

CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Laboratoriumdiagnostiek van cellulaire immuundeficiëntie

Author: dr. Silvie Nickmans
Supervisor: prof. dr. X. Bossuyt
Date: 20/03/2014

CLINICAL BOTTOM LINE

Voor de diagnostische laboratoriumevaluatie van een patiënt met een vermoeden van primaire en/of secundaire cellulaire immuundeficiëntie bieden we in ons laboratorium verschillende testen aan. Niet onfrequent wordt de lymfocytenproliferatietest of –transformatietest (LTT) aangevraagd om de functionaliteit van de lymfocyten te evalueren. Meting van deze lymfocytenrespons op mitogenen en antigenen is dan ook een zinvolle parameter voor de evaluatie van de T-lymfocytenfunctie. Tot op heden werd deze test uitgevoerd gebruikmakende van radio-isotopen, een methode die echter veel nadelen met zich meebrengt. De interpretatie van deze resultaten is eerder arbitrair en niet clear-cut. Een lage uptake van [3H]-thymidine in de lymfocytenwells kan namelijk te wijten zijn aan meerdere factoren: een lage lymfocytencount, een functioneel lymfocytendefect of een ondermaatse batch [3H]-thymidine. Heden zijn er flowcytometrische methoden beschikbaar die een accuratere bepaling van de lymfocytenfunctie toelaten. Wij zochten, vonden en evalueerden naar aanleiding van de groeiende patiëntenpopulatie en de nood aan een nieuwe methode een accurater alternatief, i.e. een flowcytometrische methode die daarenboven dankzij het gebruik van ModFit software in staat is om mathematisch het aantal consecutieve dochtergeneraties te berekenen en tevens te kwantificeren, alsook de fractie lymfocyten die mitose ondergingen, zodanig dat de interpretatie ervan voortaan kwantitatief en eenzijdig interpreteerbaar kan gebeuren.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Primaire immuundeficiëntie (PI) is een aangeboren defect in het immuunsysteem en betekent voor de patiënt een verhoogde vatbaarheid voor chronische of ernstige infecties (oor- of longontstekingen, huidinfecties, sinusitis, darminfecties, meningitis etc.) die vaak slecht of helemaal niet reageren op de standaard behandelingen. Het regelmatig voorkomen van de infecties en het niet adequaat reageren op een klassieke antibioticabehandeling zijn enkele typische kenmerken van PI (cfr. Tabel 1). Ondertussen zijn er reeds meer dan 200 verschillende vormen van PI bekend, alle sterk variërend in ernst en klinische presentatie. De moleculaire basis van het merendeel van deze vormen is reeds gekend, de overige zijn onderwerp van immunologische research.

Meestal treden de eerste symptomen op tijdens de kinderleeftijd, echter soms ook pas tijdens de adolescentie of op volwassen leeftijd. De diagnose van een aangeboren primaire immuunstoornis wordt vaak miskend op volwassen leeftijd, slechts ongeveer de helft van de gekende PID patiënten wordt gediagnosticeerd voor het 30^e levensjaar (Figuur 1)

De awareness rond het bestaan van deze immuundeficiënties is de laatste jaren fors gestegen: in 2000 waren er bij het ESID 64 geregistreerde Belgische patiënten gekend met PID, in 2013 zijn er volgens data van de ESID reeds 18.720 patiënten geregistreerd in heel Europa. In ons universitair centrum worden momenteel een driehonderdtal patiëntjes gevolgd met een primaire immuundeficiëntie. UZ Leuven draagt sinds enkele jaren het predicaat Jeffrey Modell Foundation Diagnostic and Research Center als enig Belgisch ziekenhuis. Dit is een internationale organisatie die ijvert voor meer bekendheid, tijdige diagnostiek en adequate therapie van PID patiënten.

De stijging van deze bewustwording rond PI merken we ook aan het gestegen aantal aanvragen voor de lymfocytenproliferatietest: het aantal patiënten waarbij de LTT wordt aangevraagd voor evaluatie van lymfocyttaire functie varieert momenteel tussen 5 en 15 aanvragen per week. Dit groeiend aantal en mede de gestegen awareness maakt dat we een betere en betrouwbare methode nodig hebben voor het evalueren van de biologische lymfocytenrespons.

Voor de evaluatie van de lymfocytenfunctie bij een patiënt met een vermoeden van PI wordt de lymfocytenproliferatietest uitgevoerd, waarmee de biologische functie van de lymfocyten geëvalueerd wordt in vitro. De huidige gebruikte methode maakt gebruik van de inbouw van radio-actief gelabeld 3H-thymidine. Vervolgens wordt de ratio berekend van de hoeveelheid geïncorporeerde radio-activiteit in het gestimuleerde cultuurmedium (met het antigeen of mitogeen) over de ingebouwde radio-actieve labeling in cultuurmedium zonder stimulatie. Deze ratio wordt gerapporteerd als zijnde de **stimulatie-index S.I.** en geeft een maat voor de proliferatie van de lymfocyten. (<5 = negatief; 5-10= zwak positief; >10= positief i.e. 'normaal')

De huidige methode heeft te kampen met enkele belangrijke nadelen. Enerzijds is er de noodzaak tot het gebruik van radio-isotopen voor de analyse en de gezondheidsrisico's en afvalproblematiek die dit met zich meebrengt, anderzijds het feit dat er geen discriminatie mogelijk is van de specifieke subpopulaties binnen de lymfocyten.

De flowcytometrische CFSE assay is hedentendage een efficiënte en populaire methode om lymfocytenproliferatie te monitoren. (1-2), een omschakeling dringt zich dan ook op. Indien deze CFSE techniek correct uitgevoerd wordt, is het mogelijk om het aantal cellen dat in mitose ging te kwantificeren, alsook het aantal mitosen- en dus generaties- die gegenereerd werden.

Prevalentie : Europese Data

De prevalentie is moeilijk vast te stellen, men schat deze rond 1:1000. Vermoed wordt dat tot 80% van alle patiënten nooit gediagnosticeerd wordt, daar het spectrum van PID varianten varieert van milde tot zeer uitgesproken klinische presentatie. Uit Figuur 2 blijkt dat meer dan de helft van alle geregistreerde PID patiënten lijdt aan antistofdeficiënties, de tweede grootste groep betreft goed beschreven syndromale PID vormen (waaronder enkele vormen van cellulaire immuundeficiëntie), T-cel deficiënties maken 7.6% uit van het totaal.

RECENTE NIEUWE CLASSIFICATIE PID

Het IUIS (International Union of Immunological Societies) expertencomité stelde in 2011 een PID classificatie voor als referentiekader bij de diagnostische aanpak van primaire immuundeficiënties. Deze recente classificatie bestaat uit 8 majeure groepen op basis van het ziektemechanisme (1). De groepen overlappen sporadisch, maar bieden een goed referentiekader als hulp bij de diagnostische aanpak van primaire immuundeficiëntie.

CD40 ligand deficiëntie, hoort zowel tot klasse 1 als tot klasse 3. Ze stelden tevens voor elke subcategorie een diagnostische beslissingsboom op, cfr. Attachments Figuur 3-10.

De recentste classificatie opgesteld door IUIS (2011) is als volgt:

1. Combined T-cell en B-cell immunodeficiencies (vb. ADA deficiëntie)
2. Well-defined syndromes with immunodeficiency
3. Predominantly antibody deficiencies
4. Diseases of immune dysregulation
5. Congenital defects of phagocyte number, function or both
6. Defects in innate immunity
7. Auto-inflammatory disorders
8. Complement deficiencies

QUESTION(s)

1. Welke testen zijn zinvol voor de diagnostiek van cellulaire immuundeficiëntie?
2. Wat zijn de beschikbare nieuwe methoden voor LTT? Hoe optimaliseren we deze?
3. Welke parameters berekenen we ? Hoe worden de resultaten geïnterpreteerd?

SEARCH TERMS

MeSH Database (PubMed): MeSH term: “ CFSE, lymphocyte proliferation, flowcytometry, lymphocyte transformation”

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

Guidelines and Recommendations

1. Boushifa AA. A phenotypic approach for IUIS PID classification and diagnosis: guidelines for clinicians at the bedside. *J Clin Immunol*. 2013 Aug;33(6):1078-87.
2. IDF Diagnostic & Clinical Care Guidelines for Primary Immunodeficiency Diseases 2nd Edition (2009) p3-15.
3. Al-Herz W et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2011 Nov 8;2:54.
4. Bonilla FA et al (AAACI, Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology) Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005 May;94(5 Suppl 1):S1-63.
5. Lyons AB, Blake SJ, Doherty KV.
Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Curr Protoc Cytom*. 2013;Chapter 9:Unit9.11
6. Bruce Lyons Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods* 243 (2000) 147–154.

Original Articles

7. Lyons, A. B. & Parish, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171, 131-137 (1994).
8. Parish, C. R., Glidden, M. H., Quah, B. J., & Warren, H. S. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan . Chapter 4, Unit 4 9* (2009).
9. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, Battye FL, Markham JF, Hodgkin PD. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2057-67.
10. Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, et al: Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T-cell subsets. *Blood* 2009;113:5134-5143
11. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2049-56.
12. Quah BJ, Parish CR. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J Immunol Methods*. 2012 May 31;379(1-2):1-14.

13. Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A*. 2011 Feb;79(2):95-101.
14. A.D. Henn. Functionally Distinct Subpopulations of CpG-Activated Memory B Cells *Sci Rep*. 2012; 2: 345.
15. Luzyanina T, Cupovic J, Ludewig B, Bocharov G. *J Math Biol*. 2013 Dec 13. [Epub ahead of print] Mathematical models for CFSE labelled lymphocyte dynamics: asymmetry and time-lag in division.
16. Luzyanina T, et al. Numerical modelling of label-structured cell population growth using CFSE distribution data. *Theor Biol Med Model*. 2007 Jul 24;4:26.
17. Hawkins ED, Hommel M, Turner ML et al. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat Protoc*. 2007;2:2057–2067
16. Zolnierowicz J, Ambrozek-Latecka M, Kawiak J, Wasilewska D, Hoser G. Monitoring cell proliferation in vitro with different cellular fluorescent dyes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;51(3):193-200.
17. Bantly AD et al. CellVue Claret, a new far-red dye, facilitates polychromatic assessment of immune cell proliferation. *Immunol Invest*. 2007;36(5-6):581-605.
18. Nakanjako D et al. Impaired T-cell proliferation among HAART-treated adults with suboptimal CD4 recovery in an African cohort. *BMC Immunol*. 2013 Jun 20;14:26.
19. Weiming Ouyang,1 et al. Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control Treg cell function. *Nature* 2012 Nov 22;491, 554–559.
20. DA Fulcher , SWJ Wong Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunology and Cell Biology* (1999) 77, 559–564.
21. Last'ovicka J, Budinský V, Spísek R, Bartůnková J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cell Immunol*. 2009;256(1-2):79-85.
22. R. Angulo and D.A. Fulcher. Cell Measurement of Candida-Specific Blastogenesis: Comparison of Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Labelling of T Cells,Thymidine Incorporation,and CD69 Expression *Immunol*. 2009;256(1-2):79-85.

Reference Works, Handbooks and Databases

23. Mayo Medical Laboratories, Online Interpretive Handbook, Search term:LymphocyteProliferation to Mitogens, Blood.
<http://www.mayomedicallaboratories.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/60591>.

Posters, “grey literature”, presentations

24. Carmichael KF, Abayomi A: Analysis of diurnal variation of lymphocyte subsets in healthy subjects and its implication in HIV monitoring and treatment. 15th Intl Conference on AIDS, Bangkok, Thailand, 2004, Abstract B11052.
25. Jeffrey Modell Foundatio website: www.info4pi.org
26. European Society for immunodeficiencies website : www.esid.org
27. The nuances of using CFSE to monitor lymphocyte proliferation. Posted comment <http://technical.sanguinebio.com/the-nuances-of-using-cfse-to-monitor-lymphocyte-proliferation/>

1. Laboratoriumdiagnostiek bij vermoeden van cellulaire immuundeficiënties

De belangrijkste pijlers voor de laboratoriumdiagnostiek worden hieronder opgelijst (1,2).

1.1. Hematologische celtelling

Uit een standaard hematologische celtelling ('complet') kan reeds indicatieve informatie afgeleid worden .

- **Lymfocyten:** Een leukocyten telling met differentiatie is hier belangrijk ter detectie van een absolute lymfopenie, rekeninghoudend met leeftijdsspecifieke referentiewaarden. Ook andere informatie uit de celtelling kan richtinggevend zijn:
- **Neutrofielen:** Neutropenie (congenitale neutropenie, Barth syndroom) is steeds een alarmteken, maar ook neutrofilie kan wijzen op een immuunstoornis zoals bij leukocytenadhesiedeficiëntie (LAD). Bij deze aandoening zal het aantal neutrofielen verhoogd zijn. LAD betekent au fond een afwijking van de integrinen. Deze integrinen spelen een belangrijke rol bij de extravasatie uit de bloedbaan naar de plaats van inflammatie , waardoor de chemotaxis bij deze patiënten verstoord is en de intravasale neutrofielen niet uit de bloedbaan kunnen treden en de patient bijgevolg neutrofilie vertoont.
- **Bloedplaatjes:** Trombocyten telling en MPV kan nuttig zijn om Wiskott-Aldrich syndroom op te sporen . Deze aandoening gaat frequent gepaard met trombocytopenie en microtrombocytose.

1.2. Flowcytometrie

Flowcytometrische immunofenotypering speelt een cruciale rol als screeningstest in de diagnostiek van PID. Dit is een goede screeningstest voor cellulaire immuundeficiëntie en laat de kwantificatie toe van de verschillende subpopulaties NK-cellen, B- en T-lymfocyten (Figuur 11). Aan de hand hiervan kan een absolute T-cel lymfopenie (vb. SCID) reeds gedetecteerd worden.

1.3. Functionele lymfocytentest (lymfocytentransformatietest: 'LTT')

In zijn Diagnostic & Clinical Care Guidelines (2nd edition) beklemtoont de Amerikaanse Immune Deficiency Foundation (IDF) het als volgt:

"T cell functional testing is of greatest importance" (2).

Voor een functionele investigatie van de lymfocyten wordt in ons laboratorium een lymfocytentransformatietest (LTT, syn. lymfocytenproliferatietest) uitgevoerd, met diverse mitogenen en/of specifieke antigenen die als stimulerende liganden worden aangewend. Deze zijn in staat om in een normale lymfocytenpopulatie blastogenese en proliferatie in vitro te induceren. Sterke mitogenen zijn vb. de plant-afgeleide phytohemagglutinine (PHA), concanavaline A (Con A), en in iets minder sterke mate ook pokeweed (PWM).

Cellulaire proliferatie is het gevolg van een complexe signaalpathway die ontstaat door binding van een antigeen of mitogeen ligand aan oppervlaktereceptoren op de lymfocyten. Vervolgens zal door genactivatie en cytokinesecretie DNA synthese en celmitose geïnduceerd worden. Meting van de mitogeen of antigeen-geïnduceerde lymfocytenproliferatie in vitro geeft vervolgens een **functioneel beeld van de celgemedieerde immuniteit**. De proliferatieve respons op PHA en Con A is voornamelijk T-lymfocytair, de respons op PWM is zowel T- als B-lymfocytair doch T-cel afhankelijk. Een gedaalde proliferatierespons op mitogenen komt voor bij een spectrum van primaire en secundaire immuundeficiënties, waarbij de normale uitrijping van T en/ of B-lymfocyten afwijkend zijn. Specifieke antigeenherkenning induceert T-lymfocyten, deze T cellen activeren en prolifereren als respons op een antigene stimulus. Voor antigeen-specifieke T-cel respons te evalueren worden frequent *Candida albicans* en tetanus toxoïed als antigenen gebruikt.

1.4. Kwantitatieve immunoglobuline-bepaling

Serum immunoglobuline assays voor IgA, IgM en IgG zijn zinvol bv. bij vermoeden van common variable immunodeficiency (CVID) of bij hyperIgM syndroom.

1.5. Moleculaire diagnostiek

Van verschillende varianten van PID werd reeds de genetische moleculaire basis ontrafeld. Genetische onderzoek is echter complex daar er wellicht meer dan 200 moleculaire oorzaken zijn voor PID. Sinds begin 2014 is er op het CME een array beschikbaar waarmee 170 gekende genotypes van PID kunnen opgespoord worden.

1.6. Specifieke testen

FISH test voor 22q11 deletie (Di George syndroom)

Bepaling van het adenosine deaminase (ADA deficiëntie)

T-cel repertoire in het kader van opsporen immuundeficiënties

2. Klinische indicaties voor aanvraag LTT

De LTT stimulatietest met mitogenen/antigenen is zinvol voor de evaluatie van de lymfocytenfunctie in volgende gevallen:

1. Patiënten met vermoeden van **primaire immuundeficiënties** die cellulair (DiGeorge syndroom, T-negative SCID) of gecombineerd B- en T-cel (SCID, Wiskott Aldrich syndroom, Louis-Bar syndroom, CVID) kunnen zijn waarbij de T-cel functie mogelijk is gestoord is cfr. IUIS classificatie (Figuur 3-10).
2. De evaluatie van **secundaire immuundeficiëntie**, hetzij iatrogeen (corticoïden, chemotherapie) of ziekte-gerelateerd (SLE).
3. Bepaling van de **T-cel functie** na stamceltransplantatie of immuunsuppressieve therapie na orgaantransplantatie.

3. Nieuwe methoden voor functionele lymfocytestest: flowcytometrische methode met CFSE kleuring

3.1 CFSE

Wanneer lymfocyten gelabeld worden met het membraanpermeabele carboxyfluoresceïne diacetaat succinimidyl ester (CFDA-SE, voorloper van CFSE), zullen de acetaatgroepen van deze stof verwijderd worden door intracellulaire esterases. Het bekomen CFSE bindt covalent aan intracellulaire proteïnen met intense fluorescente kleuring tot gevolg door het carboxyfluoresceïne. Na elke consecutieve mitose zal de fluorescentie in de dochtercellen halveren. Zodoende kan gestimuleerde proliferatie van lymfocyten eenvoudig bepaald worden met behulp van flowcytometrie: elke celdeling is traceerbaar door de consecutieve halverende fluorescentie. Op die manier kunnen tot 8 celdivisies gevisualiseerd worden vooraleer het autofluorescentielevel van niet-gestainde lymfocyten bereikt wordt (9) (Fig. 12-13)

CFSE kleuring is een zeer goede optie om celdivisies van lymfocytenpopulaties te traceren dankzij zijn sterke fluorescente intensiteit en zijn lage cytotoxiciteit(1). Daar het een fluoresceïne-gebaseerde kleuring is, is het ook compatibel met een brede waaier van andere fluorochromen en dus geschikt voor gebruik in multicolorflowcytometrie. CFSE is een fluorescente celmembraanpermeabele kleurstof met gelijkaardige excitatie en emissie-eigenschappen dan fluoresceïne isothiocyanaat (FITC) en kan bijgevolg in dit kanaal gemeten worden.

CFSE kleuring in combinatie met immunofenotypering kan de evaluatie van proliferatiekinetiek binnen de T-celpopulaties apart mogelijk maken (CD3, CD4, CD8), daar waar met de oude methode geen onderscheid kon gemaakt worden.

3.2 Mogelijke alternatieven: CellTrace Violet, Cell Proliferation Dye eFluor 670, CellVue Claret

Sinds de eerste publicatie rond CFSE in 1994 (7), is geen enkele kleuring er totnogtoe in geslaagd om de minimale celtoxiciteit en hoge intensiteitsfluorescentie van CFSE te evenaren. Recent werden tevens andere fluorochromen gecommercialiseerd: Cell Trace Violet (CTV), Cell Proliferation Dye eFluor 670 (CPD), en CellVue Claret (12). Quah et al publiceerden in 2012 hun evaluatie van CTV en CPD nieuwe fluorochromen voor de lymfocytenproliferatietest.

Uit hun evaluatie concludeerden zij dat CFSE performant was om duidelijke proliferatiepieken te differentiëren, zowel voor CD4+ als CD8+ T-cel populaties, met een maximum van 8 pieken detecteerbaar voordat het level van autofluorescentie bereikt werd. Discriminatie van de B-cel populatie was echter zwak in vergelijking met de T-cel populaties. (Fig. 14)

Ook CTV was goed in staat om pieken in de CD4 en CD8 populaties te differentiëren, maar toonde zich zwak in de detectie van de celdivisies. Opvallend nadeel van CTV was dat deze minder performant was in het visualiseren van late celdivisies, deze kon 6 celdivisies traceren, terwijl CFSE er 8 vond.

Van alle geteste stainings was CPD veruit de minst performante wat betreft detectie van celdivisies, zowel qua aantal pieken als qua piekresolutie.

Een recente studie uit 2013 investigeerde ook CTV en CellVue Claret in parallel met CFSE (16). Hierin werden de lymfocyten 5 dagen met Con A gestimuleerd, en de data werden geanalyseerd met ModFitLT software. Zolnierowicz et al concludeerden hieruit dat de resultaten met de 3 kleuringen (CFSE, CellTraceViolet, CellVue Claret) gelijkaardig waren ze met ModFit geanalyseerd werden naar proliferatie-index en precursorfrequentie toe, en dat de resultaten bekomen met verschillende kleuringen dan ook gelijkaardig waren (Figuur 15).

3.3 Optimalisatie van de CFSE assay

We baseerden ons hoofdzakelijk op een bestaand protocol uit Current Protocols in Immunology, genaamd "Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation", van Parish et al uit 2009 (8).

Vier belangrijke parameters spelen een rol om de celtoxiciteit te minimaliseren (7, 27), deze zijn cruciaal in de analyse:

1 Celconcentratie en CFSE concentratie.

Deze twee parameters moeten in elkaars context beschouwd worden. Cellen in hogere concentraties kunnen met hogere concentraties CFSE gelabeld worden met een minimaal effect van CFSE toxiciteit op celdeling. Bv. cellen met een concentratie van 1×10^6 /ml zullen toxiciteit ervaren wanneer zij met 5 μ M CFSE behandeld worden, maar 1 μ M CFSE daarentegen werkt hier als een prima concentratie. (27)

2 Labelingtijd

Langere incubatie zal toxiciteit doen stijgen: in de literatuur variëren de optimale incubatietijden tussen 5 en 10 minuten.

3 Aanwezig/afwezigheid van proteïnen in het medium

De afwezigheid van bufferproteïnes in het gebruikte medium kan CFSE- celtoxiciteit induceren.

In een eerste assessment trachtten we een optimalisatie uit te voeren van de assay met focus op deze variabelen. Als positieve controle werden de mitogenen PHA (2µg/ml) en ConA gebruikt. De negatieve controle bestond uit CFSE gelabelde niet-gestimuleerde cellen in kweekmedium. Ook niet-gelabelde gestimuleerde cellen werden meegenomen. Aan de hand van een flowcytometrische analyse kon na enkele dagen incubatie de fractie prolifererende cellen bepaald worden. Binnen de lymfocytengate werden ter evaluatie standaard data van 10.000 events gemeten.

3.3.1. Optimale CFSE labeling concentratie

Eerst werd de optimale CFSE labeling concentratie nagegaan. In de literatuur worden protocols beschreven met een variërende CFSE concentratie van 0.5 tot 5 µM, al waarschuwt men ook voor de toenemende toxiciteit bij te hoge CFSE concentraties (17). In ons laboratorium testten we zelf de optimale CFSE concentratie te uit voor analyse, deze wordt tevens mede beïnvloed door de lymfocytenconcentratie waarmee men start. Voor een eerste evaluatie werden geïsoleerde perifere bloedmonocyten geheel volgens het protocol behandeld en vervolgens gelabeld met 5 µM, 2 µM, 1µM of 0,5 µM CFSE en nadien gestimuleerd met de mitogenen Con A en PHA gedurende 5 dagen aan een densiteit van 2 miljoen cellen per well in een 96 well plaat.

Conclusies :

1. Hoe hoger de CFSE startconcentratie, hoe intenser uiteraard het fluorescent signaal: bij 5 µM CFSE ligt dit signaal tussen 10^4 en 10^5 , bij 0,5 µM tussen 10^3 en 10^4 .
2. De laagste achtergrondproliferatie werd waargenomen bij een CFSE labeling concentratie van 0,5 µM.

3.3.2 Cytose PBMC

Ook de cel aantallen blijken een cruciale rol te spelen. Een aanzienlijk aantal cellen zou onderhevig zijn aan celnecrose door CFSE toxiciteit (zelfs bij optimale CFSE concentratie) en activatie-geïnduceerde apoptose (17). We vergeleken 3 startconcentraties PBMC's: 500.000/ml, 1.000.000/ml en 2.000.000/ml.

Conclusie: Het startaantal van 2.000.000/ml lijkt de gevoeligheid sterk te verhogen in vergelijking met slechts 500.000 cellen/well. (Figuur 16).

3.3.3. Incubatieduur CFSE& mitogenen

0.5 μ M werd ingesteld als CFSE concentratie naar analogie van het protocol van Parish et al (8).

Ook werd de incubatieduur voor de mitogenen. Hiervoor worden PBMC gelabeld met 0,5 μ M CFSE en vervolgens gestimuleerd met Con A en PHA gedurende 3, 4, 5 en 6 dagen. Na 5 en 6 dagen wordt de fractie binnen de lymfocytengate aanzienlijk kleiner, ook de fluorescentie vertoont interferentie, mogelijks als gevolg van toxische effecten door het vrijzetten van CFSE door necrotische cellen: er verschijnen artefacten op de FITC/count plot die getuigen van CFSE release door necrotische cellen.

Conclusies : Voor de mitogenen wordt 4 dagen incubatietijd toegepast, en de de antigenen 6 dagen. (Identieke incubatietijden als de vorige methode)

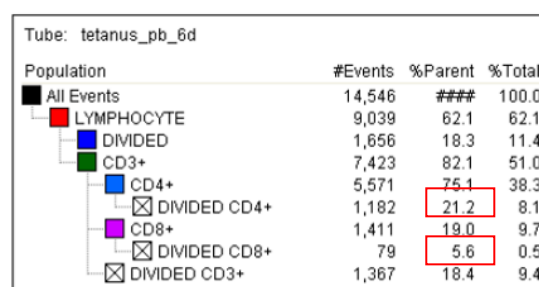
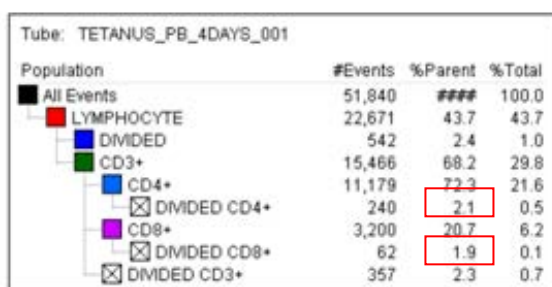
3.4 . Fenotypering lymfocyten na incubatie

Om het fenotype van prolifererende T-cellen te bepalen na stimulatie met de mitogenen & antigenen werden PBMC donoren gelabeld met CFSE (0,5 μ M) en gestimuleerd met PHA en Con A. Na deze stimulatie werd de proliferatie gemeten en het fenotype bepaald van de prolifererende cellen via een FACS kleuring waarbij men gebruik maakte van de monoklonale antilichamen CD45-PB, CD3 PE-Cy7, CD4-APC en CD8-APC-H7.

Resultaten UZ Leuven

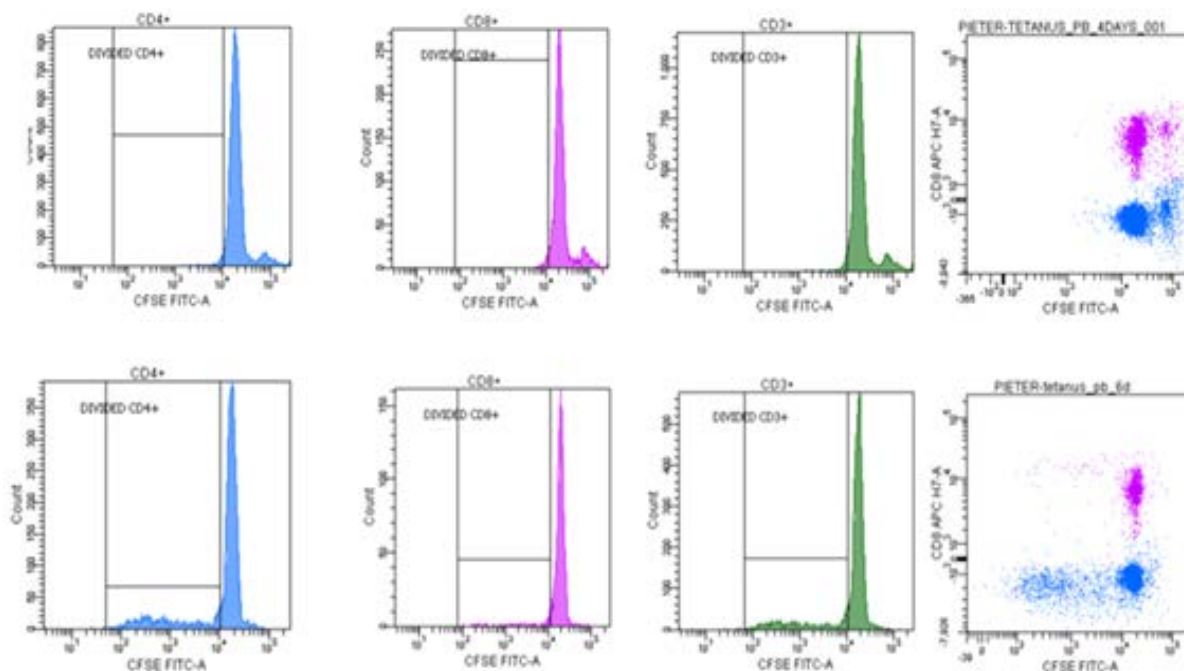
1. CFSE methode Candida en Tetanus toxoid antigeenstimulatie

Antigeenstimulaties zijn intrinsiek zwakkere lymfocytenstimulaties dan de mitogeenstimulaties. In de literatuur maakt men doorgaans gebruik van 6 dagen incubatieduur voor antigeenstimulaties. (16,18) Na 4 dagen incubatie in onze evaluatie blijkt het % gedeelde CD4+ en CD8+ lymfocyten inderdaad nog zeer laag, 2.1% en 1.9% resp. Twee dagen extra incubatieduur daarentegen (6 dagen) geven een duidelijk sterkere proliferatierespons, met 21.2% (proliferatie x 10) en 5.6% (proliferatie x3) gedeelde CD4+ en CD8+ lymfocyten. Ook het percentage gedeelde CD3+ steeg sterk van 2.3 naar 18.4% (x8) De CD4+ lymfocyten hebben uiteraard een hogere reactiviteit dan de CD8+ lymfocyten op antigeenstimulatie. De thymidine-methode vereiste eveneens 6 dagen incubatieduur voor antigeenstimulaties, dit blijft dan eveneens onveranderd voor de CFSE methode.



Figuur 17. CFSE LTT na 4 dagen

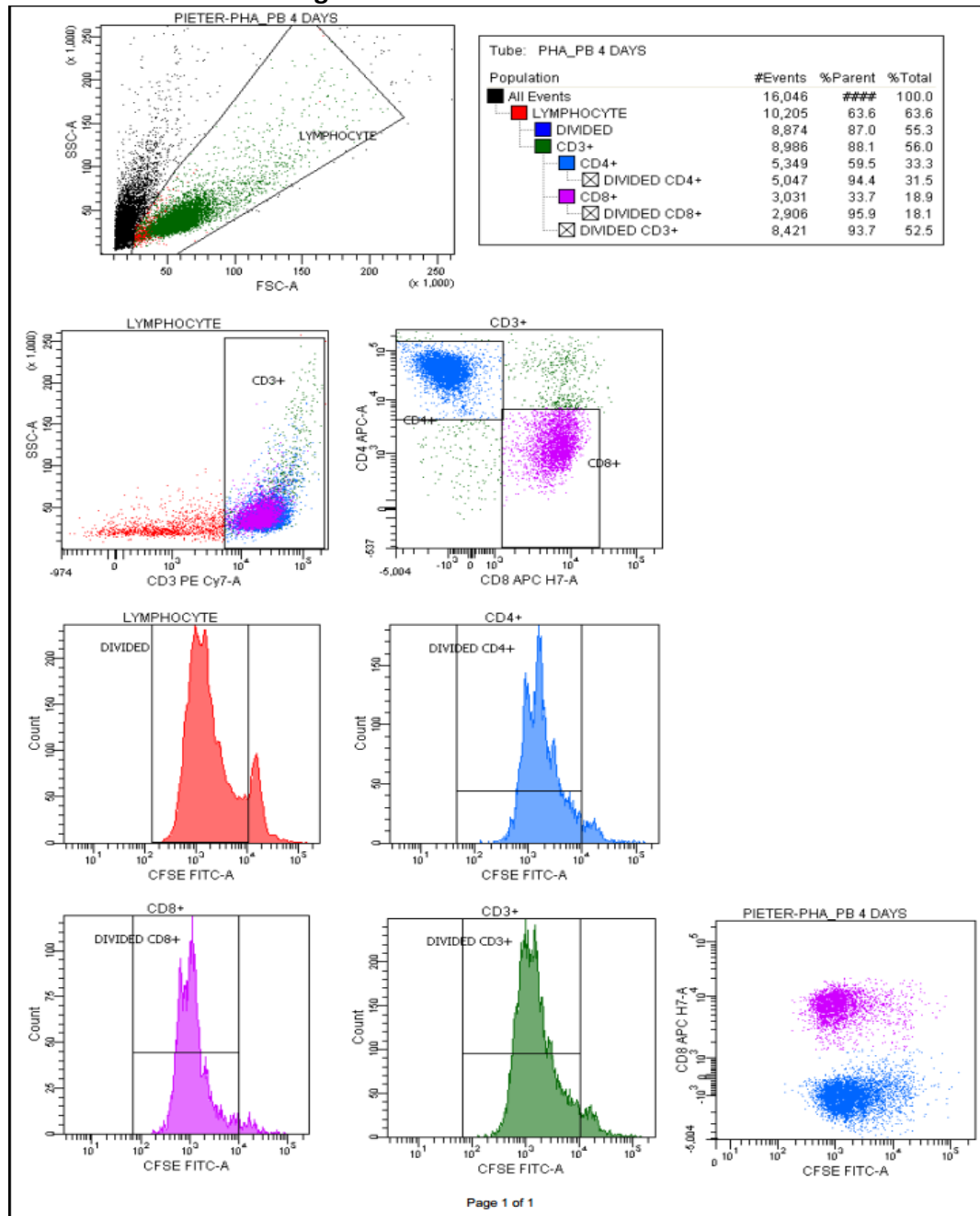
Figuur 18. CFSE LTT na 6 dagen



Figuur 19 . Proliferatie Tetanus op flowplots na 4 (bovenste rij)resp. 6 dagen incubatieduur (onderste rij).

Figuur 19 toont duidelijk de verschillen in proliferatie op dag 4 en dag 6 voor de tetanus-stimulatietest. Na 4 dagen is er vanuit de parentgeneratie nog geen of nauwelijks reactiviteit, na 6 dagen is er duidelijk laaggradige reactiviteit waar te nemen.

2. CFSE methode na mitogene PHA stimulatie



Figuur 20 : Reactiviteit van T-cellen van een gezonde donor na 4 dagen stimulatie met PHA. Bepaling van het fenotype via flowcytometrie laat binnen de CD3+ gate de reactiviteit van de aparte subpopulaties CD4+ en CD8+ populaties zien.

3.4 Methodevergelijking CFSE met thymidinemethode

3.4.1 Literatuurdata

Fulcher & Wong (20) vergeleken in hun centrum de thymidinemethode met de CFSE methode, ze includeerden 11 gezonde donoren en 2 gekende patiënten met afwijkende waarden (1 patiënt met di George syndroom, 1 patiënt met SLE). De 2 patiënten met T celdysfunctie vertoonden gedaalde divisie-indices, correlerend met lage uptake van radionucleotiden (Figuur 21).

562

DA Fulcher and S Wong

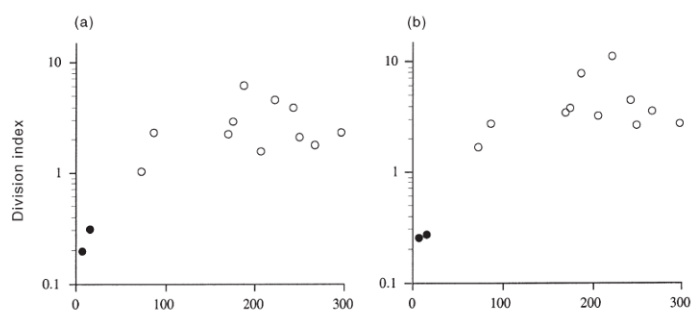


Figure 4 Correlation between 1 µg/mL (a, c, e) and 5 µg/mL (b, d, f) PHA responses as determined by [³H]-thymidine uptake (maximal c.p.m. obtained at any PHA dose) and the carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-derived values division index, percentage blast transformation and increase in CD69-positive cells. The two patients with T cell immunodeficiency are depicted by filled circles.

Figuur 21. Correlatie PHA stimulatie met thymidine en met CFSE. Zwarte dots zijn gekende PID patiënten.

In een andere publicatie (18) vergeleken zij resultaten na Candida-stimulatie in 3 subpopulaties (CRVVC*, exposed & unexposed) met beide methoden. Ook uit deze resultaten bleek dat beide methodes in essentie vergelijkbare resultaten opleveren (Figuur 22).

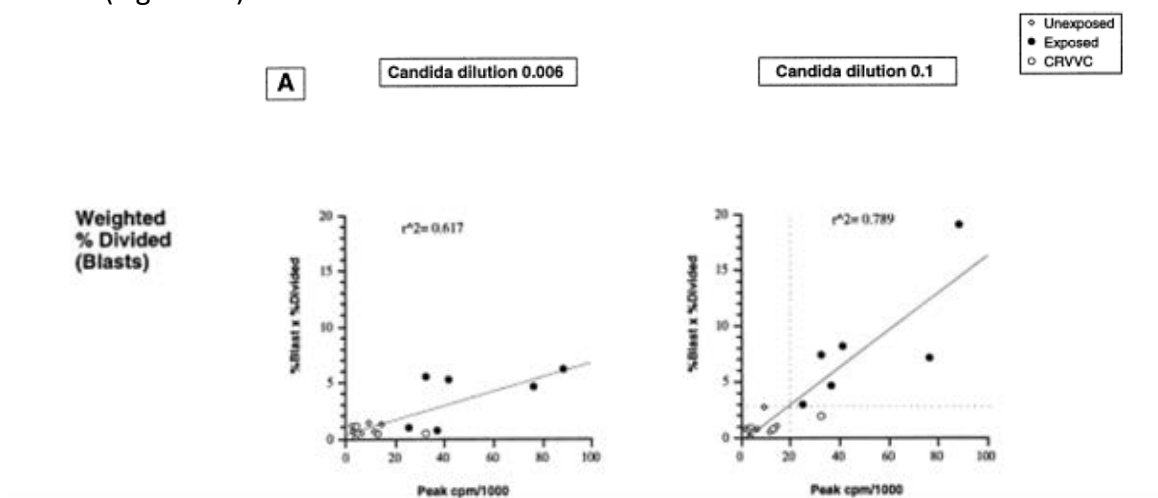
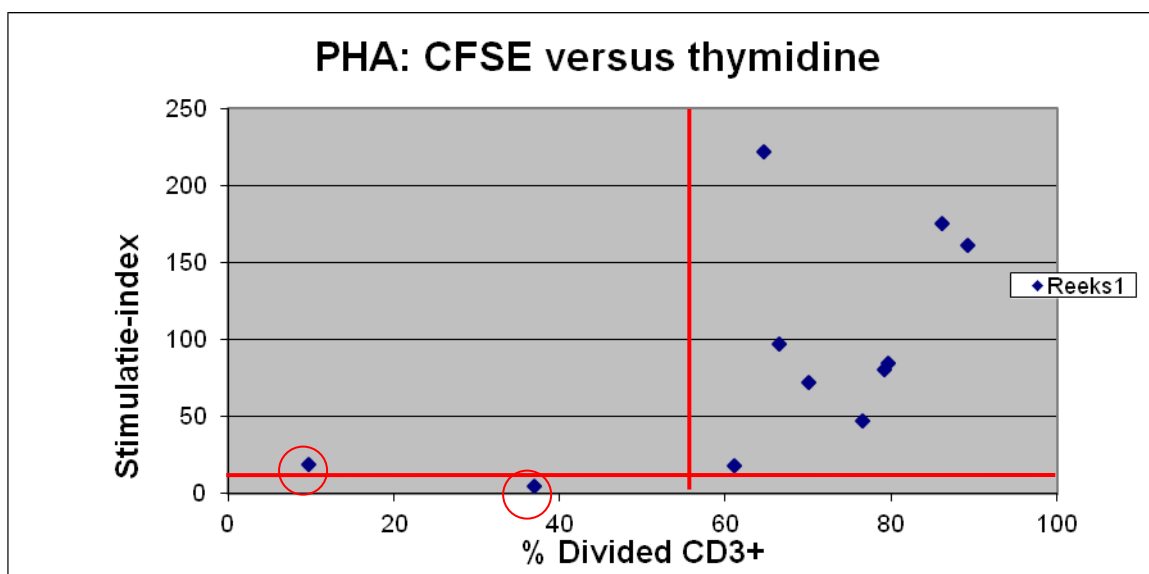


Fig. 22. CFSE methode vergeleken met thymidinemethode voor Candida-proliferatie.
(*CRVVC= chronic recurrent vulvovaginal candidiasis)

3.4.2 Eigen UZ Leuven data

In deze evaluatiefase werden verschillende routinestalen reeds in duplo geanalyseerd. De preliminaire resultaten (n=11) zijn goed en vergelijkbaar met deze uit de literatuur, we gebruiken voorlopig als hanteerbare cut-off voor %CD3+ de gepubliceerde referentiewaarden van de Mayo Clinic, daar zij dezelfde CFSE methode toepassen. Op termijn zullen in UZ Leuven eigen referentiewaarden worden opgesteld. Tussen deze routinestalen zaten ook 2 stalen afkomstig van gekende patiënten :1 patiëntje met ADA-deficiëntie, en 1 patiëntje met di George syndroom (Figuur 23).



Figuur 23. Preliminaire resultaten vergelijking CFSE methode en thymidine (n=11). De data van de 2 gekende patiënten met PI zijn omcirkeld.

4. Interpretatie LPT

Afwijkende resultaten zijn niet ziekte-specifiek, meer nog: de grootte van de afwijking is niet noodzakelijk proportioneel aan de graad van immuundeficiëntie. Zoals reeds eerder vermeld, kan een T-cellymfopenie de proliferatierespons drastisch reduceren. In het geval van antigeen-specifieke proliferatierespons kan de respons laag of afwezig zijn indien er een lang interval was sinds de primaire sensitisatie of vaccinatie (typisch tetanus toxoïed). Met de nieuwe CFSE analyse en identificatie van de lymfocytensubsets wordt de interpretatie van de functionele (proliferatie) lymfocytenrespons echter transparanter en beter interpreteerbaar.

Voor de interpretatie van de resultaten worden de frequentst gerapporteerde statistieken goed beschreven door Roederer (13) , deze zijn weergegeven in onderstaande Tabel 2 en de belangrijkste worden hieronder kort besproken.

Gedilueerde fractie (Dil)

Deze parameter wordt meest courant gerapporteerd als het **% gedeelde lymfocyten**. De gedilueerde fractie kan eenvoudig pragmatisch berekend worden door met de cursor de niet-gestimuleerde lymfocyten te identificeren. Met dezelfde gating wordt vervolgens de gestimuleerde lymfocytenpopulatie bekeken: de gedilueerde fractie ligt nu links van de cursor: dit is de **fractie lymfocyten in de finale celcultuur die minstens 1 mitose ondergingen**.

Modfit Software® 3.0

Dit softwareprogramma kan eenvoudig de precursor frequentie & proliferatie-index berekend worden.(zie ook Tabel).

Nadeel aan Modfit is echter dat enkel binnen de totale lymfocytenpopulatie kan gekeken worden, en niet binnen de verschillende subpopulaties.

Proliferatie-index (PI):

Deze index is de ratio van de finale celtelling over het aantal startlymfocyten.

Precursor frequentie (PF):

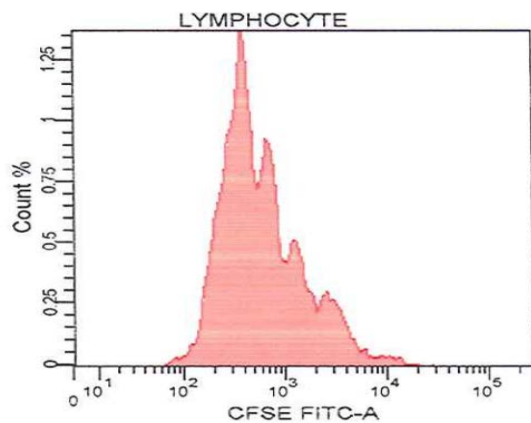
Het percentage lymfocyten uit het originele staal dat in mitose is gegaan.

STATISTIC ^a	TYPE ^b	FORMULA ^c	VALUE RANGE		INTERPRETATION
			MIN	MAX	
Fraction diluted	Ext	$Dil = \frac{\sum_{i=0}^i N_i}{\sum_{i=0}^i N_i}$	0	1 ^d	Fraction of cells in the final culture that divided at least once
Precursor frequency, %dividing cells ^{efg}	Int	$PF = \frac{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}$	0	1	Probability that a cell will divide at least once
Proliferation index ^{ef} ; expansion index ^g	Ext	$EI = \frac{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	128 ^h	Fold expansion during culture (ratio of final cell count to starting cell count)
Division index ^f ; replication index ^g	Ext	$RI = \frac{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	128 ^h	For responding cells, fold expansion over the culture time
Proliferation index ^g	Int	$PI = \frac{\sum_{i=0}^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	7 ^h	For responding cells, average number of divisions they have undergone
Division index ^g	Ext	$DI = \frac{\sum_{i=0}^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_{i=0}^i \frac{N_i}{2^i}}$	0	7 ^h	Average number of divisions for all cells in the culture
Proliferation variance ^g	Int	$SD^D = \sigma(PI)^i$	0	7 ^h	Standard deviation of the number of divisions (PI)

Tabel 2. Overzicht van frequent gebruikte parameters ter karakterisatie van proliferatie-assays.

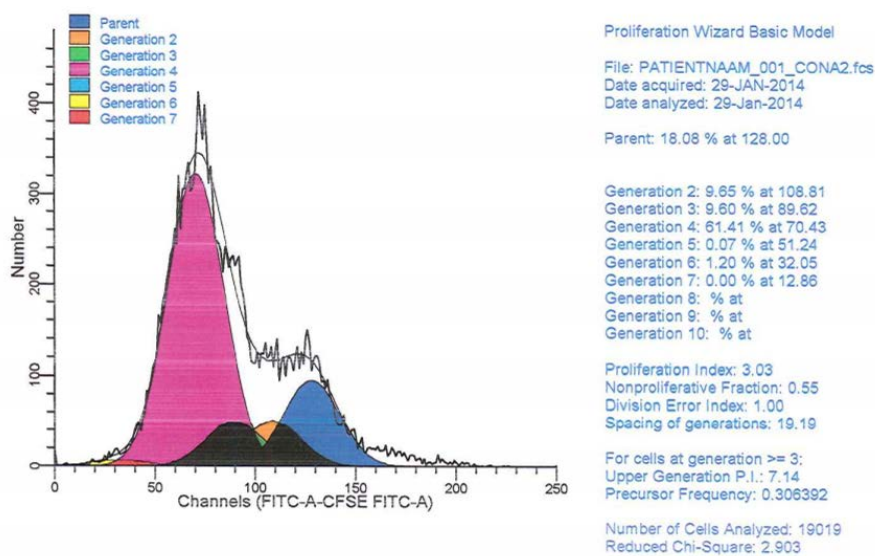
Het nadeel aan de huidige ModFit software is dat deze parameters enkel te berekenen zijn op de totale lymfocytenpopulatie (cfr. infra) en niet binnen de verschillende subpopulaties (CD4+/CD8+)T-lymfocyten. De ModFit software importeert en verwerkt de data vanuit FACSCanto flowcytometer en gebruikt hiervoor de primaire lymfocytenplot (Figuur 24).

BD FACSCanto™ data: lymfocytenplot



Figuur 24. Lymfocytenplot na stimulatie door ConA

ModFit®



Figuur 25. ModFit analyse van de lymfocytenplot met berekening van de parameters.

ModFit berekent verschillende parameters vanuit de lymfocytenplot zoals te zien in Figuur 24 en 25, waaronder de proliferatie-index (hier 3.03) en de precursorfrequentie (30.6%).

5. Referentiewaarden

De literatuur biedt ons weinig meerwaarde wat betreft referentie-intervallen. Enkel de Mayo Clinic heeft eigen gegenereerde data intervallen opgesteld voor 2 antigenen en 2 mitogenen (23):

LYMPHOCYTE PROLIFERATION TO ANTIGENS

Maximum proliferation of *Candida albicans* as % CD3: > or =3.0%

Maximum proliferation of tetanus toxoid as % CD3: > or =3.3%

LYMPHOCYTE PROLIFERATION TO MITOGENS

Maximum proliferation of phytohemagglutinin as % CD3: > or =58.5%

Maximum proliferation of pokeweed mitogen as % CD3: > or =3.5%

Deze referentie-intervallen stroken met de eerstbekomen resultaten van onze gezonde bloeddonoren cfr. validatiedossier.

Voor de parameters in ModFit hebben we -voorlopig althans- geen referentiewaarden beschikbaar.

Op termijn is het doel om eigen referentie-intervallen opstellen, bij voorkeur ook in een gezonde pediatrische populatie.

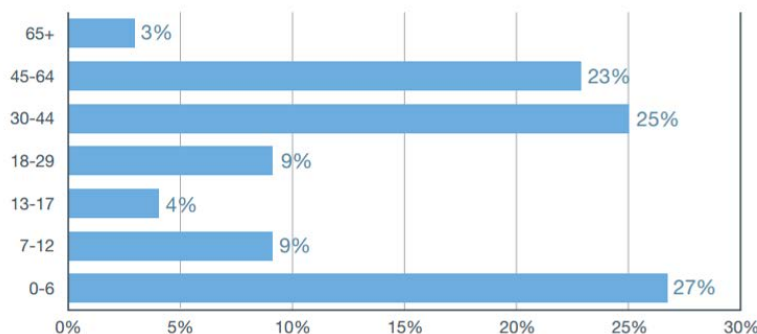
To do/ACTIONS

- 1) Methodevergelijking opzetten: stalen in parallel met beide methodes
- 2) Opstellen referentiewaarden

ATTACHMENTS

Figuur 1: Leeftijdsdistributie bij diagnose PI

Patient Age at PID Diagnosis⁷

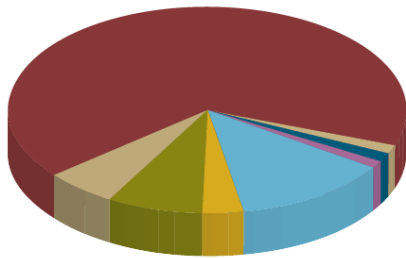


Bron: Immune Deficiency foundation Survey(2007): Primary Immunodeficiency Diseases In America: Third national survey of patients.

Tabel 1 Klinische waarschuwingstekens voor PID bij kinderen en volwassenen.

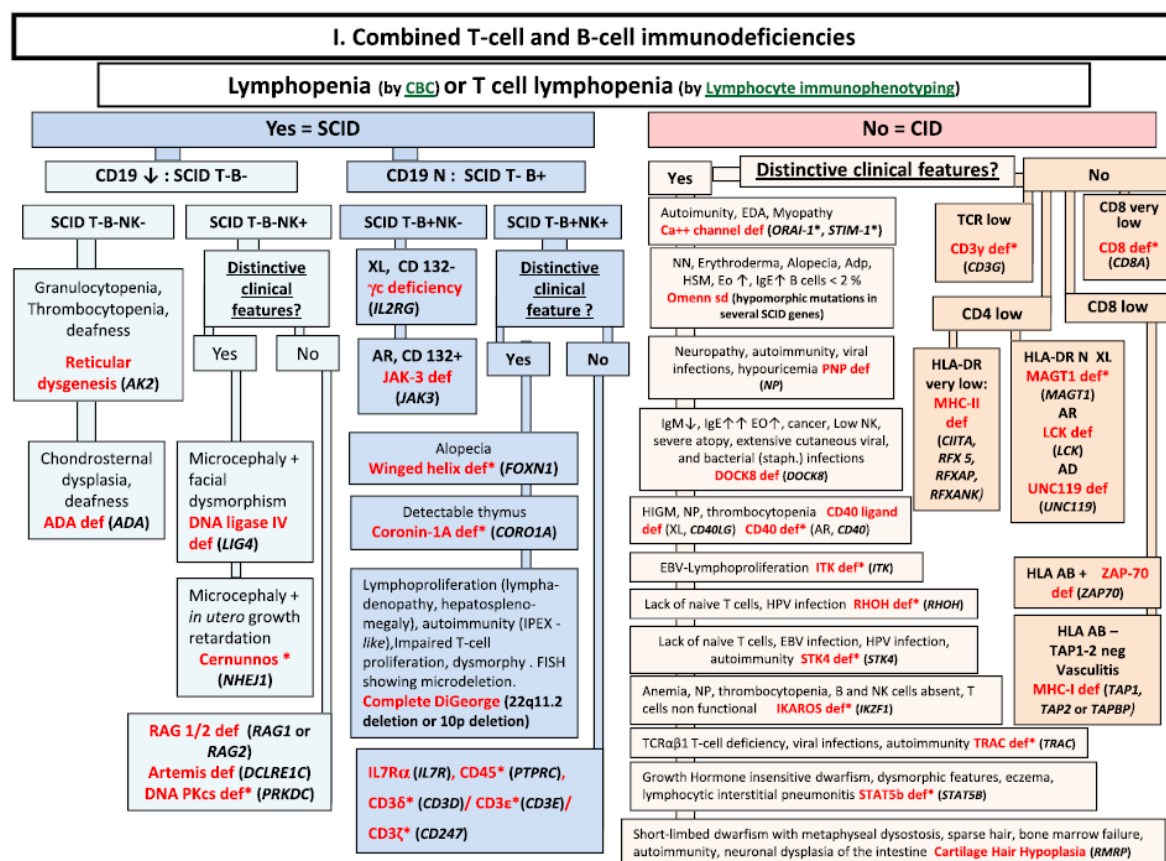
PID waarschuwingstekens bij het kind	PID waarschuwingstekens bij de volwassene
• Vier of meer nieuwe oorontstekingen in de loop van één jaar • Twee of meer nieuwe ernstige sinusontstekingen in de loop van één jaar • Twee of meer maanden antibioticatherapie zonder veel effect • Twee of meer longontstekingen in de loop van één jaar • Groeiachterstand in lengte of gewicht bij een kind • Herhaalde diepe abcessen van de huid of inwendige organen zoals de lever • Aanhoudende spruw (candida) in de mond of schimmelinfectie ter hoogte van de huid of elders • Nood aan intraveneuze antibiotica om van een infectie te genezen • Twee of meer invasieve infecties (bv. infectie van het bloed met een bacterie, hersenvliesontsteking) • Een voorgeschiedenis van PID in de familie	• Twee of meer nieuwe oorontstekingen in de loop van één jaar • Twee of meer nieuwe sinus infecties in de loop van één jaar, zonder dat u allergisch bent • Eén pneumonie per jaar gedurende meer dan één jaar • Chronische diarree met gewichtsverlies • Herhaalde virale infecties (verkoudheden, koortsblaren, wratten, condylomen) • Herhaalde nood aan intraveneuze antibiotic om van een infectie te genezen • Herhaalde, diepe abcessen van de huid of inwendige organen, bv. de lever • Aanhoudende spruw (candida) of schimmelinfectie ter hoogte van de huid of elders • Infectie met normaliter onschadelijke tuberculosis-achtige bacteriën • Een voorgeschiedenis van PID in de familie
De lijst van de PID waarschuwingstekens werd ontwikkeld door de Jeffrey Modell Foundation Medical Advisory Board ⁽¹⁾	

Figuur 2. Data Europese register PID (2010)

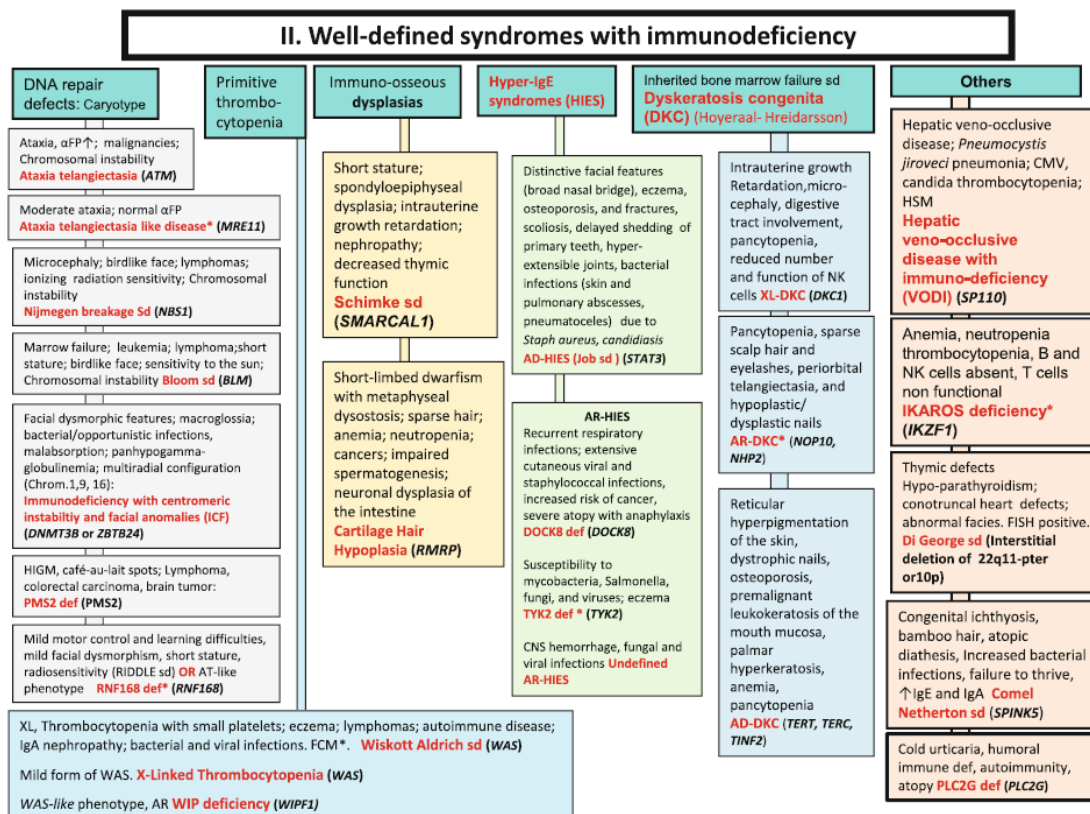


Diagnose	2010	
Antistofdeficiënties	55,6 %	(n=7,238)
Deficiënties in T-cellen	7,6%	(n=992)
Deficiënties in fagocytair systeem	10,2%	(n=1,330)
Deficiënties in het complementsysteem	4,7%	(n=616)
Andere wel-bekende PIDs	16,8%	(n=2,191)
Autoimmune and immuundysregulerende aandoeningen	1,4%	(n=181)
Autoinflammatoire aandoeningen	1,9%	(n=245)
Niet geclassificeerde PIDs	1,7%	(n=224)
Totaal aantal van patiënten	100%	(n=13,017)

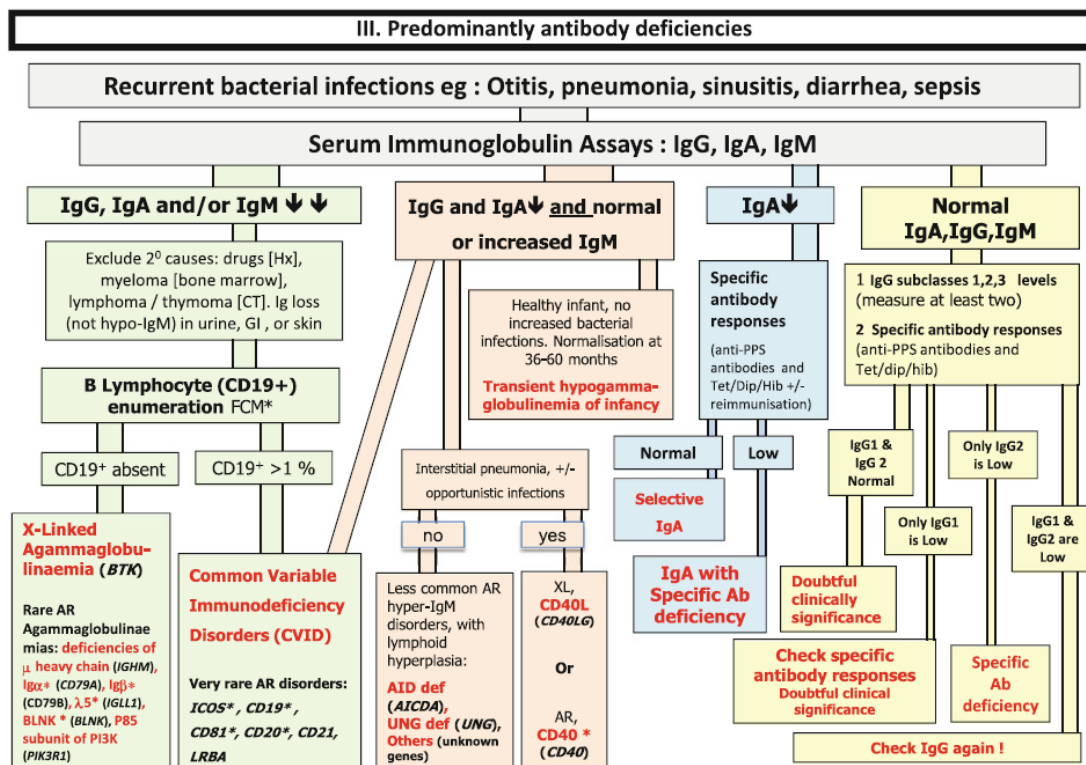
Figuur 3. Combined T-cell and B-cell immunodeficiencies: klasse 1 (IUIS classificatie PID)



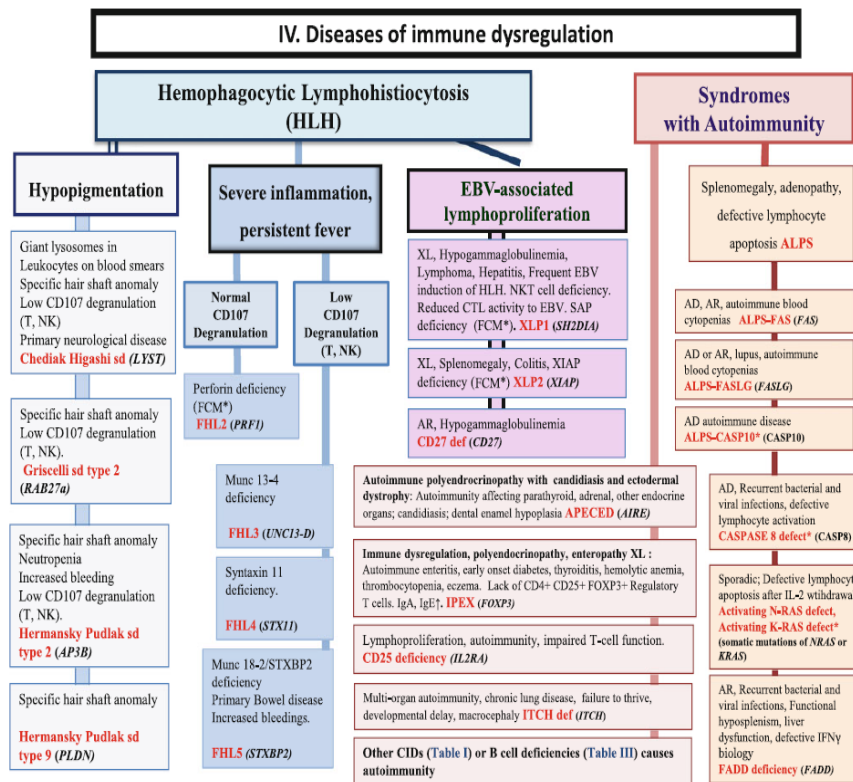
Figuur 4. Goed gedefinieerde syndromen gepaard met immunodeficiëntie: klasse 2 (IUIS classificatie PID)



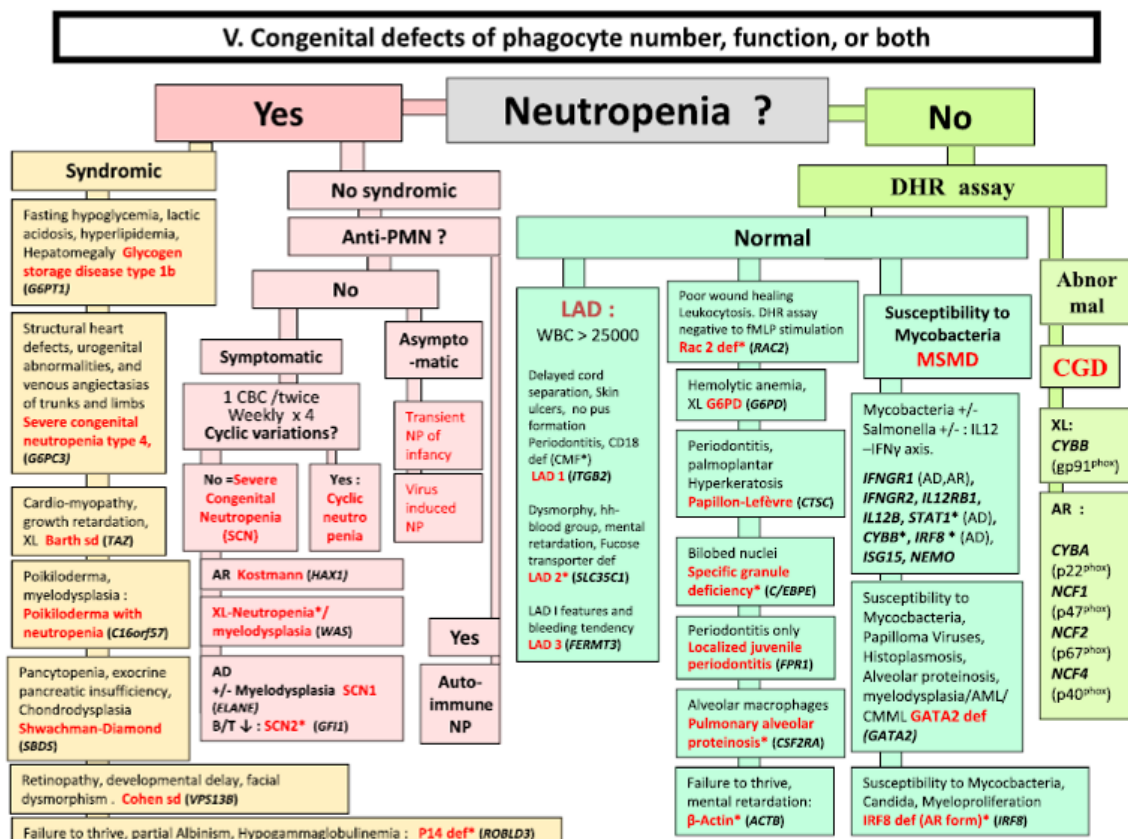
Figuur 5. Overwegend antistofdeficiënties: klasse 3 (IUIS classificatie PID)



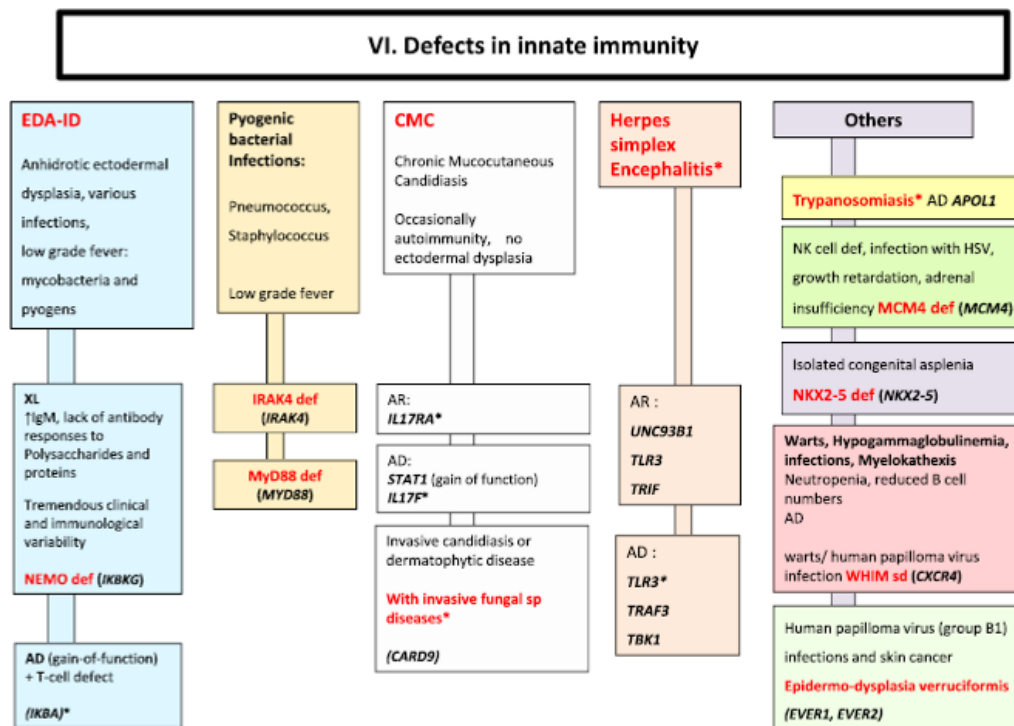
Figuur 6. Immuundysregulatie syndromen: klasse 4 (IUIS classificatie PID)



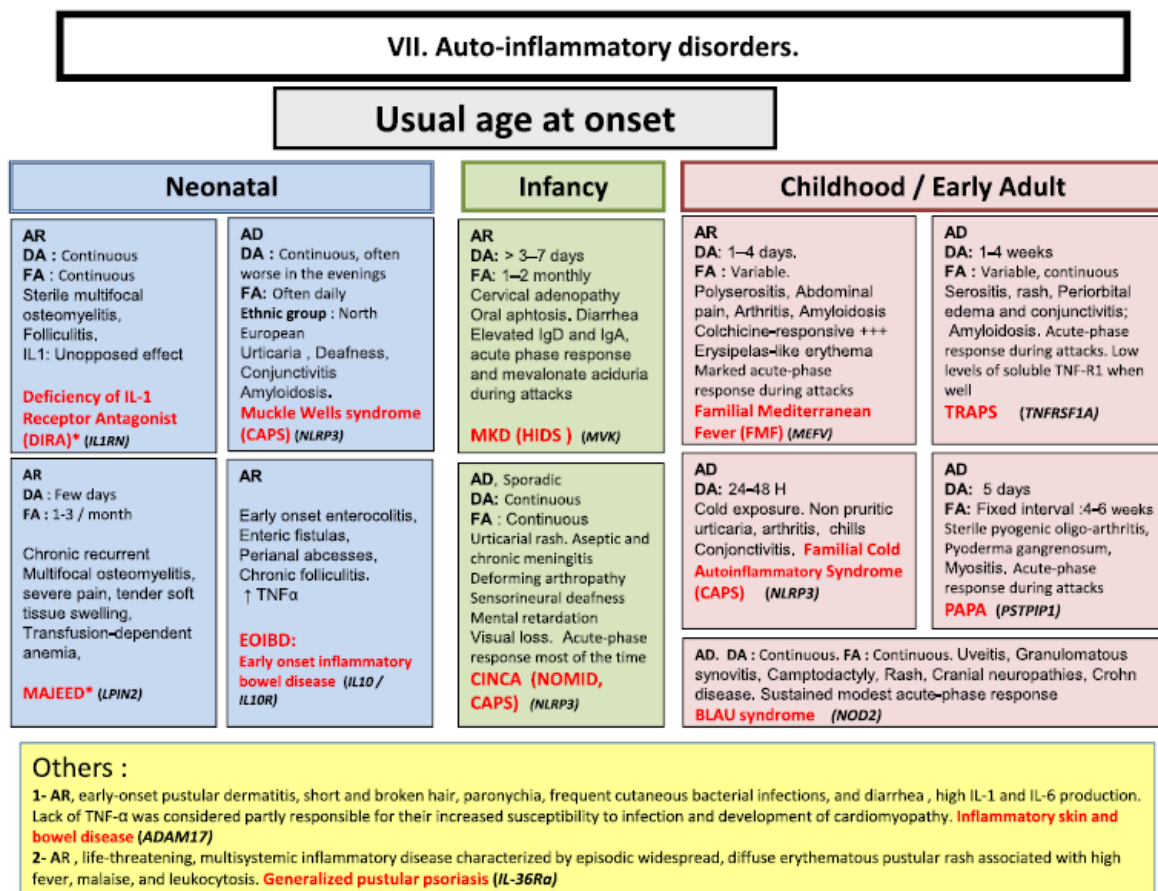
Figuur 7. Congenitale defecten van fagocytenaantal, -functie of beide: klasse 5 IUIS (classificatie PID)



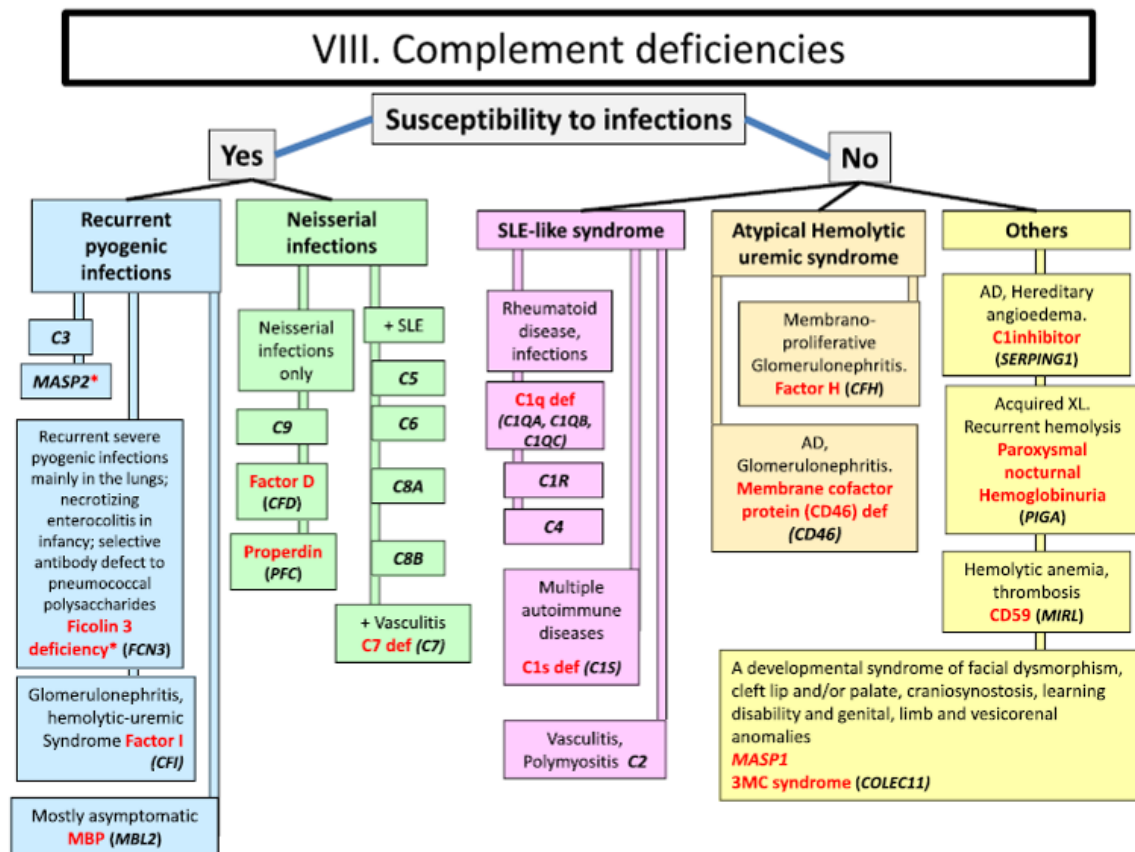
Figuur 8. Defecten van het aangeboren immuunsysteem: klasse 6 IUIS (classificatie PID)



Figuur 9. Auto-inflammatoire syndromen: klasse 7 IUIS (classificatie PID)



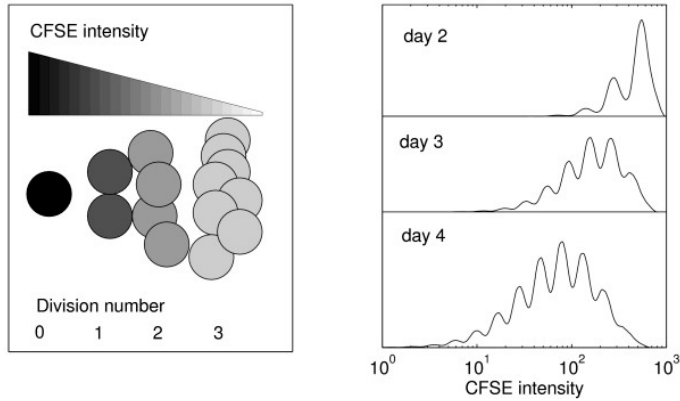
Figuur 10. Defecten van het aangeboren immuunsysteem: klasse 8 IUIS (classificatie PID)



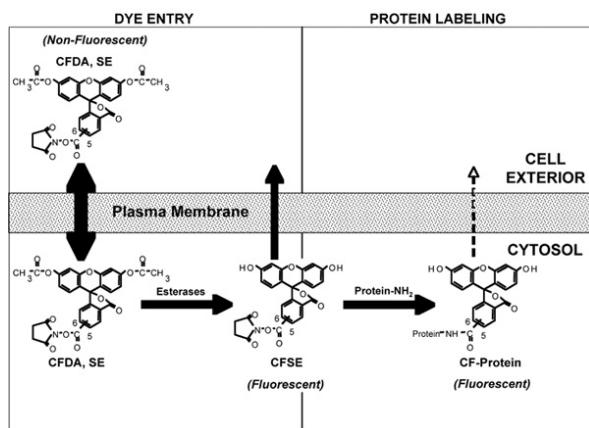
Figuur 11. Aanvraagbare analyses in LAG

IMMUNOLOGISCHE IMMUUNFENOTYPERING	LYMFOCYTEN- STIMULATIETEST ➡
Ma tot Vr vóór 12 uur	Ma tot Do, Vr vóór 12 uur
PERIFERE BLOED <i>Lymfocytensubpopulaties</i> 8837 ☐ B-cellen (CD19) 8838 ☐ T-cellen (CD3) 8845 ☐ CD4 T-cellen 8846 ☐ CD8 T-cellen 8848 ☐ Natural killer cellen 8835 ☐ CD5 (+) B-cellen Activatiemarkers op T-cellen 8836 ☐ HLA-DR 8850 ☐ CD4(+) regulatoire T-cellen 8851 ☐ CD62-L (L-selectine) 8852 ☐ CD57 8853 ☐ CD28 Immuundeficiëntie 8885 ☐ Memory B-cellen 8894 ☐ CD40 ligand expressie 8888 ☐ CD40 expressie 8877 ☐ α/β en γ/δ binnen T-celsubpopulaties 8870 ☐ Naïve T-cellen <i>bijzondere vormen van immuundeficiëntie: vereist voorafgaande afspraak met lab</i>	Antigeenstimulatie 6701 ☐ Candida 6702 ☐ Streptokinase 6703 ☐ Tetanus toxoid 6704 ☐ Tuberculine 6705 ☐ Herpes simplex 6706 ☐ Cytomegalovirus 6710 ☐ Influenza 6707 ☐ Varicella 6708 ☐ Bof Mitogeenstimulatie 6709 ☐ PWM 6720 ☐ ConA 6719 ☐ PHA 6712 ☐ IL-2 + anti-CD3 6722 ☐ Diverse stoffen ☐ medicatie: ☐ metaalzouten:

Figuur 12. CFSE dilutie en histogram

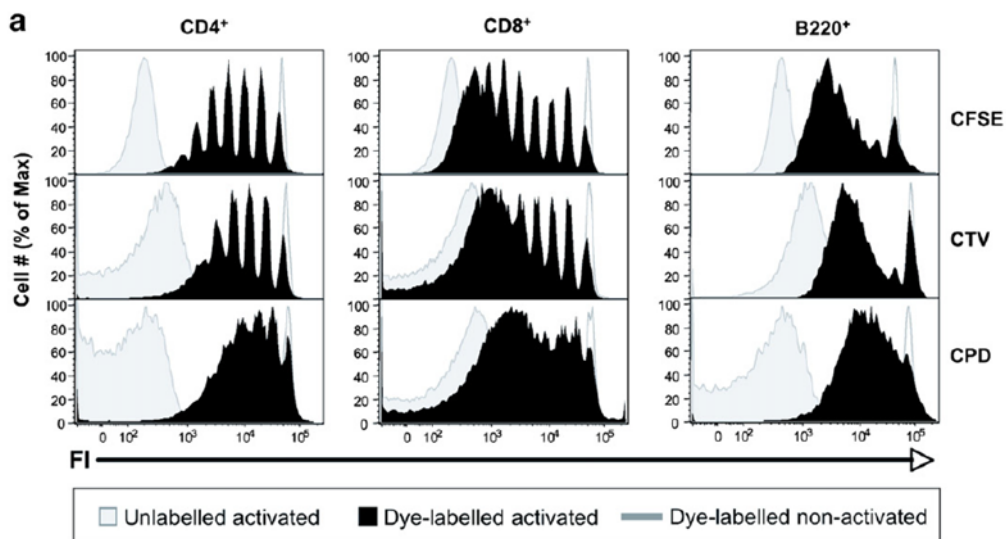


Figuur 13. Schematische voorstelling van de fasen van CFSE kleuring

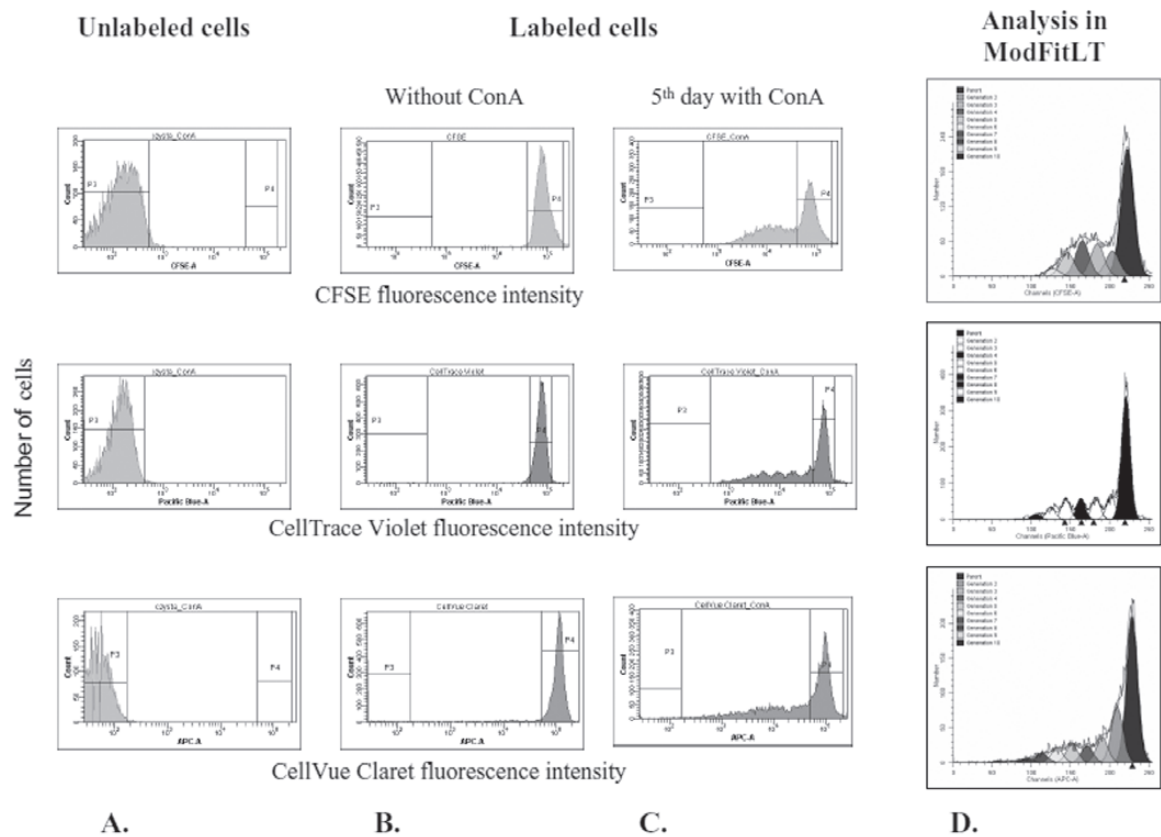


Figuur 14. Detectie van lymfocytenproliferatie in vitro met CFSE, CTV en CPD.

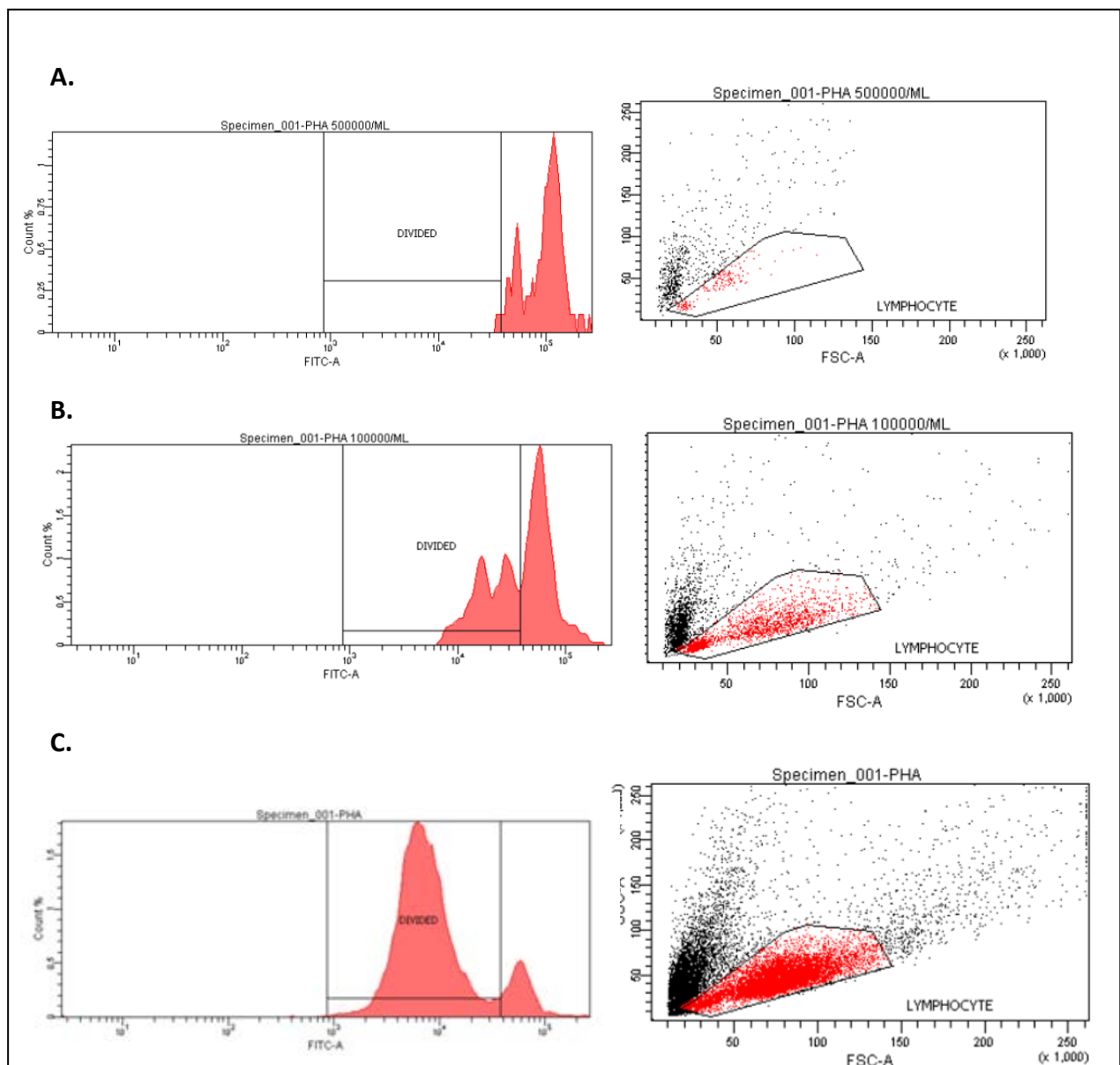
B.J.C. Quah, C.R. Parish / Journal of Immunological Methods 379 (2012) 1–14



Figuur 15. Vergelijking ModFit resultaten van CFSE, CellTrace Violet en CellVue Claret stainings.



Figuur 16. A: lymfocytengate en CFSE plots op 500.000 PBMC/ml, B idem op 1.000.000 PBMC/ml, C: 2.000.000 PBMC/ml.



Protocol LTT met CFSE op FacsCanto II:

Reagent set up:

- Vers geïsoleerde humane PBMC (cfr. SOP 096-bijlage 1) kunnen gebruikt worden met een finale concentratie 2×10^6 /ml.
- CFSE stock oplossing. Los CFSE poeder in DMSO op tot een finale concentratie van 5 mM (50 µg oplossen in 18 µl DMSO). (Te bewaren als 9 aliquots (2µl/aliquot) op -20°C gedurende enkele maanden).
- RPMI medium gesupplementeerd met glutamine, gentamycine en 10% FCS.

Routinemethode:

1. CFSE labeling van lymfocyten

- Breng 1 ml volume PBMC (cytose 2×10^6 /ml) over in een 10 cc Falcontube.
- Voeg 1 µl CFSE (5mM) toe aan 5 ml PBS tot een finale concentratie van 1 µM
- Voeg 1 ml PBS met CFSE 1 µM toe aan 1 ml PBMC (eindconcentratie CFSE=.0.5µM)
- Herkap de tube, draai enkele malen om en vortex.
- Laat dit 8 min incuberen op kamertemperatuur (20°C) na grondig op te mengen. NB: Langere incubatie resulteert in toxiciteit die celproliferatie kan verstoren. Na labeling wordt het ontstane CFSE fluorescent en moet de tube afgeschermd worden van het licht.
- Bedek de tube met de CFSE gelabelde lymfocyten met aluminiumfolie.
- Was de cellen door toevoegen van 10 ml RPMI met 10% FCS.
- Laat sedimenteren door centrifugatie op 400 g gedurende 5 min op 4°C en giet het supernatans af. Was de celpellet nog 1 keer op identieke wijze (+10 ml RPMI met 10% FCS).
- Leng aan met RPMI 10% FCS tot een concentratie van 2×10^6 cellen en vortex.
- Hierna kunnen de cellen het protocol voor inductie van celdeling ondergaan.

2. In vitro stimulatie van CFSE-gelabelde lymfocyten

- Steeds een **blanco controle** (niet-gestimuleerde lymfocyten zonder CFSE) alsook een **CFSE gestainde niet-gestimuleerde controlewell** meenemen.
- Er wordt 100 µl cultuurmedium RPMI 10% FCS (voor de controles), 100µl antigeen/PWM, 10 µl van PHA en ConA toegevoegd bij 1000 µl gestainde PBMCs zoals beschreven in bijgevoegde SOP096-Tabel 2

Antigenen/mitogenen: voorbereiding en gebruikshoeveelheid					
Antigeen of mitogeen	Concentratie stockoplossing	Volume voor verdunning	Verdunning (met RPMI)	Concentratie na verdunning	Finale concentratie tijdens cultuur (100 µl verdund antigeen bij 900 µl cellen)
CANDIDA	1000 µg/ml	100µl	1/10	100 µg/ml	10 µg/ml
STREPTOKINASE (= VARIDASE)	10000 U/ml	100µl	1/10	1000 U/ml	100 U/ml
TETANOS	onverdund	100µl	1/10		1/100
TUBERCULINE	1000 E	100µl	1/5	200 E	20 E
HERPES SIMPLEX	1/32	100µl			1/320
CYTO-MEGALOVIRUS (=CMV)	1 U/ml	100µl	1/10	100 mU/ml	10 mU/ml
INFLUENZA A+B	6,4 U/ml	100µl	1/10	0,64 U/ml	0,064 U/ml
VARICELLA	1/3,2 = 10 U/ml	100µl	1/10	1/32 = 1 U/ml	1/320 = 100 mU/ml
BOF	1/20	100µl	1/10		1/2000
POKEWEED (= PWM)	50 µg/ml	100µl	1/10	5 µg/ml	0,5 µg/ml
Antigeen of mitogeen					Finale concentratie tijdens cultuur (10 µl mitogeen bij 1 ml cellen)
PHA					90 µg/ml
Con A					6,25 µg/ml
Alle antigenen/mitogenen bevinden zich in de diepvriezer op -80 °C (LA 99134) of, op de werkpost, op -20 °C (LA88040).					
Na verdunning zijn de antigenen en PWM nog 7 dagen houdbaar op 2-8 °C.					
PHA en Con A zijn na verdunning nog 1 maand houdbaar op 2-8 °C.					

! De autofluorescentie van prolifererende lymfocyten is groter dan die van rustende lymfocyten en dus zal een ongelabelde populatie een maat stellen voor de autofluorescentie van een geactiveerde lymfocytenpopulatie. CFSE-gelabelde ongestimuleerde cellen geven een fluorescentiemeting van niet-delende lymfocyten.

- Vermijd om de buitenste wells op een plaat voor lymfocytencultuur te gebruiken, deze zijn meest vatbaar voor evaporatie en temperatuurfluctuaties. De buitenste wells worden best gevuld met PBS.

3. Harvesting en detectie van prolifererende lymfocyten

- Celproliferatie wordt meestal niet gezien tot 48u naar cultuurinitiatie. Tot negen fluorescentiepieken van CFSE kunnen waargenomen worden. Indien celdivisie meer dan 8 delingen heeft, zullen de cellen nabij het autofluorescentielevel zitten.
- ! CFSE heeft een piekexcitatie golflengte van 492 nm en een piek emissiegolflengte van 517 nm. De excitatiegolflengte is compatibel met de meeste standaard flowcytometers met een 488 nm excitatie laser.
- Harvest de cellen vanuit de cultuurwells en stain ze vervolgens met CD45-PB, CD3 PE-Cy7, CD4-APC en CD8-APC-H7., analoog aan de procedure beschreven in SOP 090-BLG2.
- Na de proliferatiestap worden de cellen geharvest, gestaind met monoklonale markers voor CD3-CD4 en CD8 & vervolgens flowcytometrisch geanalyseerd.

4. Staining met CD3, CD4, CD8, CD45.

Stainen met surface antigenen CD3, CD4, CD45 en CD8 zoals beschreven in SOP 090-BLG2. Binnen de lymfocytengate kunnen we ook de subpopulaties CD4+ en CD8 + T-lymfocyten evalueren: op de plots CFSE versus counts kunnen visueel de verschillende generaties (en dus countpieken) onderscheiden worden. Het percentage CD4+ CFSE+ (= de niet-geprolifereerde fractie) en het percentage CD4+ CFSE- (links van de cursor, deze bevatten Terwijl het aantal mitosen exponentieel toeneemt, zal de CFSE fluorescentie tegelijkertijd lineair dalen.

4. Analyse van prolifererende lymfocyten

Cfr. Facscanto LTT map vast sjabloon

5. ModFit software

Exporteer naar Modfit® en bereken PI en PF.

% Divided cells = percentage van cellen uit het originele staal dat gedeeld is, verondersteld dat er geen celdood optrad.