



Laboratoriumdiagnostiek van cellulaire immuundeficiëntie

Silvie Nickmans
Prof. dr. X. Bossuyt
20-03-2014

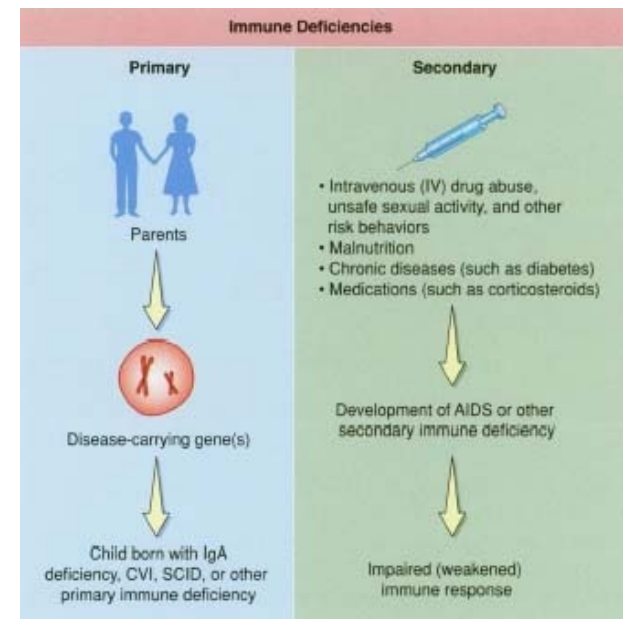
Immuundeficiënties: inleiding

○ Primair

- > 170 gendefecten gekend met variabele kliniek
- Incidentie geschat op 1:1000
- UZL: follow-up 300tal patiënten

○ Secundair

- Medicamenteus (chemo, CS)
- Infectieus (HIV)
- Chronische ziekten (SLE)



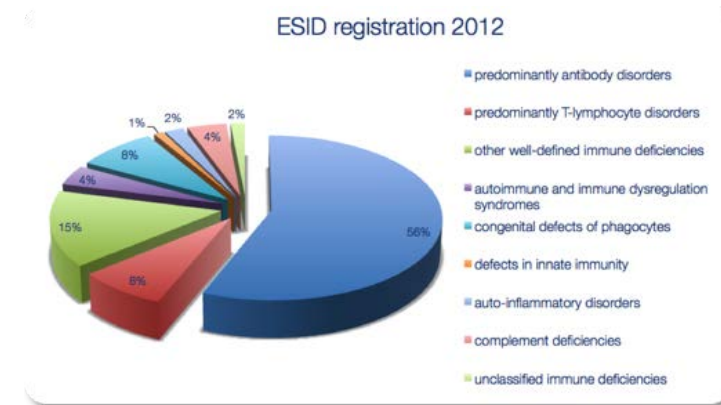
Immuundeficiënties: inleiding

PID waarschuwingstekens bij het kind	PID waarschuwingstekens bij de volwassene
<ul style="list-style-type: none">• 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 abscessen 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	<ul style="list-style-type: none">• 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 abscessen 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⁾	

Immuundeficiënties: inleiding

IUIS: Recente classificatie PI (2011)

1. predominantly antibody disorders (“humoral” immune deficiencies)
2. predominantly T-lymphocyte disorders
3. other well-defined immune deficiency syndromes
4. autoimmune and immune dysregulation syndromes
5. congenital defects of phagocyte number and/or function
6. defects in innate immunity
7. auto-inflammatory disorders
8. complement factor deficiencies



Aanleiding CAT



- Stijging awareness
 - Meer research & literatuur
 - Jeffrey Modell Foundation
 - Bijscholing artsen rond PI
 - Publieke awareness
 - Steun research
 - 11 VS staten: neonatale screening SCID
 - 52 JMF centra wereldwijd
- Media

Elke bacterie kan baby fataal zijn: Margaux leeft in isolatiekamer



De vijf maanden jonge Margaux uit Olen leeft al meer dan twee maanden in een speciale isolatiekamer. Door een erg zeldzame immuunstoornis kan een doorbeweeste badnie voor haar levensbedreigend zijn.

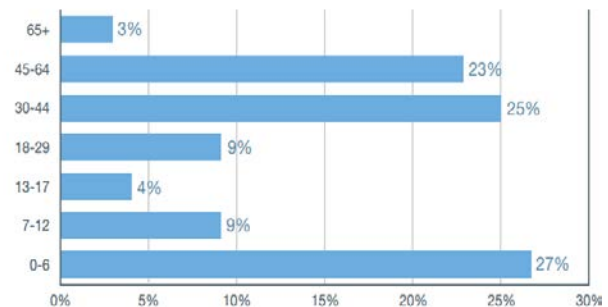
De kamer is enkel toegankelijk via een sas waar alles eerst heel goed ontsmet moet worden om haar te beschermen. Enkel zij als ouders mogen haar bezoeken. Via moders om grondig desinfecteren en een mondmasker, handschoenen en een sjaal dragen. Ze mogen zelfs geen foto's met meemaken om een foto van haar te maken. Slecht zo zouden we ook badende kunnen spreken. Maar beseft mag ook niet bij haar komen, hij mag zelfs niet naar school om te vernemen dat hij zo zwaar mee naar huis brengt, vertellen Margie en Henk, de ouders van Margaux.

Voorloepig wordt Margaux in leven gehouden met een zeer zeldzame Amerikaanse medicijn, dat de versiering van de rits blokkeert. Maar voor een kans op definitieve genezing moet de geneeskunde ondergaan in Milaan. Gelukkig krijgt het koppel veel steun van vrienden en collega's. Daarnaast heeft een zingende moeder met kinderen van ongeveer dezelfde leeftijd zich gegroepeerd om geld in te zamelen. "We ruken niet voor je genot geld is en ik heb je zo vaak meer heeft", lacht het.

Aanleiding CAT

- Stijging aantal nieuwe diagnoses
 - 2000: 64 Belgische patiënten geregistreerd bij ESID
 - ↕
 - 2014: **300** patiënten in UZL in follow-up
- Zeer breed leeftijdsspectrum patiënten
 - Ernstige vormen: jonge leeftijd
 - Milde vormen: latere leeftijd

Patient Age at PID Diagnosis⁷

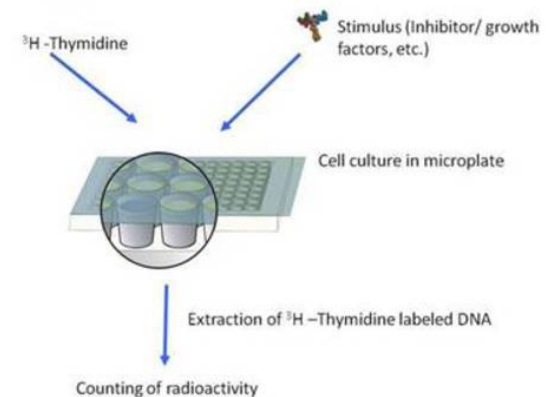


Aanleiding CAT

Huidige functionele lymfocytentest arbitrair

- Nadelen huidige LTT:
 - Nood aan isotopen
 - Arbeidsintensief voor MLT's
 - Black box: geen identificatie van de geprolifereerde lymfocyten

→ nood aan performante test voor lymfocytenfunctie





Questions



1. Welke testen zijn aangewezen bij vermoeden van (cellulaire) immuundeficiëntie?
2. Wat zijn de beschikbare nieuwe methoden voor functionele lymfocytentest? Hoe optimaliseren we deze?
3. Welke parameters berekenen we ? Hoe worden de resultaten geïnterpreteerd?



Questions



1. Welke testen zijn aangewezen bij vermoeden van (cellulaire) immuundeficiëntie?
2. Wat zijn de beschikbare nieuwe methoden voor functionele lymfocytentest? Hoe optimaliseren we deze?
3. Welke parameters berekenen we ? Hoe worden de resultaten geïnterpreteerd?



Diagnostiek Immuundeficiëntie

- Hematologische celtelling
- Flowcytometrie
 - T/B/NK
- Functionele lymfocytentest
- Kwantificatie Immunoglobulines
- Moleculaire diagnostiek
- Specifieke tests

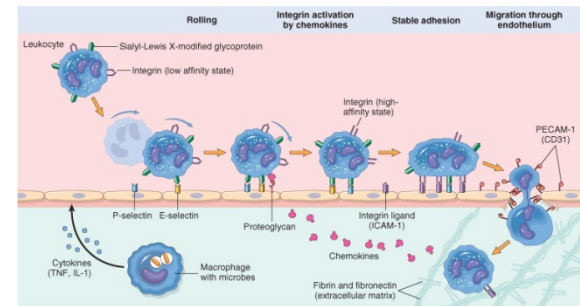
Bonilla FA et al (AAACI). Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. Ann Allergy Asthma Immunol. 2005 May;94(5 Suppl 1):S1-63.

IDF Diagnostic & Clinical Care Guidelines for Primary Immunodeficiency Diseases 2nd Edition. (2009) p.3-15.

Diagnostiek Immuundeficiëntie

Hematologische celtelling

- opsporen absolute lymfopenie
! Leefijdsspecifieke referentiewaarden
- neutropenie ↔ neutrofilie (LAD)
 - Leukocyten Adhesie Deficiëntie
- trombocyten: trombopenie & ↓ MPV (Wiskott-Aldrich syndroom)



© Elsevier 2005

Diagnostiek Immuundeficiëntie

Flowcytometrie

- Identificatie B/T/NK
- Specifieke tests:
 - Memory B-cellen
 - CD40
 - CD40ligand
 - T-celrepertoire

IMMUNOLOGISCHE IMMUUNFENOTYPERING	
Ma tot Vr vóór 12 uur	
PERIFEER BLOED	
Lymfocytensubpopulaties	
8837	<input type="checkbox"/> B-cellen (CD19)
8838	<input type="checkbox"/> T-cellen (CD3)
8845	<input type="checkbox"/> CD4 T-cellen
8846	<input type="checkbox"/> CD8 T-cellen
8848	<input type="checkbox"/> Natural killer cellen
8835	<input checked="" type="checkbox"/> CD5 (+) B-cellen
Activatiemarkers op T-cellen	
8836	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-DR
8850	<input checked="" type="checkbox"/> CD4(+) regulatoire T-cellen
8851	<input checked="" type="checkbox"/> CD62-L (L-selectine)
8852	<input checked="" type="checkbox"/> CD57
8853	<input checked="" type="checkbox"/> CD28
Immuundeficiëntie	
8885	<input checked="" type="checkbox"/> Memory B-cellen
8894	<input checked="" type="checkbox"/> CD40 ligand expressie
8888	<input checked="" type="checkbox"/> CD40 expressie
8877	<input checked="" type="checkbox"/> α/β en γ/δ binnen T-celsubpopulaties
8870	<input checked="" type="checkbox"/> Naïeve T-cellen
<i>bijzondere vormen van immuundeficiëntie: vereist voorafgaande afspraak met lab</i>	

- Lymfocytenfunctie ("cellulair"): ook mogelijk met flowcytometrie

Lymfocytenstimulatietest (LTT)

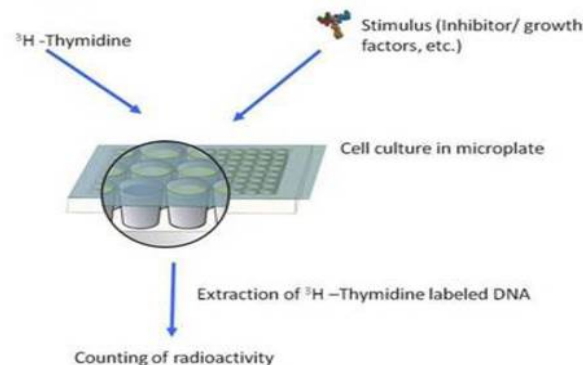


Functionele lymfocytentest

Thymidine methode (RIA)

- Isolatie PBMC's
- Stimulatie met mitogenen-antigenen
- Incubatie 3-6 dagen (37°C, 5%CO₂)
- Toevoegen isotopen & incorporatie in DNA
- S.I. = counts gestimuleerde lymfocyten
counts controlewell

- >10 = positief



LYMFOCYTEN-STIMULATIETEST

Ma tot Do, Vr vóór 12 uur

Antigenstimulatie

- 6701 Candida
- 6702 Streptokinase
- 6703 Tetanus toxoid
- 6704 Tuberculine
- 6705 Herpes simplex
- 6706 Cytomegalovirus
- 6710 Influenza
- 6707 Varicella
- 6708 Bof

Mitogenstimulatie

- 6709 PWM
- 6720 ConA
- 6719 PHA
- 6712 IL-2 + anti-CD3

- 6722 Diverse stoffen

- medicatie:
- metaalzouten:

Diagnostiek Immuundeficiëntie

- **Kwantificatie Immunoglobulines**
 - IgA, IgM, IgG (+ subklassen)
- **Moleculaire diagnostiek** : 170 genotypes
 - FISH 22q11 deletie (di George)
- **Specifieke testen**
 - Adenosine deaminase



Questions



1. Welke testen zijn aangewezen bij vermoeden van (cellulaire) immuundeficiëntie?
2. Wat zijn de beschikbare nieuwe methoden voor functionele lymfocytentest? Hoe optimaliseren we deze?
3. Welke parameters berekenen we ? Hoe worden de resultaten geïnterpreteerd?



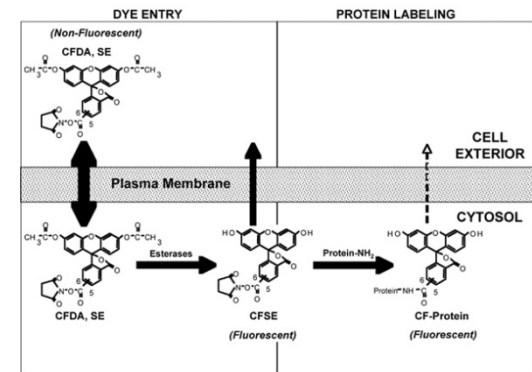
Lymfocytenstimulatietest (LTT)

- IDF Diagnostic & Clinical Care Guidelines
 - “T cell functional testing is of greatest importance”
- Nood aan nieuwe methode:
 - Literatuurstudie
 - Flowcytometrie
 - **CFSE** (1994)
 - Recenter:
 - Celltraceviolet
 - CellVue Claret
 - Cell proliferation dye (CPD)

CFSE

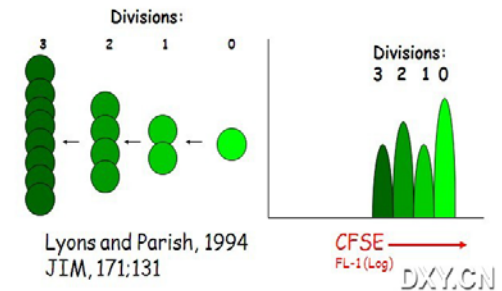
- sterke fluorescente intensiteit (FITC)
- lage celtoxiciteit

- CFDA,SE membraanpermeabel
- deacetylering door esterases
- CFSE bindt aan intracellulaire proteïnen

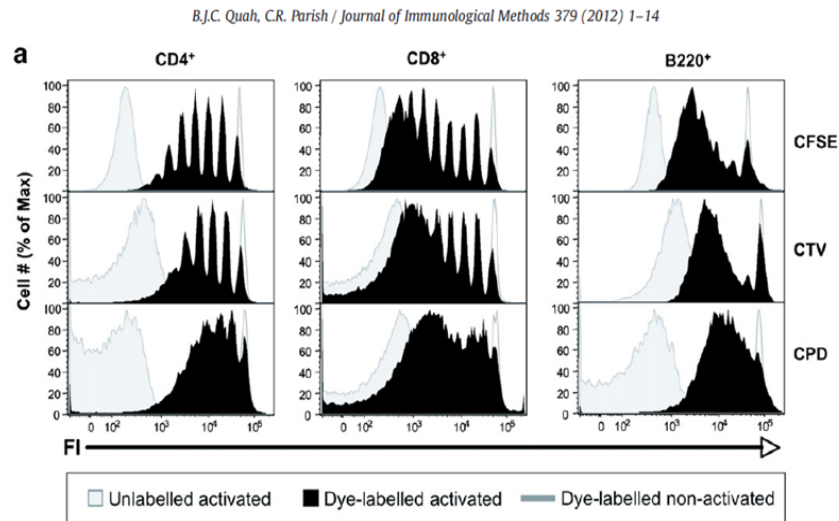


- Per consecutieve mitose: halvering fluorescentie

Dilution of CFSE with cell division



CFSE versus recente alternatieven

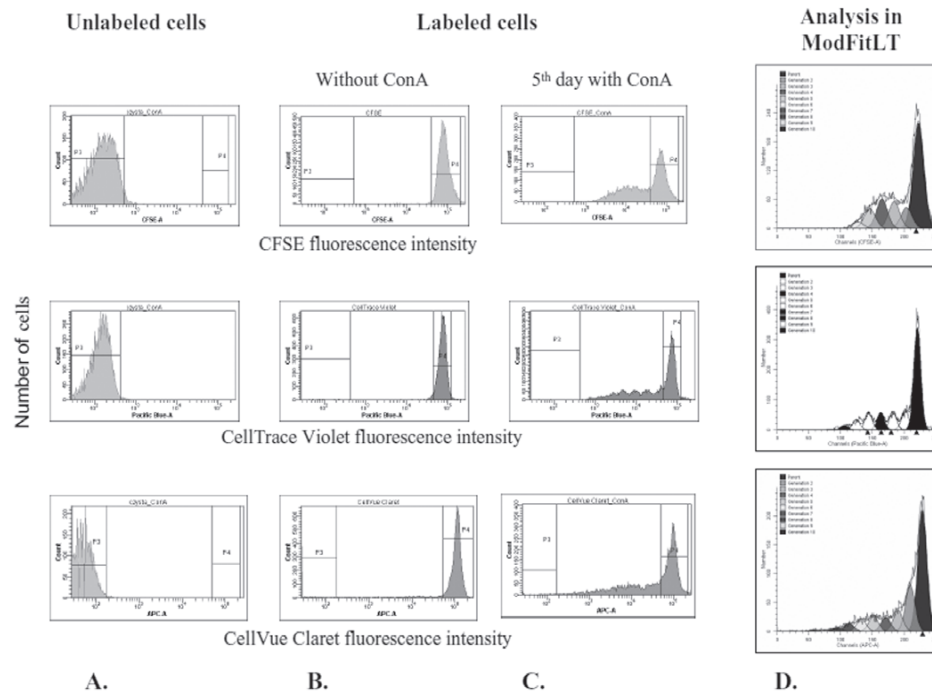


Conclusies:

- **CFSE**: beste resultaat
differentiatie (tot 8) & resolutie
- **CTV**: zwakke detectie
celdivisies
- **CPD**: minste performantie
qua aantal pieken als resolutie

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.

CFSE versus recente alternatieven



Conclusies:

- CFSE, CTV, Cellvue Claret
- Con A stimulatie 5 dagen
- ModFit analyse:
Gelijkwaardige Resultaten in ModFit

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.



Lymfocytenstimulatietest (LTT)

Evaluatie CFSE methode

- Gebaseerd op gepubliceerd protocol

Parish, C. R. et al. 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).

- Eigen evaluatie cruciale parameters ter optimalisatie
 - Startconcentratie PBMC (2×10^6 /ml)
 - Concentratie CFSE staining (0.5 μ M)
 - Incubatietijd CFSE (!Toxiciteit) & mitogenen
 - Specifieke noden kweekmedium (RPMI met 10% FCS)



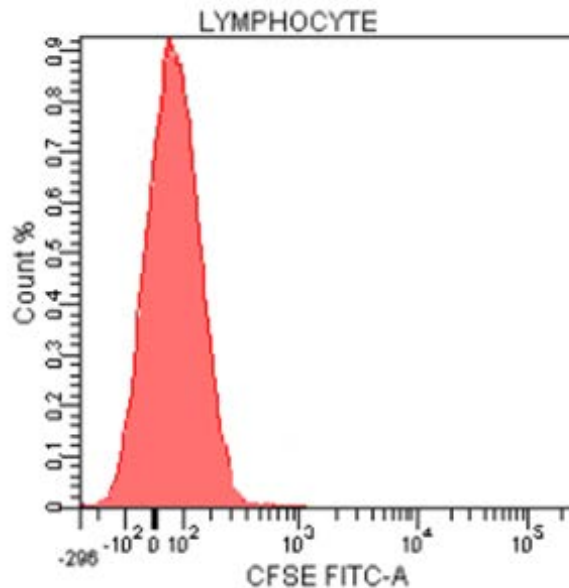
Immunofenotypering en Flowcytometrie

Procedure

- Isolatie PBMC
- Staining met CFSE
- Stimulatie van PBMC & incubatie
 - Mitogenen (3-4 dagen): PHA, Con A, Pokeweed Mitogen
 - Antigenen (6-7 dagen) : Candida, Tetanus toxoid, Herpes, ..
- Na stimulatie: harvesting & staining
 - CD3-CD4-CD8-CD45
- Per patiënt:
 - Blanco niet gestimuleerde PBMC
 - CFSE gestainde PBMC
 - gestimuleerde PBMC ('staal')

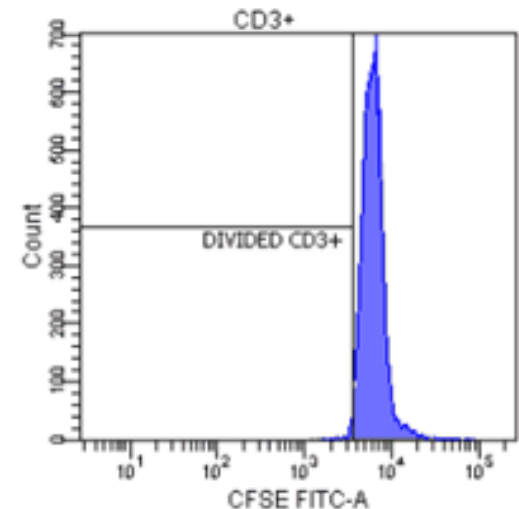
Immunofenotypering en Flowcytometrie

- Blanco meting op dag 0
 - Autofluorescentielevel van lymfocyten in rustfase



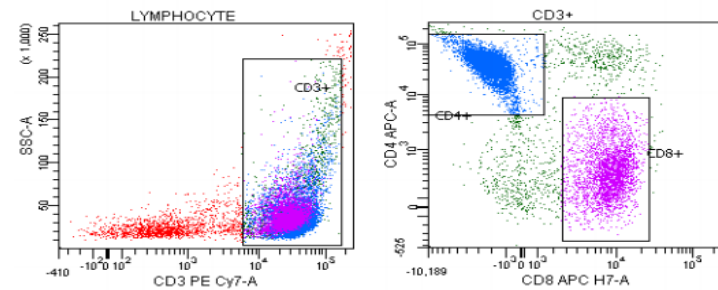
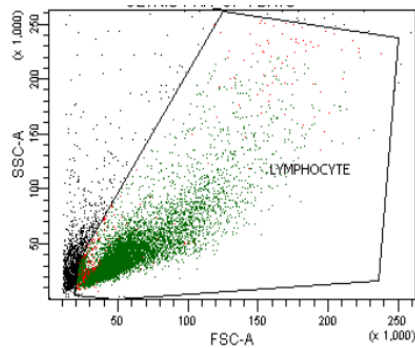
Immunofenotypering en Flowcytometrie

- CFSE controle meting
 - Nut:
 - parentgeneratie visualiseren
 - Plaatsen cursor voor berekening proliferatie na stimulatie
 - Mitosen na stimulatie verschijnen links van cursor
 - Berekend als Divided %CD3/4/8



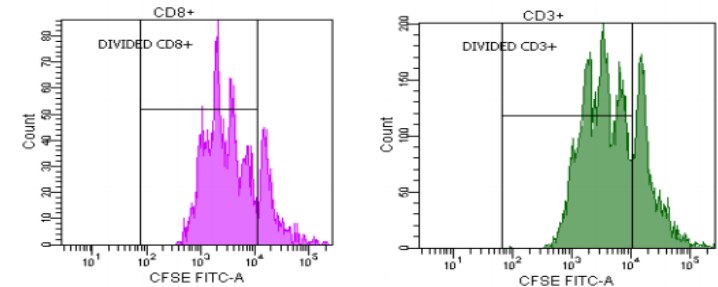
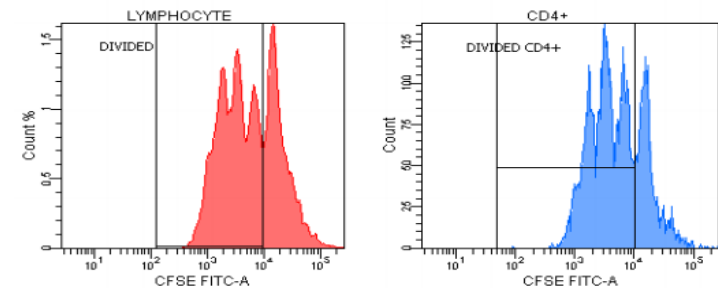
Immunofenotypering en Flowcytometrie

- Gezonde donor: PHA stimulatie (4 dagen)



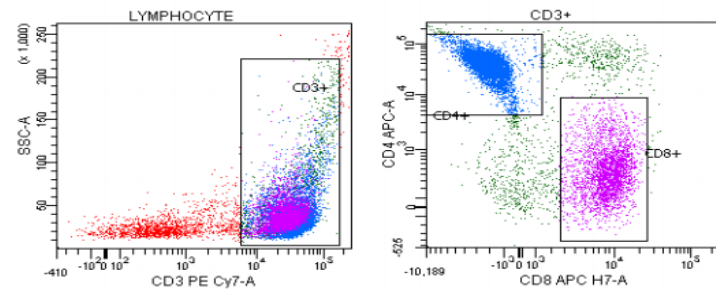
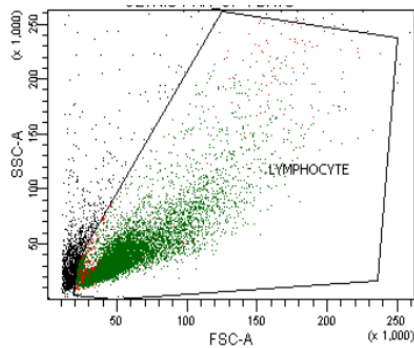
Tube: PHA_GF 4 DAYS

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	13,118	####	100.0
LYMPHOCYTE	11,479	87.5	87.5
DIVIDED	7,324	63.8	55.8
CD3+	9,970	86.9	76.0
CD4+	5,978	60.0	45.6
DIVIDED CD4+	4,353	72.8	33.2
CD8+	3,045	30.5	23.2
DIVIDED CD8+	2,418	79.4	18.4
DIVIDED CD3+	7,211	72.3	55.0



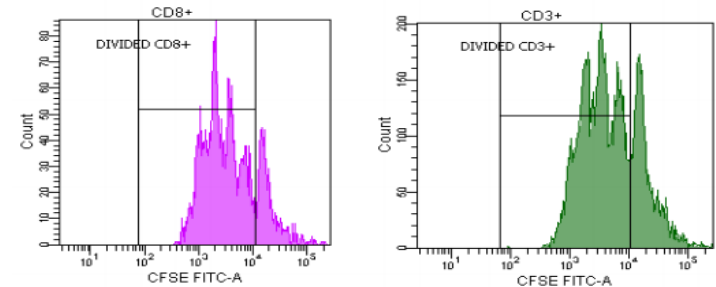
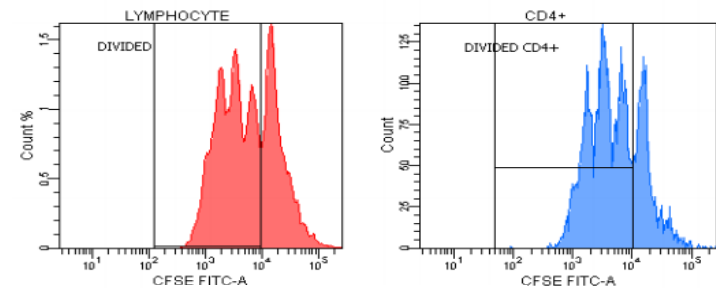
Immunofenotypering en Flowcytometrie

- Gezonde donor: PHA stimulatie (4 dagen)



Tube: PHA_GF 4 DAYS

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	13,118	####	100.0
LYMPHOCYTE	11,479	87.5	87.5
DIVIDED	7,324	63.8	55.8
CD3+	9,970	86.9	76.0
CD4+	5,978	60.0	45.6
DIVIDED CD4+	4,353	72.8	33.2
CD8+	3,045	30.5	23.2
DIVIDED CD8+	2,418	79.4	18.4
DIVIDED CD3+	7,211	72.3	55.0





Evaluatie CFSE methode

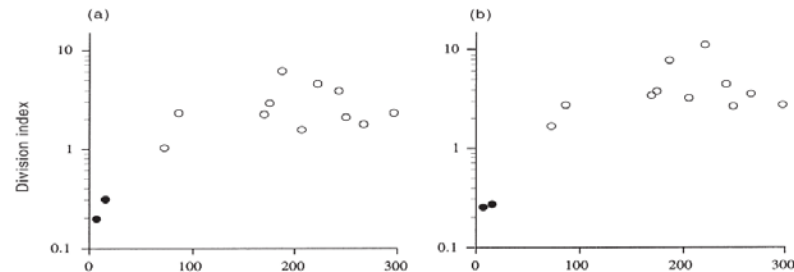
- Gebruik gezonde donoren voor optimalisatie cruciale parameters
- Imprecisie
 - Intra-sample (n=10) 1.7%
 - Inter-sample (n=5) 3.5%
- Accuraatheid: niet mogelijk
 - Gebrek aan gold standard
 - Hiaat, ook in literatuur
- Methodevergelijking
 - Nog lopende
 - Reeds geïncludeerd: 11 patiënten waarvan 2 gekende PI

Methodevergelijking

- Correlatie thymidine en CFSE
- PHA stimulatie (2 concentraties: 1 en 5 $\mu\text{g/ml}$)
 - Thymidinerespons in c.p.m. (X-as)
 - CFSE respons als division index (Y-as)

562

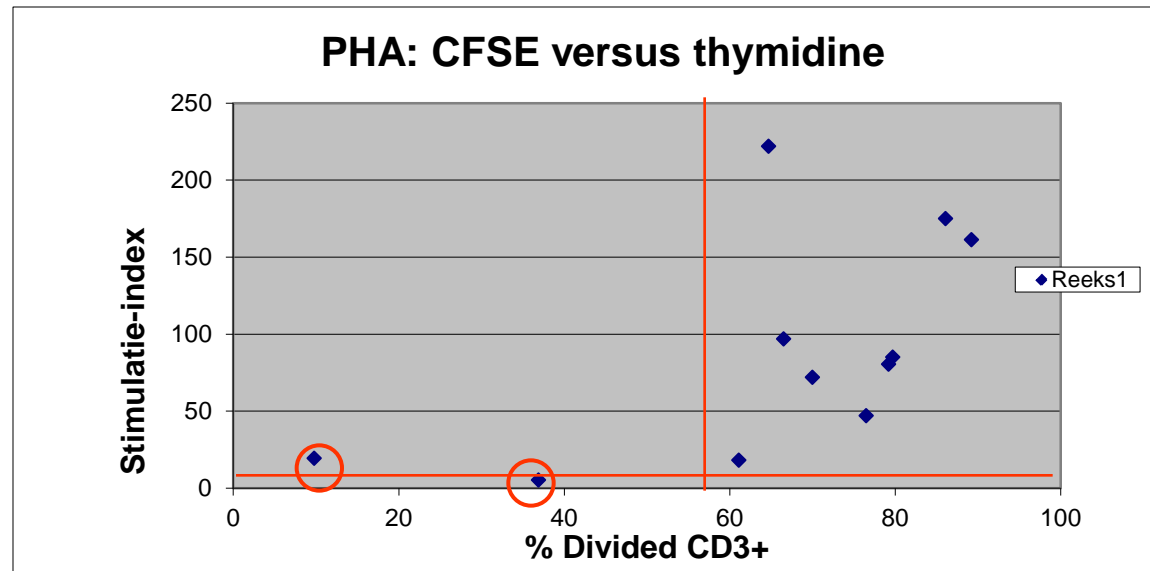
DA Fulcher and S Wong



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

Methodevergelijking

- Presumptieve resultaten LAG (Ref.waarden CFSE: Mayo Clinic)
- 2 reeds gekende patiënten met primaire immuundeficiëntie
 - Di George syndroom
 - Adenosine deaminasedeficiëntie



Conclusies CFSE methode

- CFSE-gebaseerde essays zijn equivalent aan traditionele methoden voor mitogeen- en antigeen-specifieke T celreactiviteit
- Significante voordelen o.v.v.
 - Minder arbeidsintensief
 - Mijden van radioactiviteit
 - Gaten op specifieke populatie binnen de lymfocyten



Questions



1. Welke testen zijn aangewezen bij vermoeden van (cellulaire) immuundeficiëntie?
2. Wat zijn de beschikbare nieuwe methoden voor functionele lymfocytentest? Hoe optimaliseren we deze?
3. Welke parameters berekenen we ? Hoe worden de resultaten geïnterpreteerd?

Interpretatie Resultaten CFSE

STATISTIC ^a	TYPE ^b	FORMULA ^c	VALUE RANGE		INTERPRETATION
			MIN	MAX	
Fraction diluted	Ext	$Dil = \frac{\sum_1^i N_i}{\sum_0^i N_i}$	0	1 ^d	Fraction of cells in the final culture that divided at least once
Precursor frequency, %dividing cells ^{efg}	Int	$PF = \frac{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$	0	1	Probability that a cell will divide at least once
Proliferation index ^{ef} ; expansion index ^g	Ext	$EI = \frac{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	128 ^h	Fold expansion during culture (ratio of final cell count to starting cell count)
Division index ^f ; replication index ^g	Ext	$RI = \frac{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	128 ^h	For responding cells, fold expansion over the culture time
Proliferation index ^g	Int	$PI = \frac{\sum_1^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	7 ^h	For responding cells, average number of divisions they have undergone
Division index ^g	Ext	$DI = \frac{\sum_0^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$	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)

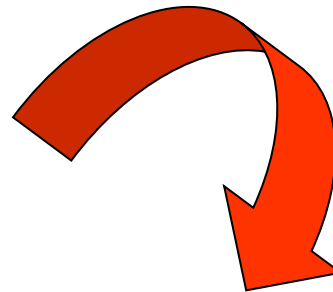
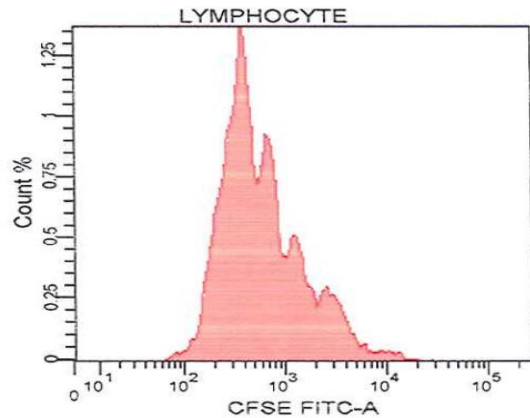
Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. Cytometry A. 2011 Feb;79(2):95-101.

Interpretatie Resultaten CFSE

STATISTIC ^a	TYPE ^b	FORMULA ^c	VALUE RANGE		INTERPRETATION
			MIN	MAX	
Fraction diluted	Ext	$Dil = \frac{\sum_1^i N_i}{\sum_0^i N_i}$	0	1 ^d	Fraction of cells in the final culture that divided at least once
Precursor frequency, %dividing cells ^{efg}	Int	$PF = \frac{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$	0	1	Probability that a cell will divide at least once
Proliferation index ^{ef} ; expansion index ^g	Ext	$EI = \frac{\sum_0^i N_i}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	128 ^h	Fold expansion during culture (ratio of final cell count to starting cell count)
Division index ^f ; replication index ^g	Ext	$RI = \frac{\sum_1^i N_i}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	128 ^h	For responding cells, fold expansion over the culture time
Proliferation index ^g	Int	$PI = \frac{\sum_1^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}$	1	7 ^h	For responding cells, average number of divisions they have undergone
Division index ^g	Ext	$DI = \frac{\sum_0^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$	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)

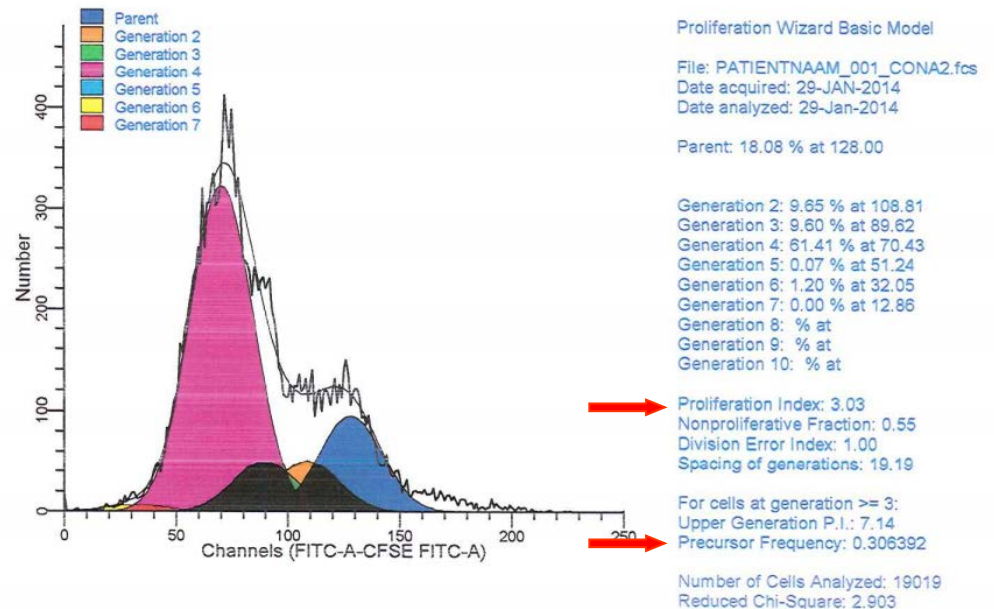
Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. Cytometry A. 2011 Feb;79(2):95-101.

Resultaten CFSE: ModFit analyse



ModFit analyse

- Proliferatie-index: 3.03
- Precursor frequentie: 30.6%





Referentiewaarden

Mayo Clinic: eigen referentiewaarden

- 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%

Bron: Mayo Medical Laboratories, Online Interpretive Handbook, Search term: Lymphocyte Proliferation to Mitogens, Blood.

TO DO:

- Finaliseren methodevergelijking
- Opstellen eigen referentiewaarden
 - Voorstel goedgekeurd door Ethische Commissie
- Opleiding MLT

