci casi. Si riportano inoltre i valori medii dei diametri corrispondenti al grado di segmentazione nucleare.

<sup>(1)</sup> In ogni casella le frequenze corrispondenti ai singoli casi sono disposte secondo il seguente ordine:

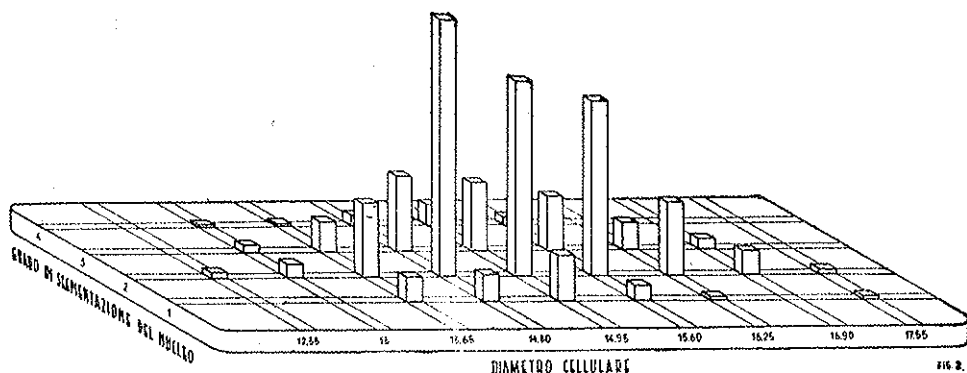
I	VI
II	VII
III	VIII
IV	IX
V	X

<sup>(2)</sup> Nello stereogramma l'altezza delle colonnine è proporzionale alle frequenze delle varie combinazioni delle classi dei nuclei e dei diametri.

Gradi di segmentazione del nucleo										Medie dei diametri
4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	14,72
	0 0	1 0	1 0	0 2	2 3	1 1	0 0	0 0	0 0	
	0 0	0 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	0 0	0 0	0 0	0 0	2 0	0 1	0 0	0 0	0 0	
3	0 0	2 0	2 1	2 1	1 5	1 4	0 0	1 0	0 0	14,91
	0 0	1 0	3 0	0 9	5 5	2 4	1 2	1 0	0 0	
	0 0	0 0	4 0	0 3	1 1	0 3	0 4	0 1	0 0	
	0 0	0 0	1 0	2 0	2 2	1 1	1 1	2 0	0 0	
	0 0	0 0	1 0	3 10	3 3	2 3	0 3	0 0	0 0	
2	0 0	1 0	4 0	11 14	15 9	3 6	1 3	1 0	0 0	14,90
	2 0	2 0	5 2	13 10	7 6	1 2	0 0	0 1	0 0	
	0 0	3 0	7 0	13 7	6 14	10 9	0 4	0 2	0 0	
	0 0	0 0	2 4	12 5	10 9	12 13	5 5	0 1	0 1	
	0 0	0 0	3 2	9 9	9 7	10 4	6 4	1 2	0 1	
1	0 0	0 0	1 6	3 2	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	14,59
	0 0	0 0	0 0	1 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	0 0	0 0	2 1	3 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	0 0	0 0	0 0	0 1	0 2	0 4	0 1	0 0	0 0	
	0 0	0 0	0 0	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	
Diametro cellulare	12,35	13,00	13,65	14,30	14,95	15,60	16,25	16,90	17,55	

L'impressione d'insieme che si ricava dalle tavole e dallo stereogramma è che non esista correlazione tra le due variabili in istudio o, almeno, che sia molto modesta.

Anche se non dimostrabile in ogni caso per le oscillazioni corrispondenti alle classi estreme del grado di segmentazione, dovute all'esiguo numero degli elementi che le compongono, osservando le medie dei



diametri poste sul bordo della tavola di correlazione si potrebbe notare come il diametro medio cresca dalla prima alla seconda e diminuisca dalla terza alla quarta classe del grado di segmentazione. Applicando però il test *t* di FISCHER alle differenze 14,59 - 14,90 e 14,91 - 14,72, dai risultati ottenuti non ci sentiamo di considerare sistematiche le differenze in esame.

Pensando allora così e volendo ammettere anche per la serie eosinofila che il grado di segmentazione del nucleo sia funzione crescente dell'età del granulocito come sostengono HEIDENHAIN, PONDER e altri per la serie neutrofila, si conclude che non si può dimostrare una correlazione tra il diametro della cellula eosinofila e la sua età.

### CONCLUSIONE

Si è svolta un'analisi citometrica sui granulociti eosinofili normali misurando il diametro di 500 elementi equiripartiti in 10 casi. I diametri dei granulociti eosinofili oscillano in condizioni fisiologiche da  $\mu$  12,35 a  $\mu$  17,55 (i dati corrispondono ai valori centrali delle classi



estreme). I valori delle diverse costanti biometriche sono riportati nelle tabelle (media aritmetica, moda, scarto quadratico medio, coefficiente di variabilità, indice di asimmetria e rispettivi errori medii). Le curve di distribuzione risultano generalmente asimmetriche con massimi spostati verso i valori più bassi.

Si è pure calcolata la funzione critica  $F$  di PEARSON che indicherebbe l'appartenenza delle curve studiate ai tipi 1°, 2°, 4° di PEARSON.

Vennero pure studiate le cause che intervengono a determinare le differenze da caso a caso. Non si è potuto inoltre rilevare l'esistenza di una correlazione tra diametro e grado di segmentazione nucleare, onde, supposta quest'ultima grandezza in funzione dell'età del granulocito, non vorrebbe dimostrata una correlazione tra quest'ultima variabile e la dimensione del leucocito eosinofilo.

## BIBLIOGRAFIA

- BAILEY F. R., *Textbook of Histology*, ed. 7, New York, 1925, Wm. Wood and Co.
- BRAMBILLA F., *La rappresentazione matematica delle serie di frequenza*, ed. Biazzi, Milano, 1933.
- BUNTING C. H., *The granular leucocytes* in «Special Cytology», ed. E. V. Cowdry, New York, 1928, Paul B. Hoeber Inc.
- FISHER C. A., *Statistical Methods for Research Workers*, London 1934.
- GYLLENWARD C., *Some sources of error at count of white corpuscles in blood stained smears*, «Acta paediatr.», 1929, 8, Sup.
- HALLIBURTON W. D., *Handbook of Physiology*, Philadelphia 1914, P. Blakiston S. Son.
- LORDAN H. E., *A Textbook of Histology*, ed. 5, New York, 1930, D. Appleton E. Co.
- MAXIMOW Q. A., *Textbook of Histology*, Philadelphia, 1930, W. B. Saunders Co.
- PONDER E., *Studies on the Armeth count*, «Quart. Journ. Exper. Phys.», 1927.
- ROVERSI A. S., *Analisi citometrica dei globuli bianchi periferici*, «Min. Med.», 1, 41, 1933.
- SNEDECOR G. W., *Calculation and interpretation of analysis of variance and covariance*. «Collegiate Press», Ames Iowa, 1934.
- Dall'Istituto di Clinica Medica dell'Università di Pavia (Direttore Prof. INTROZZI).