

## Referenceområde til in vitro T-celle proliferationsanalyse med CellTrace Violet

*Professionsbachelorprojekt af Eva Krogh (284917), Jeanne Mejneche (284373),  
Rune Kjeldsen (284392) og Thu Anh Troung (284963)*

Bioanalytikeruddannelsen, VIA University College, Aarhus N  
I-vejleder: Jonas Thorsen, [joth@via.dk](mailto:joth@via.dk)

Klinisk Immunologisk Afdeling, Aalborg Universitetshospital  
K-vejledere: Berit Nørregaard, [beritnoer@rn.dk](mailto:beritnoer@rn.dk) og Louise Larsen, [lol@rn.dk](mailto:lol@rn.dk)

## Forord

Dette bachelorprojekt er udarbejdet af Eva Krogh, Jeanne Mejneche, Rune Kjeldsen og Thu Anh Truong fra 7. semester på bioanalytikeruddannelsen, VIA University College, Campus Aarhus N. Projektet er udarbejdet i tilknytning til Klinisk Immunologisk Afdeling, Aalborg Universitetshospital, i Afsnit for Cellulær Immunologi (CIA), og forløb i tidsperioden 21.03.2022 - 01.06.2022.

I forbindelse med udarbejdelse af projektet vil vi takke vores kliniske vejledere, Berit Nørregaard og Louise Larsen, samt vores institutionsvejleder, Jonas Thorsen, for råd og vejledning. Ydermere vil vi takke Cand.Scient i Molekylær Medicin, Line Lindgreen Eriksen, og personalet i CIA for deres behjælpelighed, rådgivning og undervisning i procedurer relateret til projektets formål.

Derudover ønsker vi at takke overlæge, Kaspar René Nielsen, for undervisning i immundefekter samt opgivelse af relevant litteratur.

Slutteligt vil vi takke sygeplejerskerne i Blodbanken, Aalborg, som har været behjælpelig ift. indsamling af prøvemateriale til vores laboratorieforsøg.

Det forventes at læseren af projektet har en fundamental forståelse for immunologi.

Projektet er opbygget efter IMRAD-format, og referencer er opstillet i Vancouver-format.

I projektet indgår egne figurer, fremstillet i programmet *BioRender*. Disse er markeret med \* i figurteksten. Illustrationen på forsiden er ligeledes lavet her.

Der er desuden udarbejdet en læsenøgle, indeholdende en oversigt over forkortelser, som går igen i projektet.

## Læsenøgle

<b>α-</b>	Anti-
<b>AaUH</b>	Aalborg Universitetshospital
<b>APC</b>	Antigenpræsenterende celler
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CIA</b>	Afsnit for Cellulær Immunologi
<b>CID</b>	Kombinerede immundefekter (Combined Immunodeficiencies)
<b>CTV</b>	CellTrace™ Violet
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>FSC-A</b>	Forward Scatter - Areal
<b>FSC-H</b>	Forward Scatter - Højde
<b>ID</b>	Immundefekter
<b>IL-2</b>	Interleukin-2
<b>IL-2R</b>	Interleukin-2-Receptor
<b>KIA</b>	Klinisk Immunologisk Afdeling
<b>L/D</b>	LIVE/DEAD™ Fixable Far-Red
<b>PBMC</b>	Perifert blod mononukleære celler
<b>PBS</b>	Phosphatbufret saltvand
<b>PHA</b>	Phytohæmagglutinin
<b>PID</b>	Primære immundefekter
<b>PMT</b>	Fotomultiplikatorrør (Photomultiplier tubes)
<b>PMN</b>	Polymorfnukleære leukocytter (Polymorphonuclear neutrophils)
<b>SCID</b>	Svær kombineret immundefekt (Severe Combined Immunodeficiency)
<b>SID</b>	Sekundære immundefekter
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>TCR</b>	T-celle receptor

# Indholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<i>Læsenøgle</i> .....	2
<b>Indholdsfortegnelse</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Resumé</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Introduktion</b> .....	<b>6</b>
2.1 <i>Baggrund</i> .....	6
2.2 <i>Problemformulering</i> .....	8
2.3 <i>Målformulering</i> .....	8
<b>3 Teori</b> .....	<b>9</b>
3.1 <i>Leukocytter</i> .....	9
3.2 <i>T-celler</i> .....	9
3.3 <i>Priming af T-celler</i> .....	9
3.4 <i>Primære immundefekter</i> .....	11
3.4.1 <i>T-celle defekter og kombinerede immundefekter</i> .....	11
3.4.2 <i>Immunologisk udredning</i> .....	11
3.5 <i>In vitro T-celleproliferations analyse</i> .....	12
3.5.1 <i>Isolering af mononukleære celler – Densitetsgradient centrifugering</i> .....	12
3.5.2 <i>CellTrace™ Violet</i> .....	12
3.5.3 <i>In vitro stimulation med mitogener og monoklonale antistoffer</i> .....	13
3.6 <i>Flowcytometri – Analyseprincip</i> .....	14
3.6.1 <i>Dataanalyse - Gating</i> .....	16
<b>4 Materialer og metoder</b> .....	<b>20</b>
4.1 <i>Materialer</i> .....	20
4.1.1 <i>Prøvemateriale</i> .....	20
4.1.2 <i>Kontroller</i> .....	20
4.1.3 <i>Reagenser, apparatur og utensiler</i> .....	20
4.2 <i>Metoder</i> .....	20
4.2.1 <i>Indsamling af prøvemateriale</i> .....	20
4.2.2 <i>Metodeoverblik</i> .....	21
4.2.3 <i>Coating af 96-brønds mikrotiterplade</i> .....	22
4.2.4 <i>Isolering af mononukleære celler</i> .....	22
4.2.5 <i>Farvning med Cell Trace Violet™</i> .....	24
4.2.6 <i>Klæring af 96-brønds mikrotiterplade</i> .....	25
4.2.7 <i>Test af CellTrace™ Violet farvning</i> .....	26
4.2.8 <i>Mærkning med fluorokrom-konjugerede antistoffer</i> .....	26
4.2.9 <i>Flowcytometrisk analyse</i> .....	26
4.2.10 <i>Databehandling</i> .....	27
4.2.11 <i>Histogrammer og beregning af 0,05-fraktiler</i> .....	30
4.2.12 <i>In- og eksklusionskriterier</i> .....	30
4.2.13 <i>Litteratursøgning</i> .....	30

<b>5</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>31</b>
5.1	<i>Afvielser og ekskluderede prøver</i> .....	31
5.1.1	Eksempel 1 – Gating uden singlet-gate .....	32
5.1.2	Eksempel 2 – Manglende fluorescens-mærkning af overflademarkører .....	32
5.2	<i>Histogrammer – Fordeling af resultater</i> .....	33
5.2.1	1:100 PHA .....	33
5.2.2	1:500 PHA .....	35
5.2.3	1:2 $\alpha$ -CD3 .....	37
5.2.4	1:4 $\alpha$ -CD3 .....	39
5.2.5	1:8 $\alpha$ -CD3 .....	41
5.3	<i>Beregnete 0,05-fraktiler</i> .....	43
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>44</b>
6.1	<i>Stikprøvens repræsentativitet</i> .....	44
6.2	<i>Gating</i> .....	45
6.3	<i>Metode til beskrivelse af referenceområde</i> .....	46
6.4	<i>Metodeafvielser</i> .....	46
6.4.1	Gating uden singlet-gate .....	46
6.4.2	Manglende fluorescens-mærkning af overflademarkører .....	47
6.5	<i>Analytisk variation og fejlkilder</i> .....	47
6.6	<i>Diskussion af resultater</i> .....	48
6.7	<i>Sammenligning med videnskabelige studier</i> .....	49
<b>7</b>	<b>Konklusion</b> .....	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Perspektivering</b> .....	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Referenceliste</b> .....	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>Bilagssamling</b> .....	<b>56</b>

## 1 Resumé

**Introduktion:** In vitro T-celle proliferations analyse kan indgå som led i udredningen af patienter mistænkt for primære immundefekter. Nedsat evne til at proliferere hos T-celler efter stimulation, kan være en forklaring på disse patienters sygdomstilstand.

Proliferationsevnen målt i patientprøver er på Klinisk Immunologisk Afdeling i Aalborg, hidtil blevet tolket som værende nedsat, hvis denne findes > 50% lavere end proliferationsevnen målt i 1-2 kontrolblodprøver. Da T-cellers proliferationsevne også kan variere blandt raske individer, vil patientprøver herved kunne tolkes forskelligt afhængigt af, hvilke kontrolblodprøver de sammenlignes med.

Formålet med projektet er derfor, ud fra en undersøgelse af den biologiske variation i T-cellers proliferationsevne, at beskrive referenceområder til analysen.

**Metode:** Blodprøver fra 30 plasmadonorer blev indsamlet. Herpå blev udført in vitro T-celleproliferations analyse med det fluorescerende farvestof, CellTrace™ Violet.

T-celle proliferationsevnen blev vurderet flowcytometrisk efter stimulation med fortyndinger af mitogenet PHA og anti-CD3/28 og mitogenet. Proliferationsevnen blev beskrevet som procentdelen af prolifererede celler.

Fordelingen af resultaterne blandt donorerne blev afbildet i histogrammer for hver af de anvendte fortyndinger af stimuli. Desuden blev 0,05-fraktiler beregnet, som udtryk for den værdi 95% af raske individer, forventes af have værdier over.

**Resultater:** Ud fra vores histogrammer ses generelt, at jo kraftigere cellerne er stimuleret, jo mere snævert interval fordeler resultaterne blandt donorerne sig over, og jo højere er de beregnede 0,05-fraktiler. Ved de fleste stimuli ses dog resultater fordelt over et bredt interval, hvilket indikerer en stor biologisk variation blandt raske individer.

**Konklusion:** Det konkluderes at tolkning af patientprøver ud fra de beregnede 0,05-fraktiler vil være forbundet med en vis usikkerhed pga. stikprøvens lille størrelse (n=30).

Histogrammer og 0,05-fraktiler anvendt i kombination med viden om de enkelte PID-undertyper udgør dog et mere solidt sammenligningsgrundlag, end 1-2 kontroller alene.

## 2 Introduktion

### 2.1 Baggrund

Et velfungerende immunsystem består af en række komplekse såvel cellulære som humorale processer. Pga. systemets kompleksitet er der også risiko for fejl i flere forskellige komponenter. Der findes således en stor gruppe af sygdomstilstande, som samlet er karakteriseret ved mangelfuld funktion af det normale immunsystem, såkaldte immundefekter (ID). Det kliniske billede kan her være præget af svære/recidiverende infektioner eller øget forekomst af autoimmunitet og malignitet (1,2).

ID kan overordnet inddeles i primære immundefekter (PID), som er medfødte og ofte arvelige, og sekundære immundefekter (SID), som er erhvervede, bl.a. som følge af anden sygdom eller medicinsk behandling. Hvor SID ses relativt hyppigt, er PID mere sjældne. Det anslås således at ca. 2.500 patienter har en klinisk betydende PID i Danmark. PID kan endvidere opdeles funktionelt, efter hvilken del af immunsystemet der er afficeret. Heraf er T-celle defekter og kombinerede immundefekter (CID) de mest alvorlige (3,4).

Udredning for PID bør jævnfør ”Retningslinjer for diagnostik og behandling af primær immundefekt, 2018” (5) overvejes ved tilstedeværelse af ét eller flere af en række definerede ”advarelsstegn”. Disse omfatter bl.a. kendt PID i familien, infektioner med usædvanligt forløb, eller manglende respons på antibiotisk behandling. Ved den indledende udredning vurderes, på baggrund af anamnese samt en række screenings-blodprøver, hvorvidt der er indikation for yderligere udredning for PID. Hvis dette er tilfældet, kan en række supplerende immunologiske og genetiske analyser foretages (2,5).

De immunologiske analyser foretages på de regionale kliniske Immunologiske afdelinger (KIA). På KIA, Aalborg Universitetshospital (AaUH) i Afsnit for Cellulær Immunologi (CIA) udføres f.eks. en in vitro T-celleproliferations analyse. Her vurderes T-cellers evne til at proliferere efter stimulation med mitogener eller antistoffer rettet mod T-celle receptoren (TCR), som vha. intracellulær signalering, kan igangsætte proliferation in vitro (6).

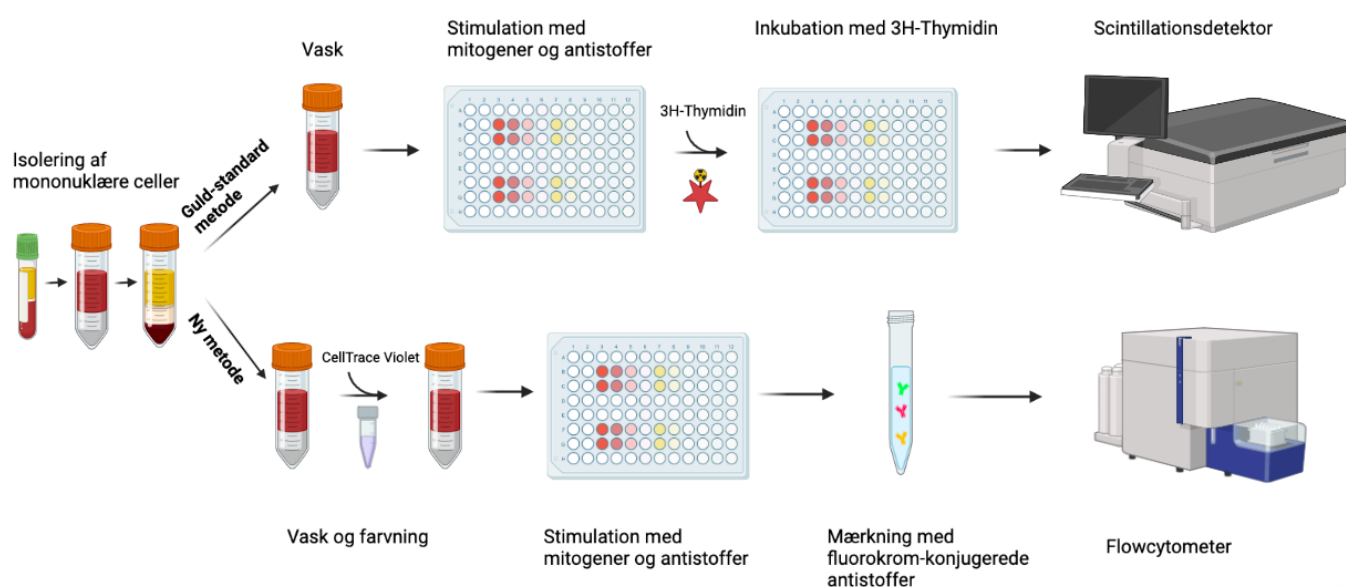
Trods analysen kun udføres ca. 6-10 gange om året på KIA, AaUH, kan den have afgørende betydning for udredning af visse PID.

Analysen spiller bl.a. en central rolle i udredning for Severe Combined Immunodeficiency (SCID). Dette er en sjælden, men alvorlig PID, hvor der ses nedsat T-celle proliferationsevne, hvilket gør patienterne modtagelige for alvorlige infektioner fra fødslen. Tilstanden kan behandles med allogen stamcelletransplantation eller genterapi, men tidlig diagnostik og behandling er afgørende, idet børn med ubehandlet SCID vil dø indenfor de første leveår (3,5,7). Trods tilstanden kun rammer ca. 1-2 børn årligt i Danmark (8), har analysen derfor stor klinisk relevans for disse patienter. Dette understreges af, at screening for SCID i februar 2020 blev implementeret som en del af den nationale screening af nyfødte ifm. hælblodprøven (9).

Skønt genetiske analyser, herunder helgenomsekventering, formentlig vil komme til at spille en stadig større rolle i udredningen af PID, vil in vitro cellulære analyser forsat være helt

uundværlige. Dels fordi genetiske analyser er mere tidskrævende, og dels som supplement til at vurdere den kliniske relevans af de fundne mutationer (5).

Til T-celle proliferations analyse benytter CIA, AaUH, på nuværende tidspunkt guldstandard-metoden, som er baseret på inkorporering af radioaktivt mærket thymidin (3H-Thymidin) i de prolifererende cellers DNA. Intensiteten af beta-stråling fra cellerne målt med scintillationstæller, er herved indirekte mål for proliferationsevnen, idet signalet vil øges i takt med antal celledelinger (10,11). Afdelingen har imidlertid et ønske om at udskifte denne metode, til en metode baseret på farvning af T-cellerne med det fluorescerende farvestof, CellTrace™ Violet (CTV) fra Invitrogen, og efterfølgende flowcytometrisk kvantificering af proliferationsevnen (Figur 1) (6).



Figur 1: Oversigt over guldstandard-metode (øverst) samt ny metode (nederst) til T-celle proliferations analyse. Ved guldstandard-metoden inkuberes stimulerede celler med 3H-Thymidin, som indbygges i DNA ved proliferation. Intensiteten af beta-stråling fra cellerne målt med scintillationsdetektor er indirekte mål for proliferationsevnen. Ved den nye metode farves cellerne med CellTrace Violet forud for stimulation. Mærkning med fluorokrom-konjugerede antistoffer muliggør flowcytometrisk vurdering af proliferationsevnen (6,10,11)\*.

Ønsket om skift af metode kommer, idet den nye metode rummer en række fordele sammenlignet med den nuværende. Først og fremmest undgås brugen af sundhedsskadelig radioaktivitet. Dernæst gør anvendelse af flowcytometri det muligt at skelne mellem, og dermed vurdere proliferationsevnen af specifikke celle-subpopulationer.

Derudover kan analysen udføres på kortere tid, og kan tilrettelægges, så personalet undgår at møde ind udenfor normal arbejdstid. Dertil kommer at afdelingens scintillationstæller kan spares væk, da den kun benyttes til denne ene analyse. Dette rummer i sig selv flere fordele, eftersom den 1) Er dyr i service ift. hvor sjældent den benyttes, 2) Er et gammelt apparatur, hvortil det er svært at skaffe reservedele og 3) kræver mere plads, end der er tilgængelig efter den forestående overflytning til Nyt Aalborg Universitetshospital. Personalet i CIA har



desuden mere erfaring med flowcytometri, da dette i forvejen benyttes til en række andre analyser (10,12).

Ved den nuværende metode tolkes proliferationsevnen som værende nedsat, hvis den er 50% mindre end gennemsnittet af 2 kontrolblodprøver udtaget fra udvalgt personale (11). Da der forekommer både intra- og interindividuel biologisk variation i T-cellers proliferationsevne, risikeres det, at de benyttede kontroller ikke er repræsentative for den raske baggrundsbefolkning. Dermed vil patientprøverne kunne tolkes forskelligt, afhængigt af hvornår kontrolblodprøven tages, og hvilken kontrolperson der benyttes (11,13,14). Den mest ideelle løsning på dette vil være at inkludere flere kontrolblodprøver pr. analyseopsæt. Dette eftersom den analytiske variation mellem målte værdier for patienter og kontroller herved vil være minimal, idet de analyseres i samme serie. Dette er dog af praktiske og økonomiske årsager ikke muligt.

Formålet med dette professionsbachelorprojekt er derfor at undersøge den biologiske variation i T-cellers proliferationsevne hos raske individer, og herudfra beskrive et referenceområde. Sammen med de 1-2 kontroller, forventes dette at kunne bidrage til mere entydig tolkning af patientprøver ved in vitro T-celle proliferations analyse med CTV på KIA, AaUH. Dette leder frem til følgende problemformulering.

## 2.2 Problemformulering

Hvorledes kan undersøgelse af den biologiske variation i T-cellers proliferationsevne anvendes til at beskrive et referenceområde for in vitro T-celleproliferations analyse med CellTrace™ Violet?

## 2.3 Målformulering

Problemformuleringen besvares ved at:

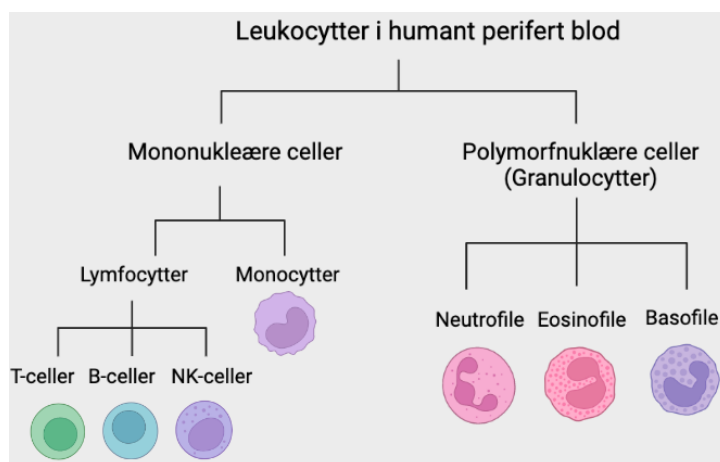
1. Indsamle prøvemateriale fra 30 plasmadonorer (2x9 mL fuldbold i Lithium Heparin glas).
2. Udføre in vitro T-celle proliferations analyse på de indsamlede blodprøver, herunder:
  - a. Isolere mononukleære celler fra perifert fuldblod (PBMC) ved densitetsgradient centrifugering.
  - b. Farve PBMC med CellTrace™ Violet.
  - c. Stimulere PBMC med fortyndinger af anti-CD3/CD28 og mitogenet, PHA.
  - d. Mærke PBMC med fluorokrom-konjugeret CD3/CD4/CD8/CD45 multi-antistof.
  - e. Udføre flowcytometrisk analyse vha. Novocyte flowcytometer og herigennem indsamle data om procentdelen af prolifererede T-celler.
3. Beskrive fordelingen af T-cellers proliferationsevne hos de inkluderede donorer i form af histogrammer for hver stimuli-fortynding og celletype.
4. Beregne 0,05-fraktiler, som udtryk for hvilke værdier 95% af raske individer forventes at ligge over.

## 3 Teori

### 3.1 Leukocytter

Leukocytter i humant perifert blod kan kategoriseres som værende enten mononukleære (PBMC) eller polymorfnukleære (PMN) afhængigt af kerneantal. PMN'er er desuden karakteriseret ved tilstedeværelse af granula, og inddeles yderligere i neutrofile, eosinofile og basofile granulocytter.

PBMC'er kendetegnes ved at have en enkelt rund kerne, og udgøres primært af lymfocytter (70-90%) og monocytter (10-30%). Lymfocytter indbefatter T- og B-celler, som tilhører det adaptive, specifikke immunsystem, og NK-celler fra det innate, uspecifikke immunsystem. Monocytter tilhører ligeledes det innate immunsystem (*Figur 2*) (15,16).



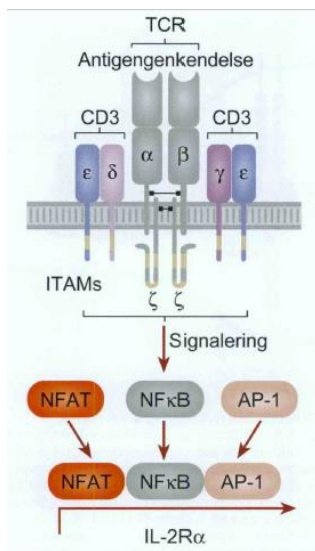
*Figur 2: Klassificering af leukocytter i humant perifert blod (15,16)\*.*

### 3.2 T-celler

T-celler er kendetegnet ved deres evne til specifikt at genkende og angribe fremmede patogener. T-celler kan inddeles i to undertyper, CD4 T-celler (T-hjælperceller) og CD8 T-celler (cytotoksiske T-celler). Hvor CD8 T-cellers effektor-funktion er at inducere apoptose af inficerede celler, er CD4 T-celler bl.a. essentielle for aktivering af CD8 T-celler og B-celler. Før T-cellerne kan udøve deres effektor-funktioner, skal de primers i de sekundære lymfoide væv (17,18).

### 3.3 Priming af T-celler

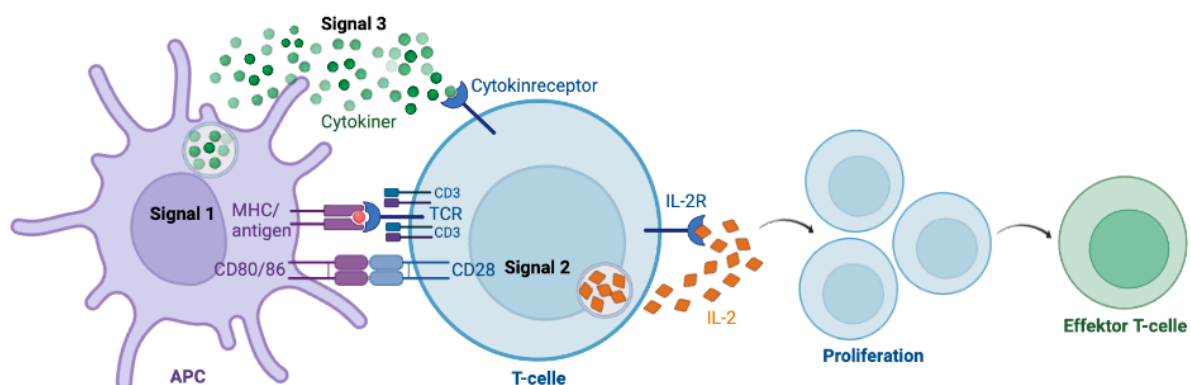
Priming af T-celler består overordnet af 3 forskellige aktiverende signaler. **Signal 1** udløses ved binding mellem TCR og antigen præsenteret i MHC-molekyler udtrykt på antigenpræsenterende celler (APC). TCR består af et signalkompleks, hvori proteinet CD3 og selvstændige  $\zeta$ -kæder indgår. På de cytoplasmatiske dele af disse komplekser findes tyrosiner betegnet ITAMs. Ved aktivering af TCR fosforyleres ITAMs, hvorved der sættes gang i en intracellulær signalvej, som resulterer i aktivering af transskriptionsfaktorerne NFAT, NFkB og AP-1. Disse er nødvendige for, at interleukin-2 receptoren (IL-2R) på T-celler, får høj affinitet for interleukin-2 (IL-2) (*Figur 3*) (17,18).



Figur 3: Signalering gennem T-celle-receptor. Komplekser af tyrosiner, betegnet ITAMs, fosforyleres og sender signal til transkriptionsfaktorerne NFAT, NFκB og AP-1. Dette fører til påsættelse af en α-kæde på interleukin-2 receptoren, hvorved den får høj affinitet for IL-2 (17,18).

**Signal 2** inducerer til proliferation, og dermed klonal ekspansion af specifikke T-celler. Signalet leveres ved binding mellem co-receptoren CD28, udtrykt på T-celler, og co-stimulatoriske ligander, f.eks. CD80 og CD86, udtrykt på aktiverede APC'er. Dette fører til produktion af IL-2 fra T-cellen, som ved binding til IL-2R med høj affinitet, driver T-celle proliferation. CD4 T-celler producerer store mængder IL-2, og kan derfor drive sin egen proliferation. Modsat producerer CD8 T-celler en begrænset mængde, og er derfor afhængig af hjælp fra CD4 T-celler.

Før T-cellerne kan udøve deres funktion kræves også **signal 3**, hvor de prolifererede T-celler uddifferentieres til effektor-celler. Under proliferation udskiller APC cytokiner, som binder til cytokinreceptorer på overfladen af T-celler. Afhængigt af cytokinmiljøet, dannes forskellige T-celle subtyper, med hver deres specifikke funktion (Figur 4) (17,18).



Figur 4: Priming af T-celler består af 3 forskellige aktiverende signaler. **Signal 1** udløses ved binding mellem T-celle-receptor (TCR) og antigen præsenteret i MHC på antigenpræsenterende celler (APC). Herved skabes en interleukin-2-receptor (IL-2R) med høj affinitet. **Signal 2** udløses ved binding mellem CD80/86 og CD28. Dette medfører produktion af IL-2 som ved binding til IL-2R medfører T-celle proliferation. Ved proliferation udskiller APC cytokiner, som ved binding til cytokinreceptorer på T-cellen igangsætter **signal 3**, hvor T-cellerne uddifferentieres til effektor-celler (17,18)\*.

### 3.4 Primære immundefekter

Primære immundefekter (PID) dækker over en heterogen gruppe af, typisk arvelige, tilstande karakteriseret ved mangelfuld funktion af komponenter i enten det innate eller adaptive immunsystem.

De fleste patienter med PID debuterer med symptomer og diagnosticeres i barnealderen, nogle dog først senere i livet. Det kliniske billede ved PID varierer afhængigt af, hvilken del af immunsystemet der er afficeret, men er generelt præget af øget infektionstendens og/eller øget forekomst af autoimmunitet og malignitet (2,19).

#### 3.4.1 T-celle defekter og kombinerede immundefekter

T-celle defekter udgør de mest alvorlige undertyper af PID, idet T-celler ikke alene er ansvarlige for det adaptive cellulære immunrespons, men også er nødvendige for B-celleaktivering. Derfor fører de fleste T-celle defekter også til såkaldte, *kombinerede immundefekter* (CID). Den sværeste form for CID, såkaldt SCID, er karakteriseret ved fravær af T-celle- samt evt. B- og/eller NK-cellefunktion. Denne tilstand er, med en incidens på 1:55.000 nyfødte i Danmark sjælden, men meget alvorlig (5).

Patienter med SCID præsenterer sig med alvorlige svampe- og virusinfektioner, kronisk diarré og generel mistrivsel indenfor de første levemåneder.

I ca. 50-60% af tilfældene af SCID er den bagvedliggende årsag en defekt i den fælles  $\gamma$ -kæde for en lang række interleukin-receptorer, bl.a. IL-2R, som er essentiel for celleproliferation. Tilstanden nedarves X-bundet, recessivt og er desuden karakteriseret ved fravær af modne T og NK-celler, men tilstedeværelse af B-celler. Uden behandling med allogen stamcelletransplantation er tilstanden livstruende, hvorfor tidlig diagnostik og behandling spiller en afgørende rolle for prognosen (5,19).

Andre mindre alvorlige former for CID, er ikke nødvendigvis forbundet med tidlig mortalitet, men kan, afhængigt af undertypen, komme til udtryk ved gentagne opportunistiske infektioner, autoimmunitet, allergier eller malignitet i løbet af barndommen.

Omend skellet mellem SCID og CID ikke er klart defineret, er CID, i modsætning til SCID, typisk associeret med et normalt eller kun let nedsat *antal* T-celler. Funktionen af T-cellerne er derimod ofte mangelfuld. Eksempler herpå er CD3-defekter, som er relateret til reduceret ekspresion af CD3-TCR komplekser på T-celler, og RelB-defekter, som medfører mangel på NF $\kappa$ B-transkriptionsfaktoren, RelB. Begge tilfælde medfører nedsat T-celle proliferationsevne (19–22).

#### 3.4.2 Immunologisk udredning

Diagnostik af PID kan være udfordrende, idet der er tale om sjældne tilstande, og det kliniske billede kan variere betydeligt i hvert enkelt tilfælde. Ved mistanke om PID, kan en række forskellige immunologiske og genetiske analyser dog i samspil bidrage til at pege i retningen af en diagnose.

Immunologiske analyser ifm. udredning for CID og SCID omfatter bl.a.

lymfocyt-fænotypering, hvor der foretages en kvantitativ undersøgelse af patientens lymfocyt-undertyper (T, B og NK-celler) og in vitro T-celle proliferationsanalyse, hvor T-cellernes evne til at proliferere undersøges (7,12).

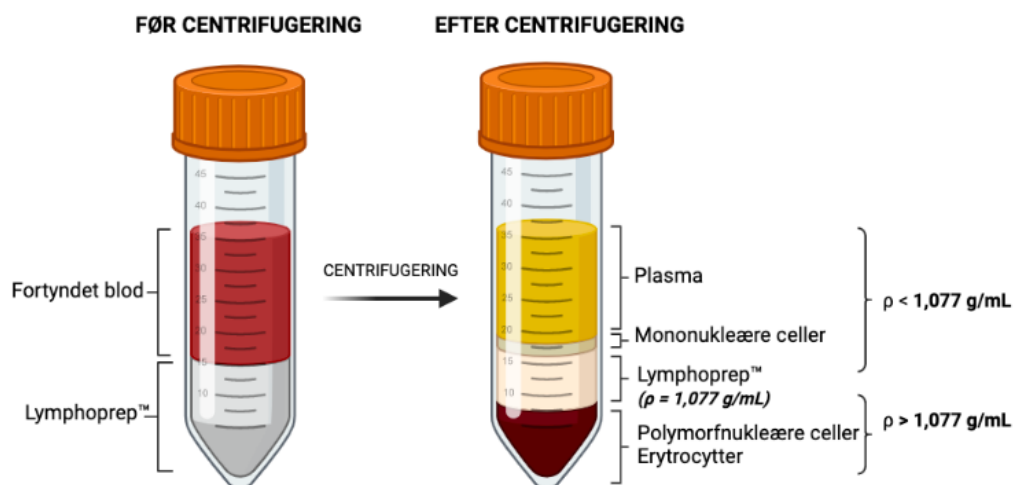
### 3.5 In vitro T-celleproliferations analyse

En metode til undersøgelse af T-cellers proliferationsevne in vitro indebærer farvning af isolerede PBMC'er med CTV og efterfølgende stimulation med f.eks. mitogener eller antistoffer. Proliferationsevnen kan herefter vurderes flowcytometrisk ved mærkning af celler med fluorokrom-konjugerede monoklonale antistoffer (6,23).

I det følgende vil teori relateret til metodens deltrin blive gennemgået.

#### 3.5.1 Isolering af mononukleære celler – Densitetsgradient centrifugering

PBMC'er kan isoleres fra en fuldblodsprøve vha. densitetsgradient centrifugering, hvor blodprøven centrifugeres med et medium med en specifik densitet ( $\rho$ ), f.eks. Lymphoprep™ ( $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$ ). Herved separeres blodceller baseret på deres densitet relativt til mediets. PNM'er og erythrocytter ( $\rho > 1,077 \text{ g/mL}$ ) vil sedimentere under mediet og udgøre pellet. PBMC'er ( $\rho < 1,077 \text{ g/mL}$ ) vil lagres i en skive umiddelbart over mediet, men under plasma, hvorfra de kan høstes (Figur 5) (24,25).



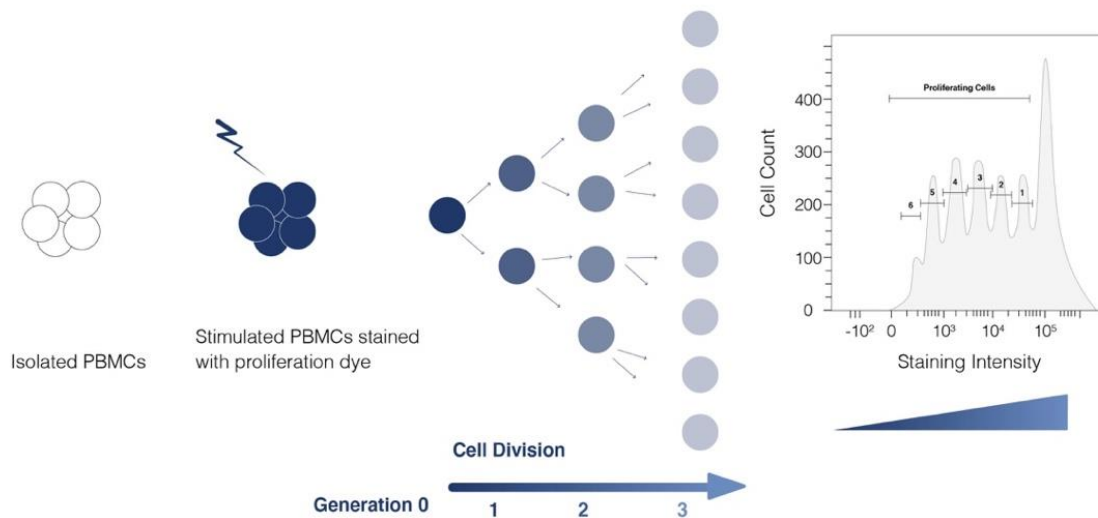
Figur 5: Isolering af mononukleære celler vha. densitetsgradient-mediet Lymphoprep™ (24,25)\*.

#### 3.5.2 CellTrace™ Violet

CTV er et fluorescerende farvestof, som kan anvendes til celleproliferations analyser. Farvestoffet binder kovalent til alle frie aminer såvel intra- som ekstracellulært. Ved hver celledeling fordeles mængden af CTV ligeligt mellem dattercellerne. Hver generation af celler vil dermed have en lavere fluorescensintensitet end den forrige.

De enkelte generationer af celler kan, ved flowcytometrisk analyse, skelnes som separate peaks i et histogram med CTV-intensitet som funktion af antal detekterede celler. Ikke prolifererede celler (generation 0) vil findes i peaket længst til højre på x-aksen, idet disse har den højeste CTV-intensitet. Jo længere mod venstre peaks er på x-aksen, jo lavere

fluorescensintensitet har cellerne, og jo nyere er generationen. Proliferationsevnen kan således vurderes ud fra procentdelen af detekterede celler, som ikke befinder sig i generation 0 (Figur 6) (23,26).



Figur 6: Ved farvning af stimulerede mononukleære celler (PBMCs) med det fluorescerende farvestof CellTrace Violet (CTV), bliver CTV-intensiteten svagere for hver celledeling. Efter flowcytometrisk analyse, kan proliferation af celler illustreres i et histogram med fluorescensintensitet ad x-aksen og antal detekterede celler ad y-aksen. Hvert peak indikerer en generation af celler (23,26)

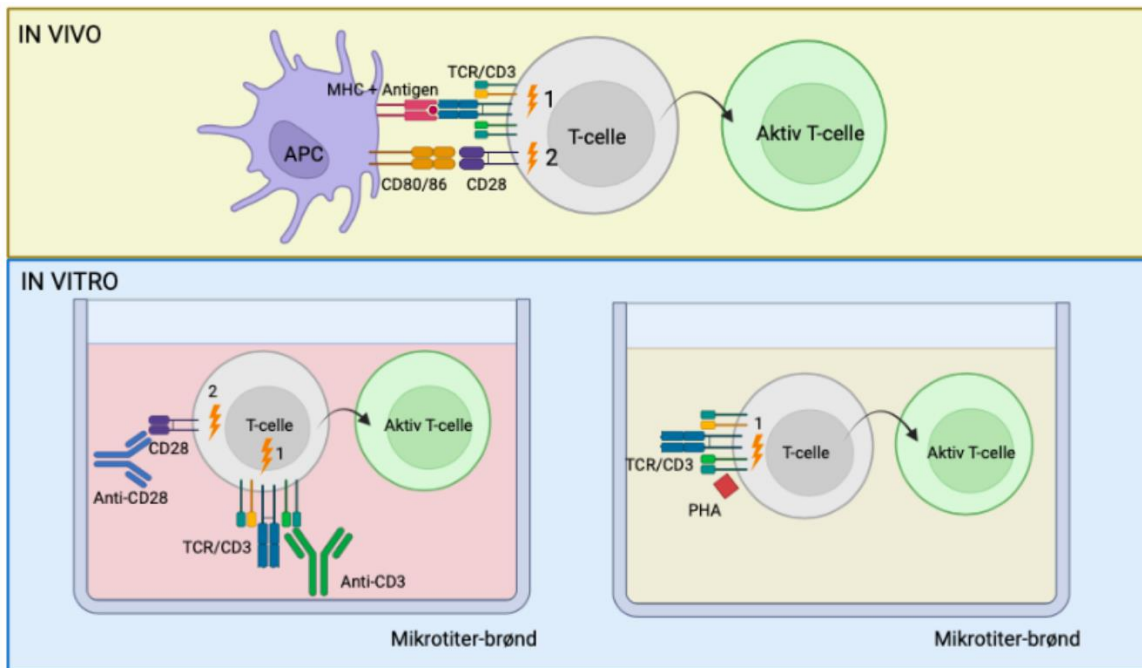
### 3.5.3 In vitro stimulation med mitogener og monoklonale antistoffer

For at vurdere T-cellers proliferationsevne kræves in vitro stimulation. Dette kan f.eks. ske vha. mitogener eller antistoffer rettet mod CD3 og CD28.

Mitogener er planteekstrakter (lektiner), som kan bringe lymfocytter i mitose ved polyklonal stimulation in vitro. Et ofte anvendt mitogen til stimulation af T-celler er Phytohæmagglutinin (PHA) (10,18,27). PHA binder til kulhydrat-dele af TCR og CD3. Herved igangsættes en intracellulær signalering, som fører til T-celle proliferation. Eftersom de kulhydrat-dele, PHA binder sig til, er konstante for næsten alle T-celler, muliggøres proliferation uafhængigt af antigenspecificitet, hvorfor der opnås et kraftigt signal.

$\alpha$ -CD3 bindes til CD3-komplekset af TCR, og efterligner dermed binding til MHC (signal 1) i in vivo T-celle aktivering, dog, ligesom ved PHA, uden behov for tilstedeværelse af et specifikt antigen. For at sikre vedvarende proliferation er tilførsel af det co-stimulatoriske signal 2 også nødvendigt. For at levere dette signal, ved fravær af APC, må T-cellerne samtidig stimuleres med  $\alpha$ -CD28, som binder til T-cellernes CD28 co-receptor, og dermed efterligner funktionen af de co-stimulatoriske ligander CD80 og 86.

Ved antistof-stimulation in vitro bør mindst ét af antistofferne være bundet til en fast overflade. Herved øges sandsynligheden for samtidig binding mellem begge receptorer på T-cellen og deres tilsvarende antistoffer, hvilket er nødvendigt for et tilstrækkeligt proliferativt signal (Figur 7) (18,27).



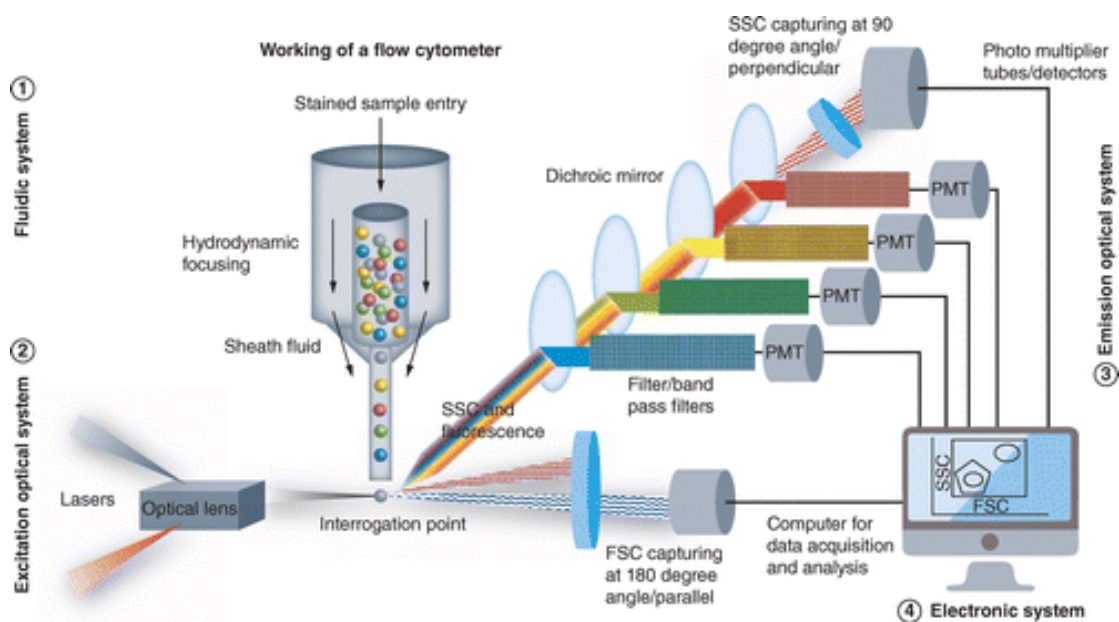
Figur 7: Når T-celler aktiveres in vivo indebærer det præsentation af antigen i MHC på antigenpræsenterende celler (signal 1) samt et costimulatorisk signal (2). T-celle-aktivering in vitro kan enten ske ved efterligning af signal 1 og 2 med hhv.  $\alpha$ -CD3 og  $\alpha$ -CD28-antistoffer eller vha. mitogenet PHA (10,18,27)\*.

### 3.6 Flowcytometri – Analyseprincip

Flowcytometri er en metode som tillader simultan måling og analysering af multiple parametre ved partikler (celler) i flydende suspensioner, når disse passerer en laser. Det overordnede analyseprincip baserer sig på dels måling af cellers *lysspredning (scatter)*, og dels måling af *fluorescens-emission*. Lysspredning giver information om størrelse og granularitet. Fluorescens-emission tillader adskillelse af celler baseret på overflademærke-ekspression, såfremt disse forud for analysen er mærket med fluorokrom-konjugerede monoklonale antistoffer (28).

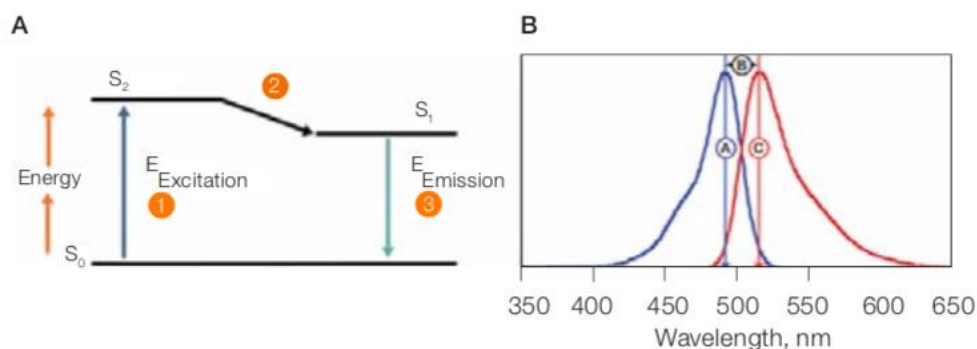
Et flowcytometer er opbygget af 3 overordnede systemer: Et væskesystem, et optisk system og et elektronisk system (Figur 8). Væskesystemet består af en flowcelle samt en omgivende sheatvæske. Når reagensvæsken med celleprøven injiceres i flowcellen, bliver den pga. forskellige væsketryk, hydrodynamisk fokuseret, dvs. der skabes en væskestrøm af enkeltvise celler centralt i flowcellen.

Cellerne bevæger sig derefter videre til det optiske system, som kan inddeles i et excitation- og emissions-system. Excitationssystemet består af en række lasere, som udsender lys med forskellige bølgelængder. Hvilke lasere afhænger af det enkelte flowcytometer, men typisk er en violet (405 nm), blå (488 nm) og rød (640 nm) laser inkluderet. Når en celle passerer en laser, spreder den lyset i forskellige retninger. Lys som kun afbøjes lidt ift. laserstrålens akse, har en intensitet tilnærmelsesvis proportional med cellediameteren. Denne parameter kaldes "Forward Scatter" (FSC). Intensiteten af lys som udsendes vinkelret ift. laserstrålens akse er relateret til cellens indhold af granula og kaldes "Side Scatter" (SSC) (29,30).



Figur 8: Overblik over et flowcytometers forskellige systemer. En celleprøve injiceres i væskesystemet (1), hvorefter der vha. hydrodynamisk fokusering dannes en strøm af enkeltvise celler. Når cellerne interagerer med en laser, spredes lyset og fluorokrom-konjugerede antistoffer exciteres (2). Det spredte lys detekteres hhv. parallelt (FSC) og vinkelret (SSC) med laserens akse. Fluorescens-signalerne detekteres af photomultiplier tubes (PMT'er) placeret bag optiske filtre og spejle, som tillader lys med bestemte bølgelængder at passere (3). I det elektroniske system (4) behandles data de detekterede signaler og præsenteres grafisk på en computer (29).

Det udsendte laserlys kan ligeledes excitere fluorokrom-konjugerede monoklonale antistoffer. Herved bringes en elektron i en højere energitilstand og kort tid efter emitteres lys med en længere bølgelængde (lavere energi), og dermed anden farve. Hvert fluorokrom har et excitationsspektrum, bestående af de bølgelængder, som fluorokromet kan exciteres af, samt et emissionsspektrum, indeholdende de bølgelængder, fluorokromet emitterer lys med. Fluorokromerne exciteres bedst ved deres excitationsspektrums maksimum og intensiteten af det emitterede er størst ved emissionsspektrums maksimum (Figur 9) (30).



Figur 9: Princip i fluorescens.

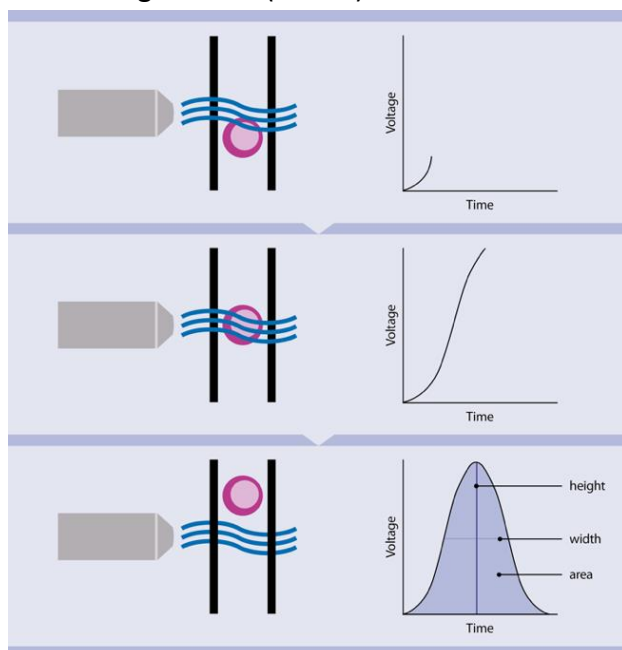
A: Ved belysning af et fluorokrom med en laser, bringes en elektron i et exciteret energistadie,  $S_2$  (1). Derefter falder elektronen til et lavere og mere stabilt stadie,  $S_1$ , idet lidt energi frigøres som varme (2). Dette kaldes "Stokes shift". Den resterende energi frigøres efterfølgende som fluorescens (emission), idet elektronen falder tilbage til sit grundstadie,  $S_0$ .

B: Et fluorokrom har et excitationsspektrum sv.t. den bølgelængde, hvorved det absorberer maksimal energi (A). Pga. Stokes shift (B) vil den maksimale emissionsbølgelængde (C) være lidt længere (lavere energi), og dermed have en anden farve end excitationsspektrumsbølgelængden (30).



Emissionssystemet udgøres af en række optiske filtre og spejle, som tillader emitteret lys med bestemte bølgelængder, at passere til den bagvedliggende detektor. Dette gør det muligt at detektere emitterede lyssignaler fra flere forskellige fluorokromer samtidigt (Figur 8) (30).

Til detektion af de genererede lyssignaler anvendes typisk photodioder eller photomultiplier tubes (PMT). Hver gang en celle passerer en laser, genereres elektroniske signaler heri. Signalet begynder når en celle entrerer laseren, og stiger derefter gradvist indtil cellen befinder sig centralt i laseren. Efterhånden som cellen forlader laseren, falder signalet igen. Dette såkaldte "evnet", kan illustreres ved en kurve i et plot med signalstyrrelse som funktion af tid (Figur 10). Kurvens bredde afgøres af tiden cellen befinder sig i laseren, højden afhænger af den målte lysintensitet, og arealet er integralet af kurvens højde og bredde. Kurvens højde, areal og bredde måles vha. det elektroniske system. Disse data overføres til en computer, som laver en grafisk præsentation af data f.eks. vha. dot-plots eller histogrammer (29–31).



Figur 10: Signalgenerering i det elektroniske system. Signalet begynder, når cellen entrerer laseren. Det maksimale signal genereres, når cellen befinder sig centralt i laseren, derefter falder signalet igen. Kurvens højde, bredde og areal udnyttes i det elektroniske system (29–31).

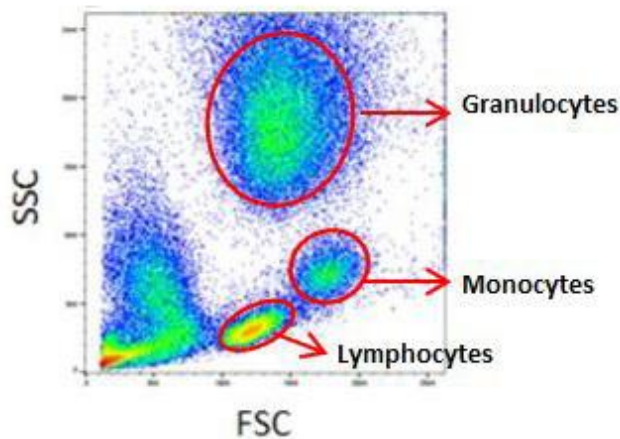
### 3.6.1 Dataanalyse - Gating

Flowcytometrisk dataanalyse indebærer placering af gates omkring cellepopulationer med fælles karakteristika baseret på FSC, SSC eller overflademærker-ekspression. Herved kan relevante celle-populationer undersøges enkeltvis (30).

Til gating benyttes f.eks. dot-plots, hvor hver enkelt detekteret celle (event) illustreres med et punkt placeret i et plot med to forskellige akseparametre, f.eks. FSC og SSC eller overflademærker-ekspression.

FSC. vs. SSC-plots tillader differentiering mellem hhv. granulocytter, monocytter,

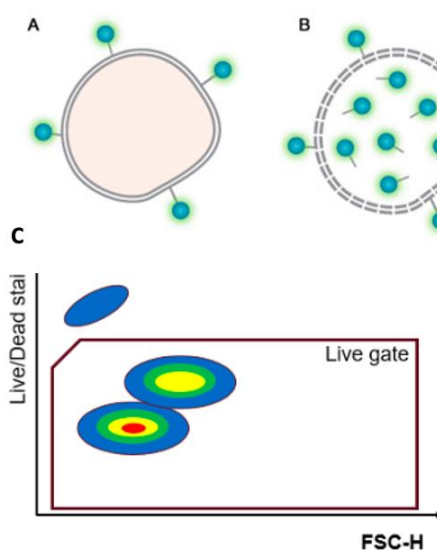
lymfocytter, idet disse varierer ift. størrelse og granularitet, samt cellulært debris (Figur 11). Ved at placere en gate omkring den for analysen interessante cellepopulation, sorteres celler uden relevans for analysen fra, mens de interessante celler efterfølgende kan analyseres sekventielt ud fra en række andre akseparametre (30).



Figur 11: Flowcytometrisk adskillelse af cellyper baseret på FSC og SSC-parametre. De blå/grønne/gule/røde hot-spots i hver cellepopulation indikerer et stigende antal events (30).

### 3.6.1.1 Viabilitets-farvestof

Døde celler har en øget uspecifik antistof-binding samt et højt niveau af autofluorescens. Derfor kan disse med fordel ekskluderes fra videre analyse. Dette kan ske, ved at farve cellerne med et proteinbindende viabilitets-farvestof, f.eks. LIVE/DEAD™ Fixable Far-Red (L/D). Dette binder til frie aminer på celleoverfladen. Såfremt cellemembranen er ødelagt, vil farvestoffet også farve intracellulære aminer. Døde celler vil således have en højere fluorescensintensitet end levende, hvilket gør det muligt at gate døde celler væk i et plot med FSC vs. L/D-intensitet (Figur 12) (30,32).



Figur 12:

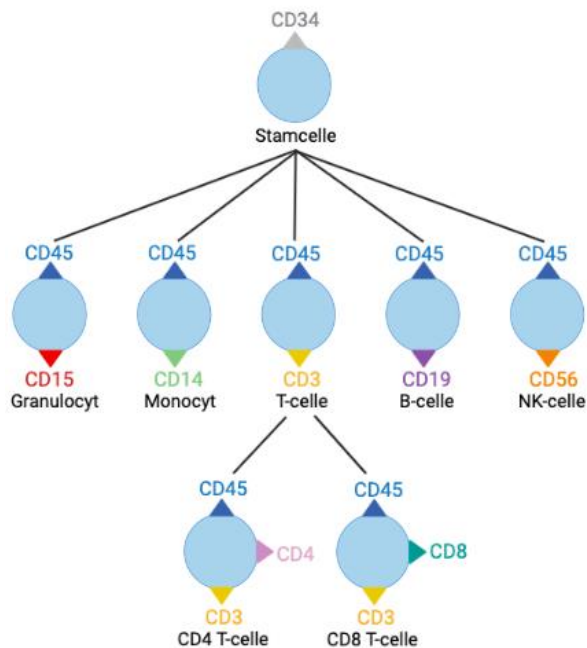
Princip i farvning med viabilitets-farvestof.

Levende celler (A) vil kun have en lav intensitet af farvestoffet, da kun frie aminer på cellemembranen farves. Døde celler (B) vil derimod have en ødelagt cellemembran, hvorfor også intracellulære aminer farves. Dermed vil de have en større fluorescensintensitet

På et dot-plot med FSC ad x-aksen og fluorescensintensitet ad y-akse, vil døde celler ligge i en population højere på y-aksen end de levende celler (32) (C\*).

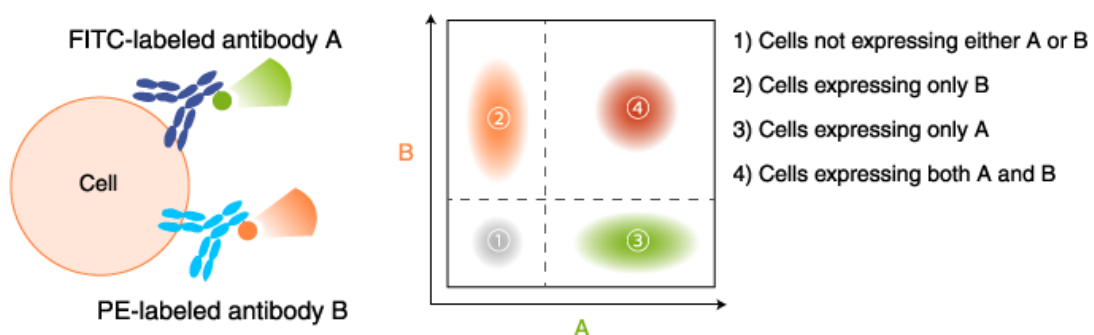
### 3.6.1.2 Cluster of differentiation-overflademærker

Andre akse-parametre som typisk anvendes til gating inkluderer cellernes ekspression af forskellige "Cluster of differentiation" (CD)-overflademærker, idet hver celle-undertype udtrykker en unik kombination heraf. F.eks. udtrykkes CD45 på alle leukocytter, CD3 på modne T-celler og CD4 og CD8 på hhv. T-hjælper celler og cytotoxiske T-celler (Figur 13) (10).



Figur 13: Overblik over leukocytters udtryk af CD-overflademærker (10)\*.

For at kunne gate på baggrund af CD-mærker, skal de forud for analysen mærkes med forskellige monoklonale fluorokrom-konjugerede antistoffer. Fluorescensintensiteten målt ved et givet fluorokroms maksimale emissions-bølgelængde, bliver herved indirekte mål for ekspressionen af den CD-overflademærker, som det fluorokrom-konjugerede antistof er rettet mod (Figur 14) (30,33).



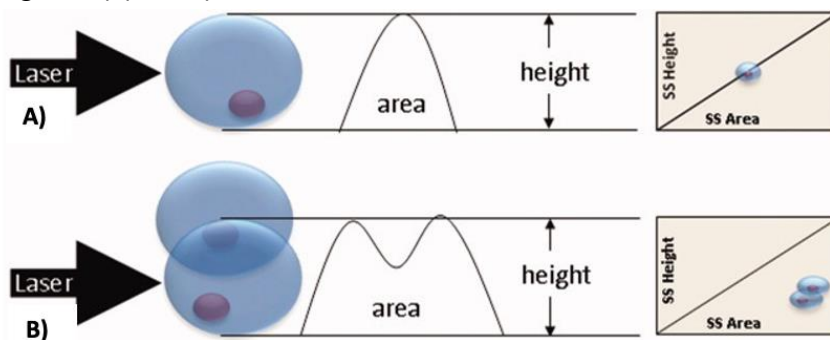
Figur 14: Cellen er mærket med monoklonale antistoffer rettet mod hver sin overflademærker, A og B. Antistofferne er konjugeret med hvert sit fluorokromer, hhv. FITC og PE. Cellens placering i et dotplot med fluorescensintensitet af de to fluorokromer på hver sin akse, afhænger af hvilke markører cellen udtrykker (30,33).

### 3.6.1.3 Autofluorescens

Når fluorescens-intensitet anvendes som akseparametre, vil der også kunne detekteres celler, som ikke er mærket med fluorokrom-konjugerede antistoffer. Dette skyldes, at celler har en større eller mindre grad af naturligt forekommende fluorescens, såkaldt autofluorescens. Den cellulære autofluorescens stammer bl.a. fra mitokondrier, lysosomer og cellulære organeller. Derfor vil store celler med granula typisk udsende mere autofluorescens end små celler uden granula (30).

### 3.6.1.4 Dublet-diskrimination

Hvis to celler passerer laseren umiddelbart efter hinanden, kan flowcytometeret fejlagtigt tolke dem som ét event. Dubletter kan dog ekskluderes ved gating. Eftersom dubletter tager længere tid om at passere laseren end enkelte celler (singletter), vil bredden, og dermed også arealet, af det signal der genereres ved detektion af en dublet også være større end ved singletter. Højden vil være nogenlunde den samme. På et dot-plot med FSC areal (FSC – A) som funktion af FSC højde (FSC-H), vil singletter være placeret i en diagonal linje i plottet, hvorimod dubletter vil placeres længere til højre herfor sv.t. et større areal relativt til højden (Figur 15) (30,34).



Figur 15: Signalet ved detektion af dubletter (B) har et større areal relativt til højde end ved singletter (A). Dette kan udnyttes til at eksklusion af dubletter under gating (30,34).

## 4 Materialer og metoder

I følgende afsnit fremgår materialer og metoder anvendt til udførelse af vores laboratorieforsøg. Metoden baserer sig på fremgangsmåden anført i CIA's midlertidige forskrift til flowcytometrisk in vitro T-celle proliferations analyse (*Bilag 2*). Forskriften er udarbejdet af personale i CIA på baggrund af videnskabelige artikler, inspiration fra KIA Aarhus Universitetshospital og Rigshospitalet samt klinisk afprøvning og optimering i eget laboratorie.

### 4.1 Materialer

#### 4.1.1 Prøvemateriale

Som prøvemateriale blev anvendt blodprøver fra i alt 30 plasmadonorer indsamlet i Blodbanken, Aalborg. Der blev udtaget 2x9 mL fuldblod i Lithium-Heparin glas pr. donor.

#### 4.1.2 Kontroller

I forskriften står anført, at der bør medtages 1 kontrol-blodprøve pr. analyse-opsæt. Eftersom opfyldelse af formålet med dette projekt er angivelse af et referenceområde, blev der udelukkende analyseret på prøvemateriale fra raske plasmadonorer. Derfor blev medtagelse af kontrol-blodprøver ikke prioriteret.

I hvert opsæt indgik dog en ustimuleret prøve, som blev anvendt som negativ kontrol.

#### 4.1.3 Reagenser, apparatur og utensilier

Et skema over anvendte reagenser, lot-numre, udløbsdato samt. evt. faremærkning og faresætninger fremgår af *Bilag 3*.

Flere af de anvendte reagenser fremstillede vi selv efter anvisningerne i *Tablet 1*.

Reagens	Indhold
Vaskemedie	RPMI 1640 + 1% antibiotika + 15 IE/ml Heparin
Medium IV	RPMI 1640 + 1% antibiotika + 10% FCS+V
FMB buffer	400 mL PBS, 4 mL Na-azid og 0,4 g Bovine Serum Albumin
Sheath fluid	2,7 ml. 37% formaldehyd pr. 200 mL FACSFlow

*Tablet 1 – Fremstillede reagenser*

*\*OBS! Giftigt reagens*

Af *Bilag 3* fremgår desuden en liste med apparatur og utensilier.

### 4.2 Metoder

#### 4.2.1 Indsamling af prøvemateriale

Prøvemateriale til analysen blev indsamlet i perioden 29/3 - 22/4 2022. Der blev indsamlet 2 blodprøver pr. donor, dvs. i alt 60 blodprøver fra 30 donorer.

Blodprøvernes holdbarhed er 24 timer ved stuetemperatur (6), men de blev anvendt til analyse umiddelbart efter prøvetagning.

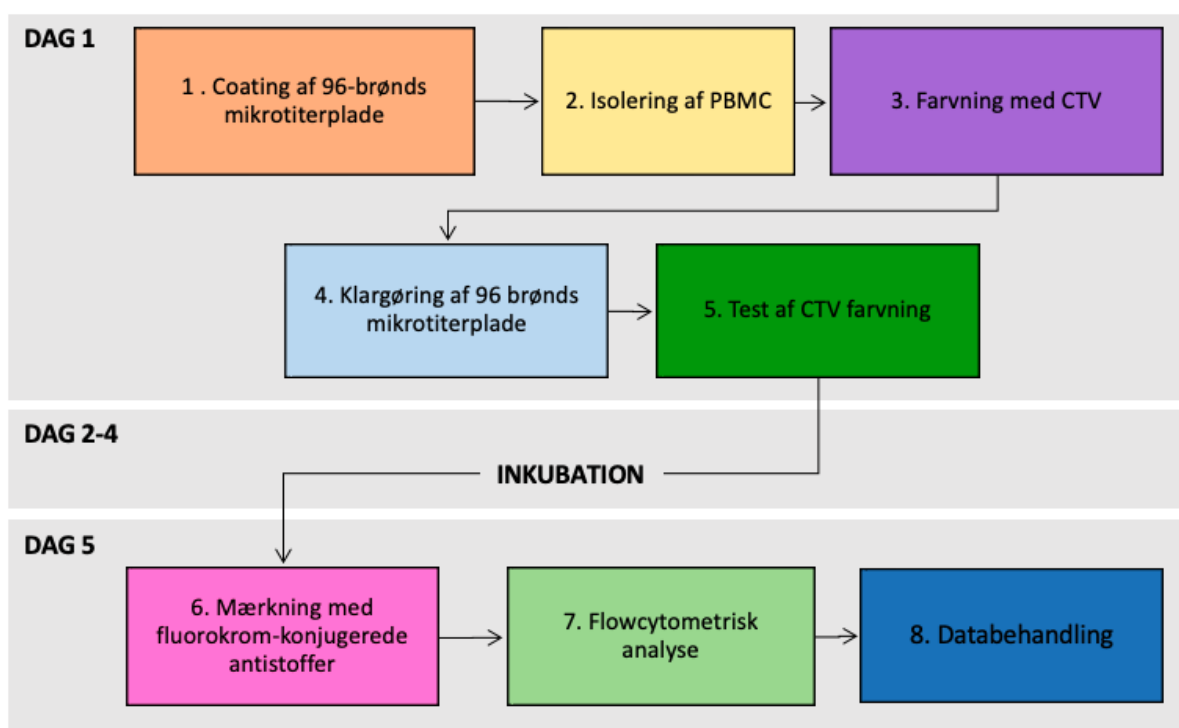
#### 4.2.1.1 Etik

Det indsamlede prøvemateriale stammer fra bloddonorer, som inden tapning har godkendt, at deres blod anvendes til kvalitetssikring af rutineanalyser, herunder fastsættelse af referenceområder (35). Derudover blev blodprøverne anonymiseret, idet tappe-nummer blev fjernet og nummeret D1 - D30. Derfor krævede indsamling af prøvematerialet ikke yderligere samtykke.

De deltagende donorer blev dog forud for tapning orienteret om udtagelse af de ekstra blodprøveglas, samt fik udleveret en kort projektbeskrivelse (*Bilag 4*).

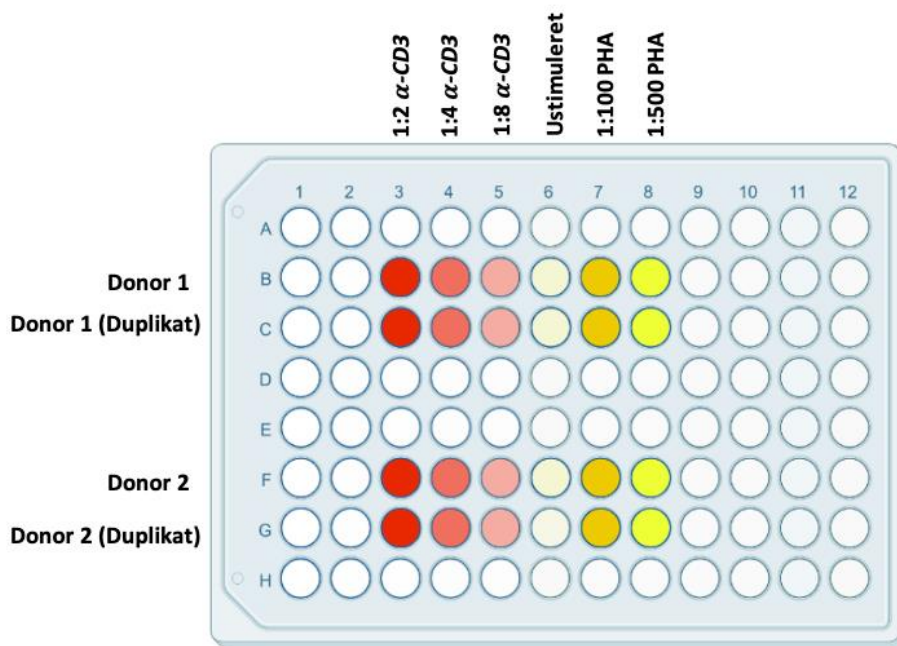
#### 4.2.2 Metodeoverblik

Analyseproceduren strækker sig over 5 dage, og kan inddeles i 8 delsteps (*Figur 16*). Heraf udføres step 1-4 sterilt i LAF-bænk. De enkelte delsteps uddybes i de følgende afsnit.



Figur 16: Overblik over metodens delsteps\*.

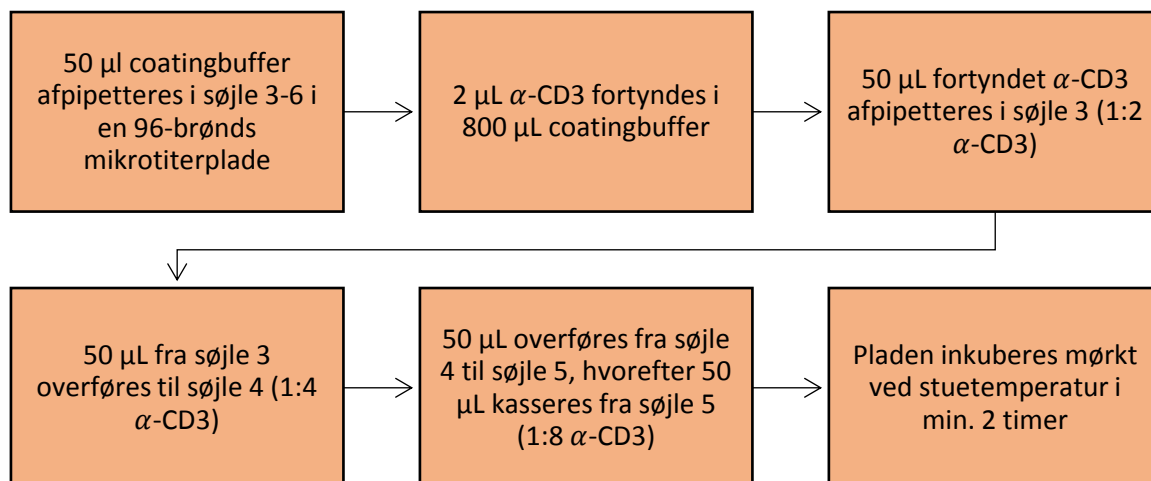
Stimulation af PBMC'er foregik i en 96-brønns mikrotiterplade. Donorprøverne blev, som vist på overblikket over pladeopsæt (*Figur 17*) stimuleret på forskellige måder, hhv. med 3 fortyndinger af  $\alpha$ -CD3; 1:2 (søjle 3), 1:4 (søjle 4) og 1:8 (søjle 5), ustimuleret (søjle 6) og 2 fortyndinger af PHA; 1:100 (søjle 7) og 1:500 (søjle 8). Hver plade blev anvendt til analyse af dobbeltbestemmelser af 2 donorer. PBMC'er fra de 2 donorer blev afpipetteret i hhv. række B+C (donor 1) og F+G (donor 2).



Figur 17: Overblik over pladeopsæt med angivelse af stimuli i søjle 3-8 og donornummer i række B+C og F+G\*.

#### 4.2.3 Coating af 96-brønds mikrotiterplade

Forud for arbejdet med celler, blev relevante brønde coatet med fortyndinger af  $\alpha$ -CD3. Som det fremgår af flowdiagrammet, Figur 18, blev coatingbuffer tilsat, hvorefter der blev udført en fortyndingsrække med  $\alpha$ -CD3.



Figur 18: Flowdiagram over coating af 96-brønds mikrotiterplade med  $\alpha$ -CD3\*.

#### 4.2.4 Isolering af mononukleære celler

PBMC'er blev isoleret vha. densitetsgradient centrifugering med mediet Lymphoprep™. Fremgangsmåden herfor er anført i flowdiagrammet, Figur 19.

Efter sidste vask blev cellekoncentrationen af de isolerede celler målt vha. Sysmex jf. forskriften i Bilag 5. Ud fra koncentrationsmålingen blev udtaget et volumen af celsesuspensionen sv.t.  $5 \cdot 10^6$  celler til farvning med CTV. Hvis det udtagne volumen var under 1 mL, blev der tilsat vaskemedie til et totalvolumen på 1 mL. Formel og eksempler på

beregning af volumen af hhv. cellesuspension og vaskemedie er anført nedenfor:

### Eksempel 1 – Cellekoncentration > $5 \cdot 10^6$ /mL

$$V_{ufarvede} = \frac{V_{til\ farvning} \cdot C_{til\ farvning}}{C_{ufarvede}}$$

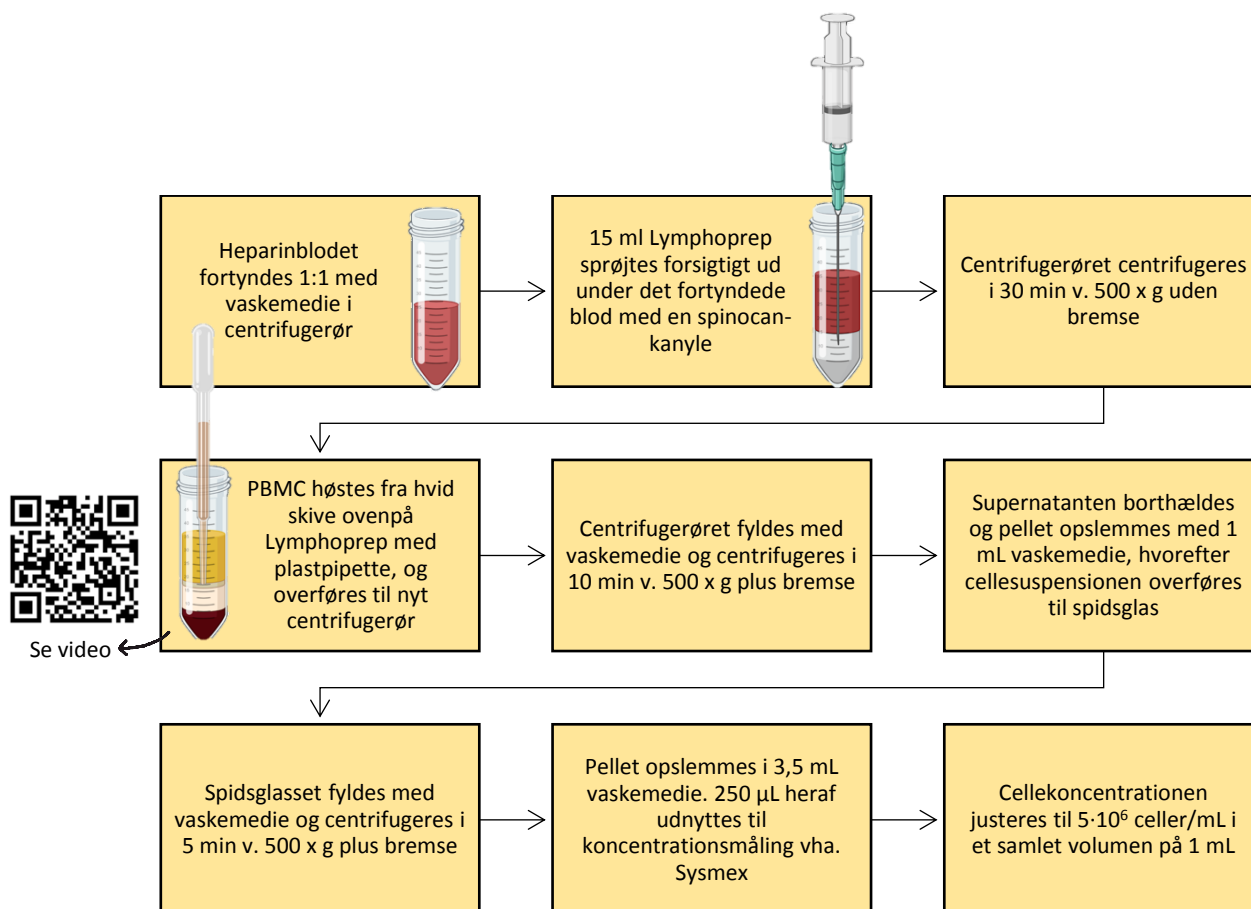
$$V_{ufarvede} = \frac{1\text{ mL} \cdot 5 \cdot 10^6\text{ celler/mL}}{7,03 \cdot 10^6\text{ celler/mL}} = 0,71\text{ mL cellesuspension}$$

$$1\text{ mL} - 0,71\text{ mL} = 0,28\text{ mL vaskemedie}$$

### Eksempel 2 – Cellekoncentration < $5 \cdot 10^6$ /mL

$$V_{ufarvede} = \frac{1\text{ mL} \cdot 5 \cdot 10^6\text{ celler/mL}}{3,08 \cdot 10^6\text{ celler/mL}} = 1,62\text{ mL cellesuspension}$$

Da cellekoncentrationen her som udgangspunkt var <  $5 \cdot 10^6$  celler/mL, måtte der anvendes 1,62 mL cellesuspension, og der blev ikke tilsat vaskemedie. Det anbefales i forskriften at anvende et volumen på 1 mL, dog tillades op til 2 mL.

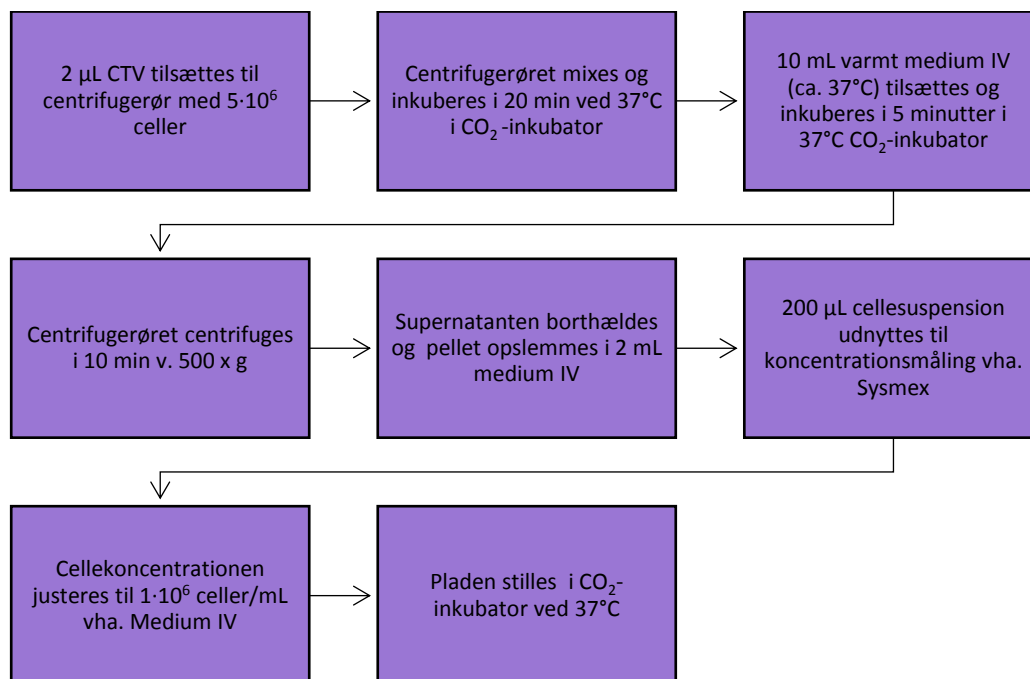


Figur 19: Flowdiagram over isolering af mononukleære celler\*.



#### 4.2.5 Farvning med Cell Trace Violet™

Efter isolering af PBMC'er blev de farvet med CTV. Proceduren er beskrevet i flowdiagrammet, *Figur 20*.



Figur 20: Flowdiagram over farvning med Cell Trace Violet™\*.

Efter farvning blev cellekoncentrationen målt på Sysmex. Cellekoncentrationen blev derefter justeret til  $1 \cdot 10^6$  celler/mL ved tilsætning af Medium IV. Dette ift. standardisering ved den efterfølgende stimulation.

Formel og eksempel på beregning af volumen af Medium IV, der skulle tilsættes cellesuspensionen for at opnå den ønskede koncentration, fremgår nedenfor:

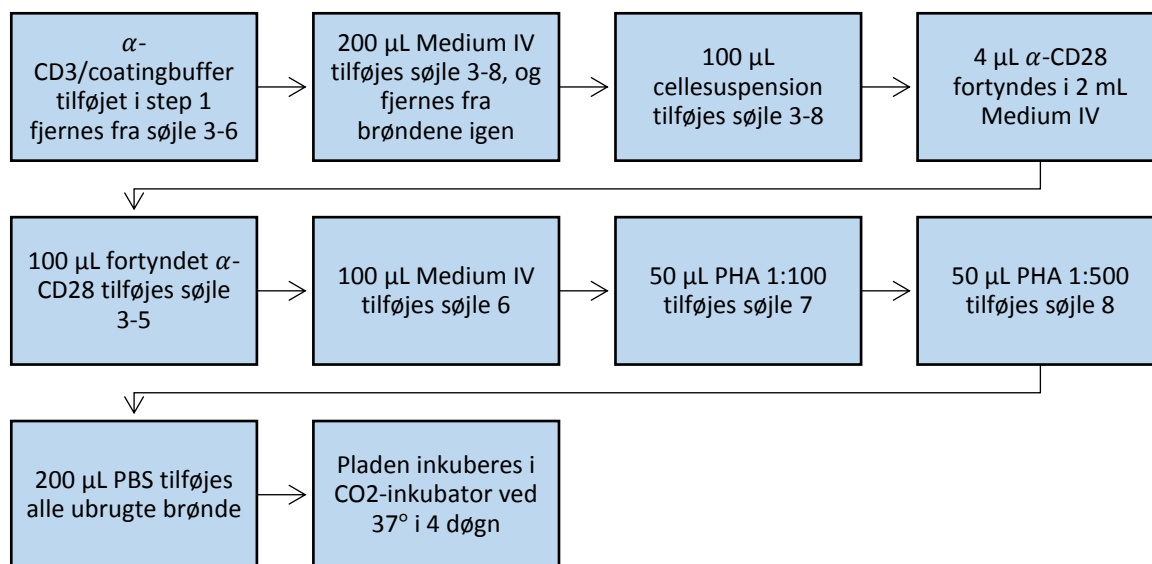
#### Eksempel 3 – Volumen Medium IV

$$V_{\text{Medium IV}} = \left( \frac{V_{\text{før}} \cdot C_{\text{før}}}{C_{\text{efter}}} \right) - V_{\text{før}}$$

$$V_{\text{Medium IV}} = \left( \frac{1,8 \text{ mL} \cdot 2,74 \cdot 10^6 \text{ celler/mL}}{1 \cdot 10^6 \text{ celler/mL}} \right) - 1,8 \text{ mL} = 3,13 \text{ mL medium IV}$$

#### 4.2.6 Klargøring af 96-brønnds mikrotiterplade

Den farvede celled suspension blev overført til relevante brønde i 96 brønnds pladen som tidligere blev coatet med  $\alpha$ -CD3/coatingbuffer. Derefter blev relevante brønde stimuleret med enten  $\alpha$ -CD28, 1:100 PHA eller 1:500 PHA jf. *Figur 17* i afsnit 4.2.2 *Metodeoverblik (s. 21)*. PHA blev fortyndet med Medium IV inden tilsætning ud fra forskriften som fremgår af *Bilag 6*. Proceduren er uddybet i flowdiagrammet, *Figur 21*.



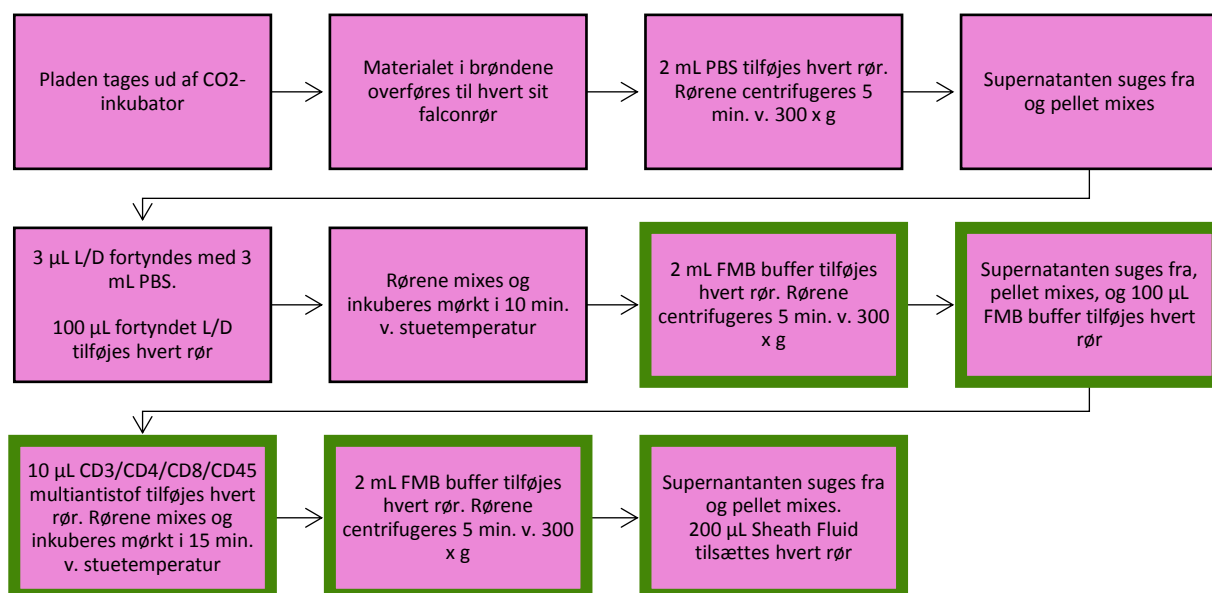
*Figur 21: Flowdiagram over klarlægning af 96-brønnds mikrotiterplade\*.*

#### 4.2.7 Test af CellTrace™ Violet farvning

Umiddelbart efter CTV-farvning, blev 100 µL hhv. farvet og ufarvet cellesuspension mærket med fluorokromkonjugeret CD3/CD4/CD8/CD45-multiantistof og analyseret på flowcytometeret. Dette for at teste, at cellerne *var* farvet tilstrækkeligt, og dermed undgå 4 dages inkubationstid med utilstrækkeligt farvede celler. Proceduren herfor er markeret med grønne rammer i flowdiagrammet, *Figur 22*, og uddybes videre i afsnit 4.2.10.2 *Test af CTV-farvning – Dag 1 (s. 28)*.

#### 4.2.8 Mærkning med fluorokrom-konjugerede antistoffer

Efter 4 døgn inkubationstid blev cellerne farvet med L/D og mærket med fluorokrom-konjugeret CD3/CD4/CD8/CD45 multiantistof. Proceduren er beskrevet i flowdiagrammet, *Figur 22*.



*Figur 22: Flowdiagram over mærkning med fluorokrom-konjugerede antistoffer. Bokse med grønne rammer udføres også på dag 1 ved test af CTV-farvning\*.*

#### 4.2.9 Flowcytometrisk analyse

Til flowcytometrisk analyse blev fremgangsmåden anført i forskriften i *Bilag 7* fulgt.

Data for hvert eksperiment blev indsamlet i en analyseskabelon oprettet i NovoExpress Software. Skabelonen indeholdt plots med foruddefinerede gates, opsamlingskriterier, parametre og pladeopsæt. De anvendte opsamlingskriterier er anført i *Tabel 2*.

<b>Stop kriterie</b>	100.000 CD3+ events eller 100 µL
<b>Flow Rate</b>	100 µL/min
<b>Threshold</b>	FSC-H > 100.000, Ungated

*Tabel 2 – Anvendte opsamlingskriterier til flowcytometrisk analyse*

I analyseskabelonens parametre var det defineret, hvilke lasere der skulle anvendes til excitation af de forskellige fluorokromer og fluorescerende farvestoffer, samt hvilke filtre/detektorer det spredte og emitterede lys skulle detekteres af. Disse parametre fremgår af *Tabel 3*.

Excitationslaser	Antistof	Fluorokrom/ fluorescerende farvestof	Filter
Lilla (405 nm)		CTV	445 ± 22,5 nm
Blå (488 nm)	α-CD3	FITC	550 ± 25 nm
Blå (488 nm)	α-CD8	PE	572 ± 14 nm
Blå (488 nm)	α-CD45	PerCP	675 ± 15 nm
Rød (640 nm)	α-CD4	APC	675 ± 25 nm
Rød (640 nm)		L/D	780 ± 30 nm

*Tabel 3: Oversigt over de anvendte fluorokromkonjugerede antistoffer og fluorescerende farvestoffer samt de tilhørende excitationslasere og filtre.*

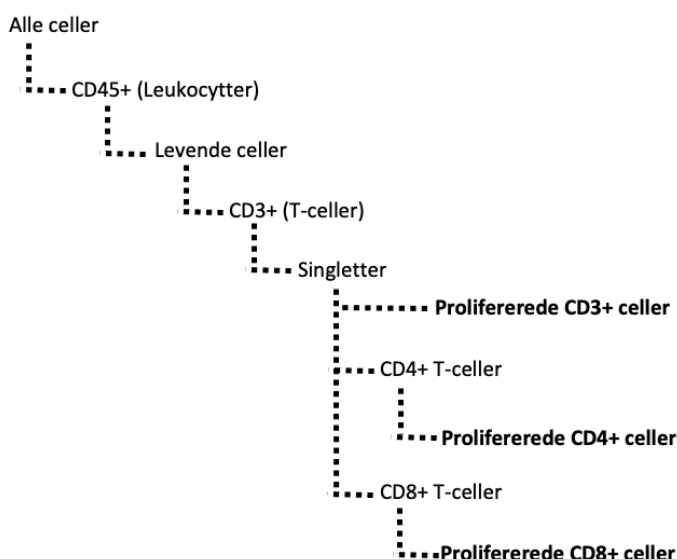
Prøverørerne blev inden indkøring på flowcytometeret mixet og placeret i et 24-rørs-rack.

#### 4.2.10 Databehandling

Efter indkøring af prøver på flowcytometeret, blev de indsamlede data analyseret. Dette indebærer først og fremmest tilpasning af de i analyseskabelonen foruddefinerede gates for hver enkelt prøve.

##### 4.2.10.1 Gatingstrategi

Den samme overordnede gatingstrategi blev anvendt til analyse af samtlige prøver (*Figur 23*). Ved at følge denne hierarkiske strategi blev det muligt, at kvantificere procentdelen af prolifererede hhv. CD3+, CD4+ og CD8+ T-celler.

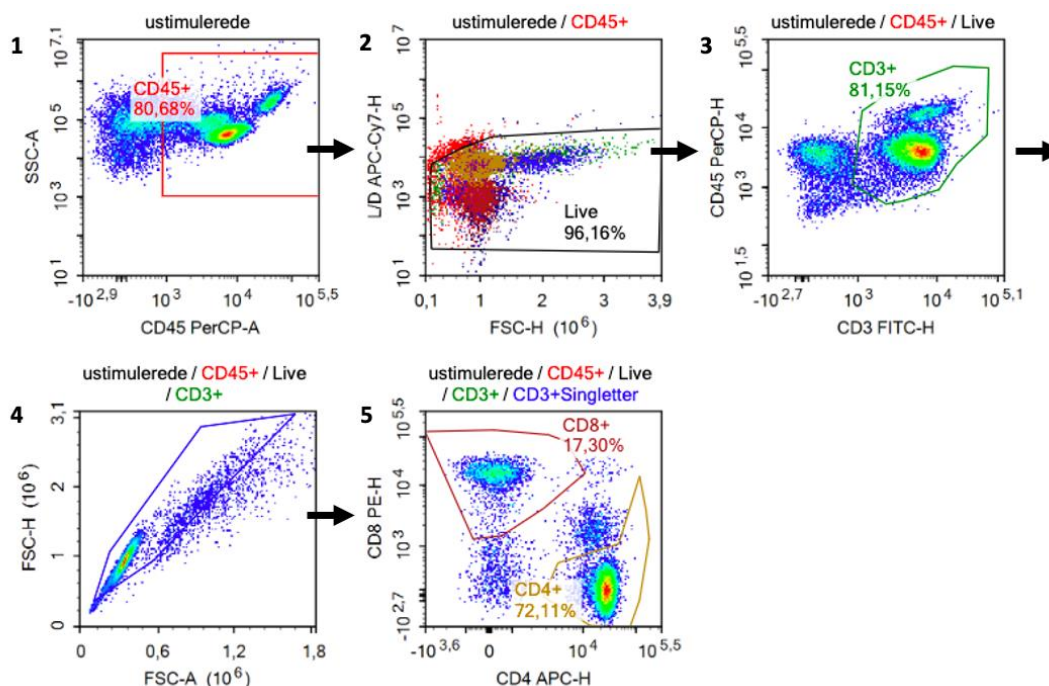


*Figur 23: Hierarkisk overblik over den anvendte gatingstrategi (eksempel fra vores projekt)\*.*

I *Figur 24* vises et eksempel på, hvilke plots der blev anvendt, samt hvor gates blev placeret heri, for at udføre den indledende del af gatingstrategien. Eksemplet er fra en ustimuleret

prøve.

I plot 1 blev der placeret en gate omkring populationen af CD45+ celler (leukocytter). Disse blev overført til plot 2, hvor cellerne med den højeste L/D-intensitet (døde celler) blev gattet væk. De levende CD45+ celler blev herefter taget med videre til plot 3, hvor der blev placeret en gate omkring populationen af CD3+ celler (T-celler). I plot 4 blev dubletter gattet væk på baggrund af FSC-H og FSC-A parametre. Endelig blev de gattede singletter overført til plot 5, hvor der blev placeret 2 gates omkring hhv. CD4+ og CD8+ T-celler.

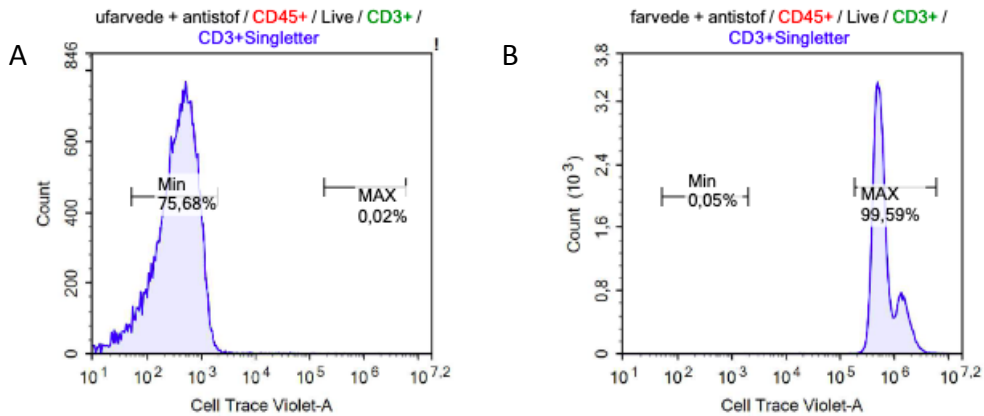


Figur 24: Eksempel på første del af den anvendte gatingstrategi til gating af hhv. CD3+ celler (plot 4) og CD4+ og CD8+ T-celler (plot 5) (eksempel fra eget projekt).

Den efterfølgende del af gatingstrategien var forskellig på dag 1, hvor CTV-farvningen blev testet og dag 5, hvor proliferationsevnen af de stimulerede celler blev vurderet.

#### 4.2.10.2 Test af CTV-farvning – Dag 1

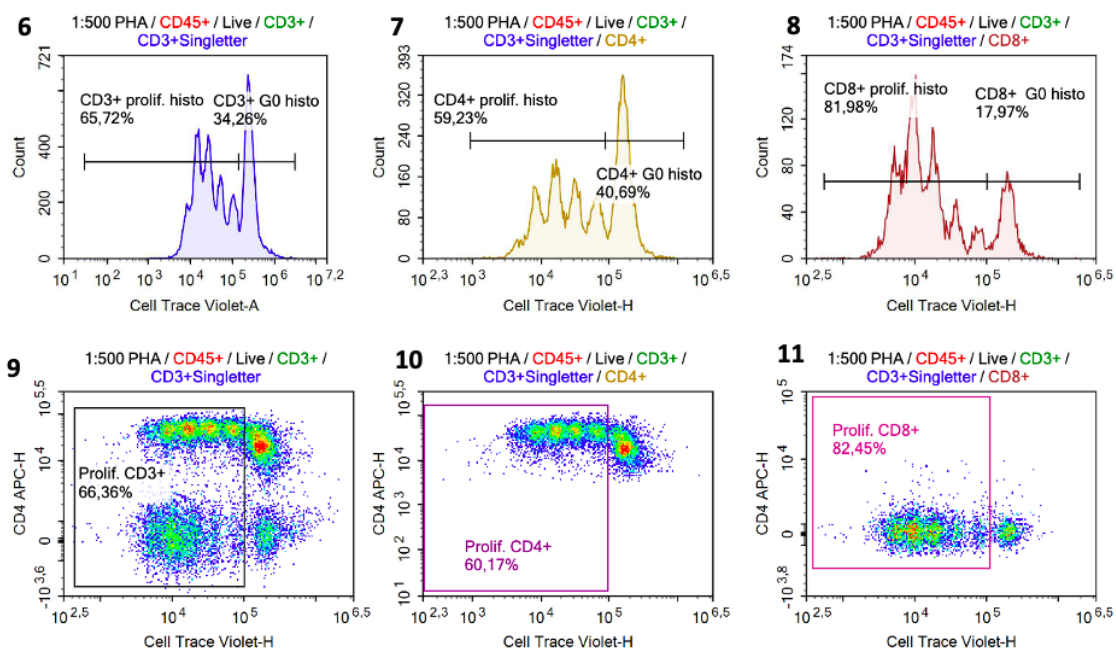
For at teste CTV-farvningen på dag 1 blev den gattede population af levende CD3+ singletter fra plot 4 (Figur 24) placeret i et histogram med CTV-intensitet som funktion af antal detekterede celler. For at farvningen kunne godkendes, skulle ufarvede celler være i området "Min" og farvede celler i området "MAX" (Figur 25).



Figur 25: Test af CTV-farvning (Dag 1) vha. histogram med CTV-intensitet som funktion af detekterede celler (counts). Ved analyse af ufarvede cellesuspensioner (A) bør der være ét peak i området "Min". Ved farvede cellesuspensioner bør peaket være i området "Max" (B) (Eksempel fra eget projekt).

#### 4.2.10.3 Proliferationsanalyse – Dag 5

På dag 5 efter stimulation blev de gatede populationer af hhv. CD3+ CD4+ og CD8+ fra hhv. plot 4 og 5 (Figur 24) tilføjet plots med CTV-intensitet ad x-aksen mhp. vurdering af proliferationsevnen. Et eksempel på dette for en prøve stimuleret med 1:500 PHA fremgår af Figur 26. Til vurdering af proliferationsevne blev anvendt to forskellige plot-typer: Histogrammer og dot-plots. I histogrammerne (plot 6-8) blev hver generation af celler visualiseret ved separate peaks. Procentdelen af prolifererede celler blev bestemt ved placering af en gate omkring alle peaks på nær peaket med højest CTV-intensitet (sv.t. generation 0). På dot-plots (plot 9-11) viste de forskellige generationer sig ved distinkte populationer. Her blev gates placeret omkring alle populationer undtagen populationen længst til højre (sv.t. generation 0).



Figur 26: Eksempel på gatingstrategi til vurdering af fraktion af prolifererede hhv. CD3+, CD4+ og CD8+ T-celler. Øverst illustreret ved histogrammer, nederst ved dot-plots (eksempel fra eget projekt).

#### 4.2.11 Histogrammer og beregning af 0,05-fraktiler

Data for de i histogrammerne angivne procentdele af prolifererede celler blev overført fra NovoExpress Software til Excel.

I Excel blev middelværdien af dobbeltbestemmelserne beregnet vha. funktionen *MIDDEL*. Dette blev gjort for hver af de 3 celletyper (CD3+, CD4+ og CD8+) ved hver af de anvendte stimuli (1:100 PHA, 1:500 PHA, 1:2  $\alpha$ -CD3, 1:4  $\alpha$ -CD3 og 1:8  $\alpha$ -CD3).

De beregnede middelværdier for hver af de 30 donorer blev derefter indsat i histogrammer med en intervalbredde på 2%. Der blev fremstillet individuelle histogrammer for hver celletype og stimuli. Herudfra blev der foretaget en beskrivelse af, hvordan målingerne fordelte sig blandt de inkluderede donorer.

Til hvert histogram blev der desuden beregnet en 0,05-fraktil, sv.t. den værdi 95% af målingerne i stikprøven var større end. Da det på baggrund af stikprøvens størrelse ikke var muligt at afgøre, hvorvidt stikprøven var normalfordelt, blev 0,05-fraktilen beregnet vha. Excel-funktionen *FRAKTIL.UDELAD*.

#### 4.2.12 In- og eksklusionskriterier

For at afgøre hvorvidt et resultat skulle in- eller ekskluderes, blev følgende kriterier anvendt:

1. Hvis procentdelen af prolifererede celler i en *ustimuleret* prøve var >50%, blev de tilhørende stimulerede prøver fra samme række i pladeopsættet ekskluderet.
2. Hvis der blev detekteret for få celler indenfor de foruddefinerede CD45, CD3, CD4 og CD8-gates, til at kunne vurdere hvilke celletyper, der havde prolifereret, blev det pågældende resultat ekskluderet.
3. Hvis plots til gating af levende celler (plot 2, *Figur 24*) og/eller singletter (plot 4, *Figur 24*) fremkom usædvanligt, udelukkes disse plots fra gatingstrategien. Resultatet blev dog stadig inkluderet, såfremt populationerne af CD3+, CD4+ og CD8+ celler kunne gates ud fra de øvrige plots.

Hvis en af dobbeltbestemmelserne blev ekskluderet pga. ovenstående kriterier, blev den anden måling benyttet alene, fremfor at beregne middelværdien.

#### 4.2.13 Litteratursøgning

Til litteratursøgning blev anvendt forskellige søgestrategier. Der blev bl.a. foretaget systematiske søgninger i databaserne PubMed og Embase. Dette for at undersøge, om der forefindes videnskabelige artikler, som tidligere har forsøgt at beskrive referenceområder for T-cellers proliferationsevne. Bloksøgningsdiagrammer og søgestrategi hertil fremgår af *Bilag 8*. Der blev desuden foretaget bevidst tilfældig søgning på Google og PubMed for yderligere at fremfinde viden og artikler, der kunne anvendes til at afdække problemstillingen.

## 5 Resultater

Det følgende afsnit indledes med en præsentation af udvalgte eksempler på plots fra prøver med afvigelser i metoden, samt en angivelse af hvilke resultater der blev ekskluderet. Dernæst præsenteres fordelingen af resultater for de inkluderede donorerne vha. histogrammer for hver stimuli-fortynding og celletype inkl. angivelse af beregnede 0,05-fraktiler. Rådata og beregninger fremgår af *Bilag 9*.

### 5.1 Afvigelser og ekskluderede prøver

For enkelte prøver var det nødvendigt at afvige fra proceduren for databehandling. Disse fremgår af *Tabel 4*. Her er desuden angivet hvilke resultater der blev ekskluderet, og på baggrund af hvilket kriterie, jf. afsnit 4.2.12 (s. 30).

Donor nr.	Stimuli	Afvigelse
<b>8</b>	1:500 PHA	X
<b>10 + Duplikat</b>	1:100 PHA	X
	1:500 PHA	X
	1:2 $\alpha$ -CD3	X
	1:4 $\alpha$ -CD3	X
	1:8 $\alpha$ -CD3	X
<b>11 + Duplikat</b>	1:8 $\alpha$ -CD3	X
<b>12</b>	1:4 $\alpha$ -CD3	X
<b>12 Duplikat</b>	1:8 $\alpha$ -CD3	X
<b>20 Duplikat</b>	1:4 $\alpha$ -CD3	X

*Tabel 4 – Oversigt over prøver med afvigelser i databehandling*

*Grønt X = Gatet uden singlet-gate pga. forskydning af FSC-H-parametre ved flowcytometrisk analyse.*

*Blåt X = Ekskluderet pga. stimuleret negativ kontrol (kriterie 1, jf. afsnit 4.2.12)*

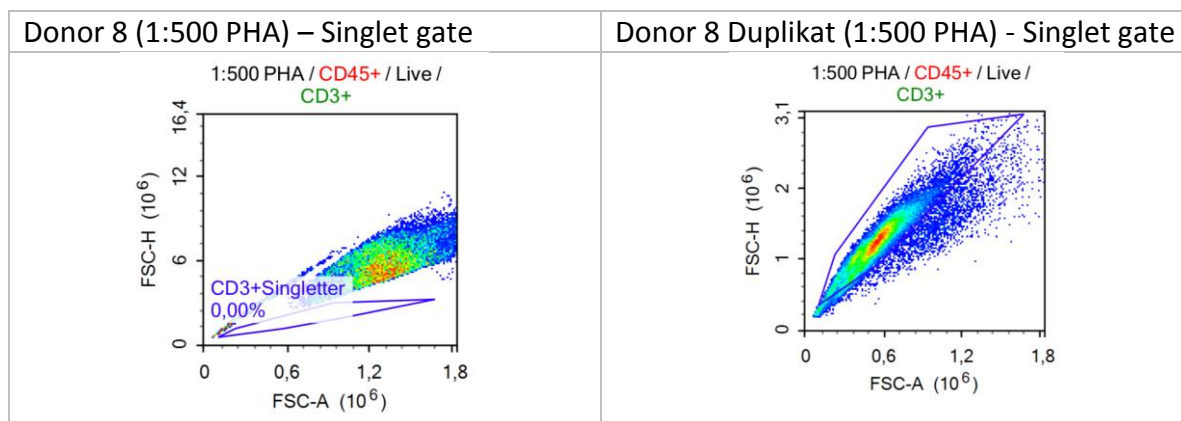
*Rødt X = Ekskluderet pga. manglende fluorescens-mærkning af overflademærkere (kriterie 2, jf. afsnit 4.2.12))*

For at uddybe betydningen af afvigelse præsenteres i det følgende udvalgte eksempler på plots fra de omtalte prøver. De resterende plots fremgår af *Bilag 10*.



### 5.1.1 Eksempel 1 – Gating uden singlet-gate

I *Figur 27* vises plottet for donor 8, 1:500 PHA, stillet op mod det tilsvarende plot i en "normal" prøve, her duplikatet af donor 8 (1:500 PHA). Her fremgår det, at værdierne på y-aksen er usædvanligt høje, hvilket medfører, at de detekterede celler ligger udenfor den foruddefinerede gate (diskuteres i afsnit 6.4.1 (s. 46)).

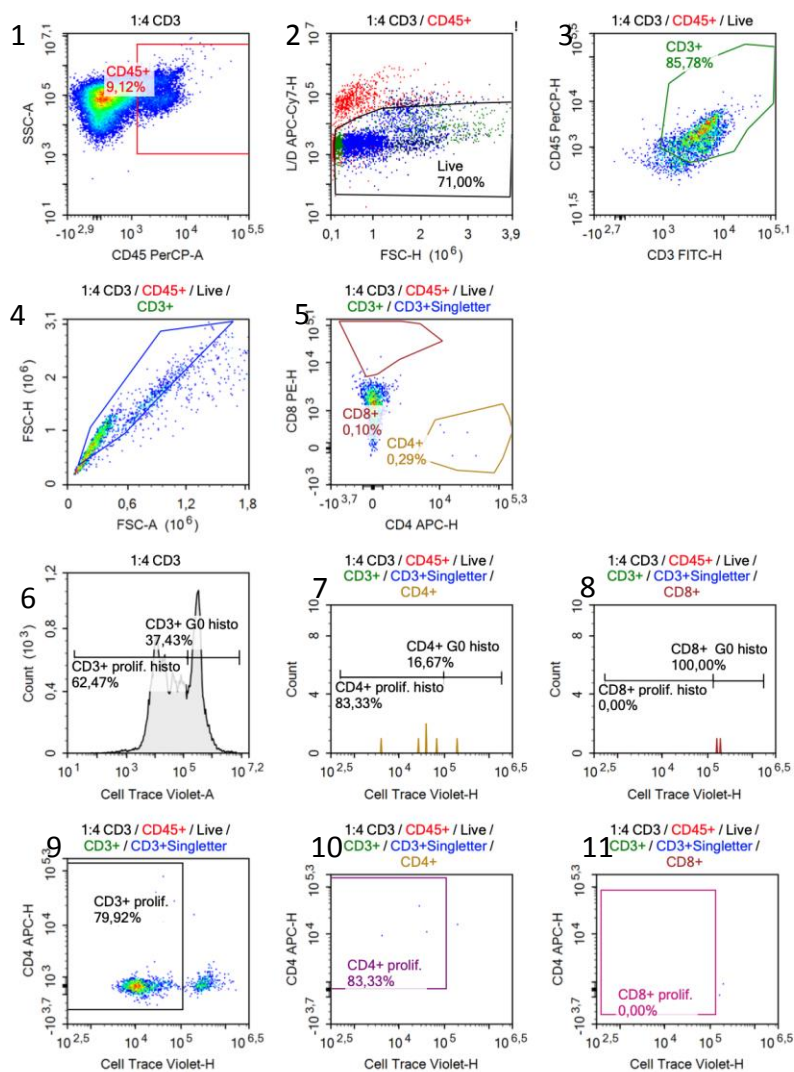


*Figur 27: Af plottet for donor 8 (1:500 PHA) (venstre) ses usædvanligt høje y-værdier sammenlignet med en "normal" prøve (højre). Bemærk forskellig akseinddeling på y-aksen.*

### 5.1.2 Eksempel 2 – Manglende fluorescens-mærkning af overflademarkører

Af *Figur 28* vises alle plots fra donor 12 (1:4  $\alpha$ -CD3). Her ses, at kun meget få celler er detekteret indenfor de foruddefinerede CD45/CD3/CD4/CD8-gates, hvorfor prøven blev ekskluderet. I plot 6 er gatingstrategien fjernet, og i stedet er alle celler i prøven inkluderet. Her ses det, at der er detekteret prolifererede celler i prøven.

På plot 9 ses en lille population af celler i gaten for prolifererede CD3+ celler med samme CD4-intensitet, og dermed samme placering på y-aksen, som CD8+ celler. Disse fremgår ikke af CD8-gaten i plot 5 og 11 (diskuteres i afsnit 6.4.2 (s. 47)).



Figur 28: Donor 12 (1:4  $\alpha$ -CD3) – Manglende fluorescens-mærkning af overflademærkere

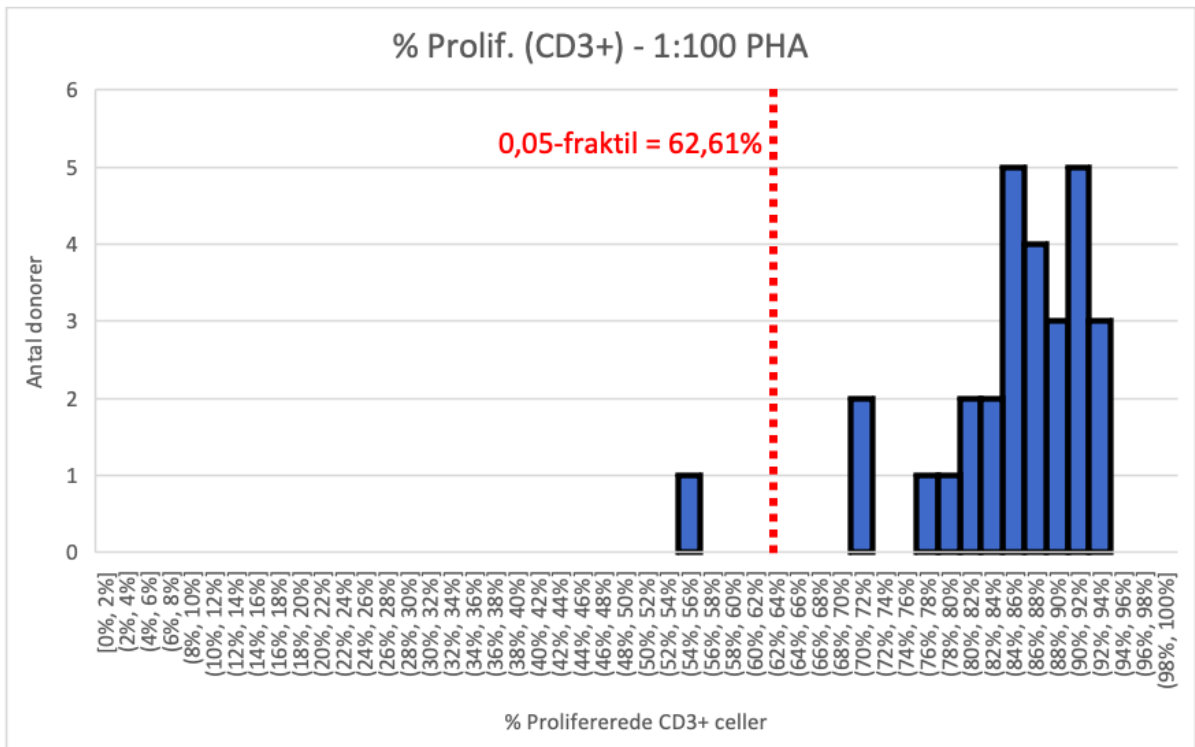
## 5.2 Histogrammer – Fordeling af resultater

I det følgende præsenteres fordelingen af resultaterne af de inkluderede prøver vha. histogrammer. Til hvert histogram er en 0,05 fraktile beregnet og illustreret med en rød stiplede linje. NB! De beregnede 0,05 fraktiler er forbundet med stor usikkerhed pga. stikprøvens lille størrelse.

### 5.2.1 1:100 PHA

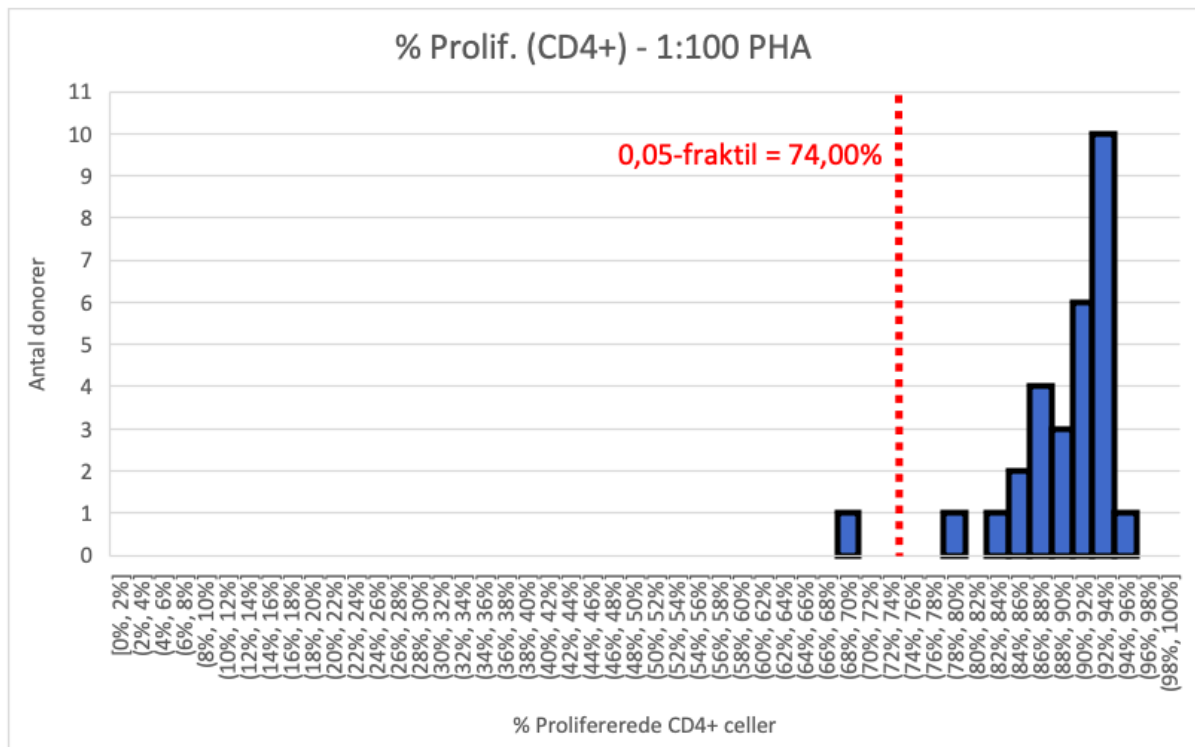
Af Figur 29-31 ses histogrammer for celler stimuleret med 1:100 PHA. I hvert histogram indgår 29 resultater, idet donor 10 inkl. duplikat blev ekskluderet.

For de CD3+ celler (Figur 29) ligger 28 ud af 29 resultater over 70%. Resultatet for Donor 6 på 54,84% adskiller sig fra de øvrige. 0,05-fraktilen blev beregnet til 62,61%.



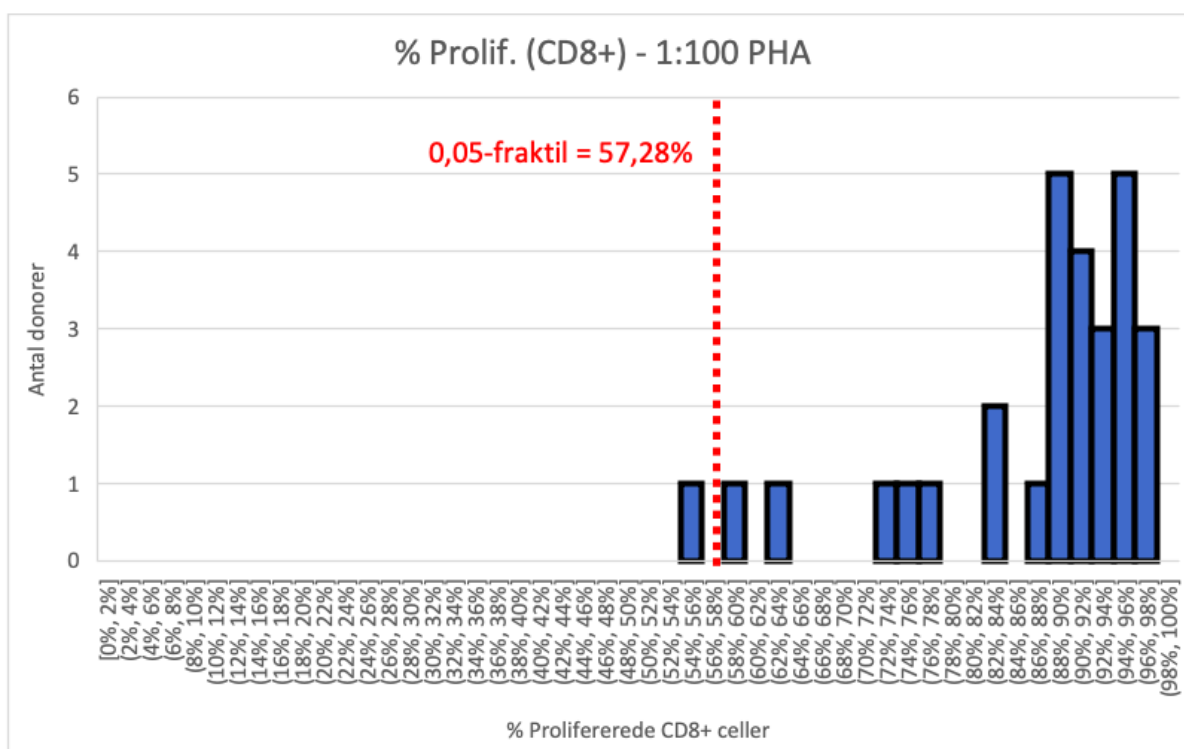
Figur 29: Fordeling af resultater for CD3+ celler stimuleret med 1:100 PHA.

For de CD4+ celler (Figur 30) ligger 28 ud af 29 resultater mellem 78 og 96%, 17 af disse ligger over 90%. Donor 6 ligger her på 68,95%. 0,05-fraktilen blev beregnet til 74,00%.



Figur 30: Fordeling af resultater for CD4+ celler stimuleret med 1:100 PHA

For de CD8+ celler (*Figur 31*) ses, at størstedelen af resultaterne ligger i området 72-98%. Resultatet for donor 6 var igen lavest (55,67%), efterfulgt af Donor 20 (58,90%) og Donor 18 (62,98%). 0,05-fraktilen blev beregnet til 57,28%.

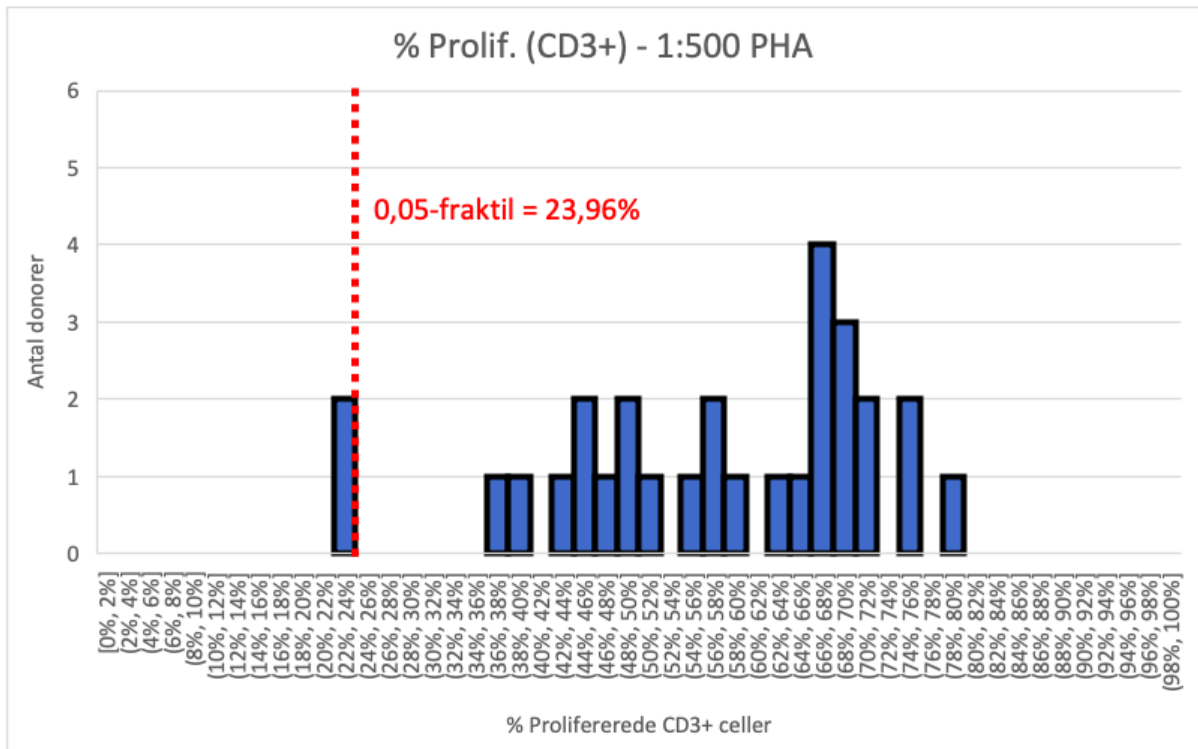


*Figur 31: Fordeling af resultater for CD8+ celler stimuleret med 1:100 PHA*

### 5.2.2 1:500 PHA

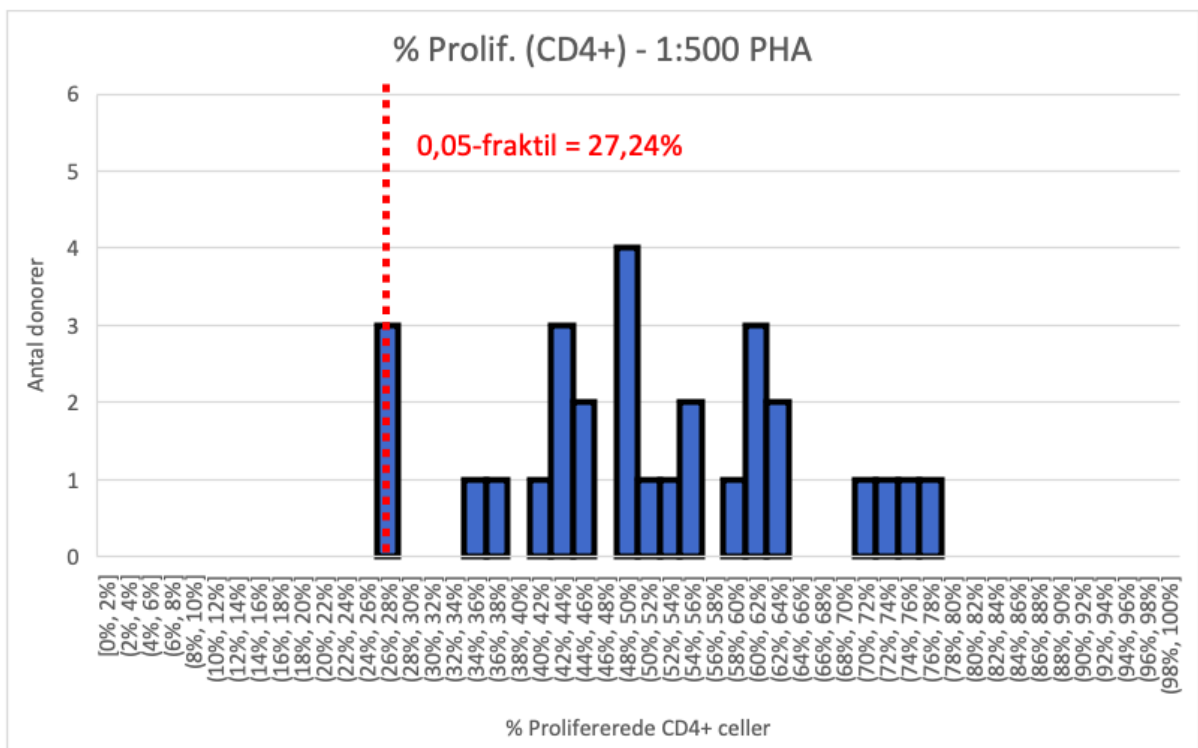
Af *Figur 32-34* vises histogrammer for celler stimuleret med 1:500 PHA. Donor 10 inkl. duplikat blev ekskluderet, hvorfor der indgår 29 målinger.

For de CD3+ celler (*Figur 32*) ligger de fleste resultater jævnt fordelt mellem 36 og 80%. Donor 6 og 18 udgør de laveste resultater, og ligger i intervallet 22-24%. 0,05-fraktilen blev beregnet til 23,96%. Fraktilen udelukker doner 6, men medtager doner 18.



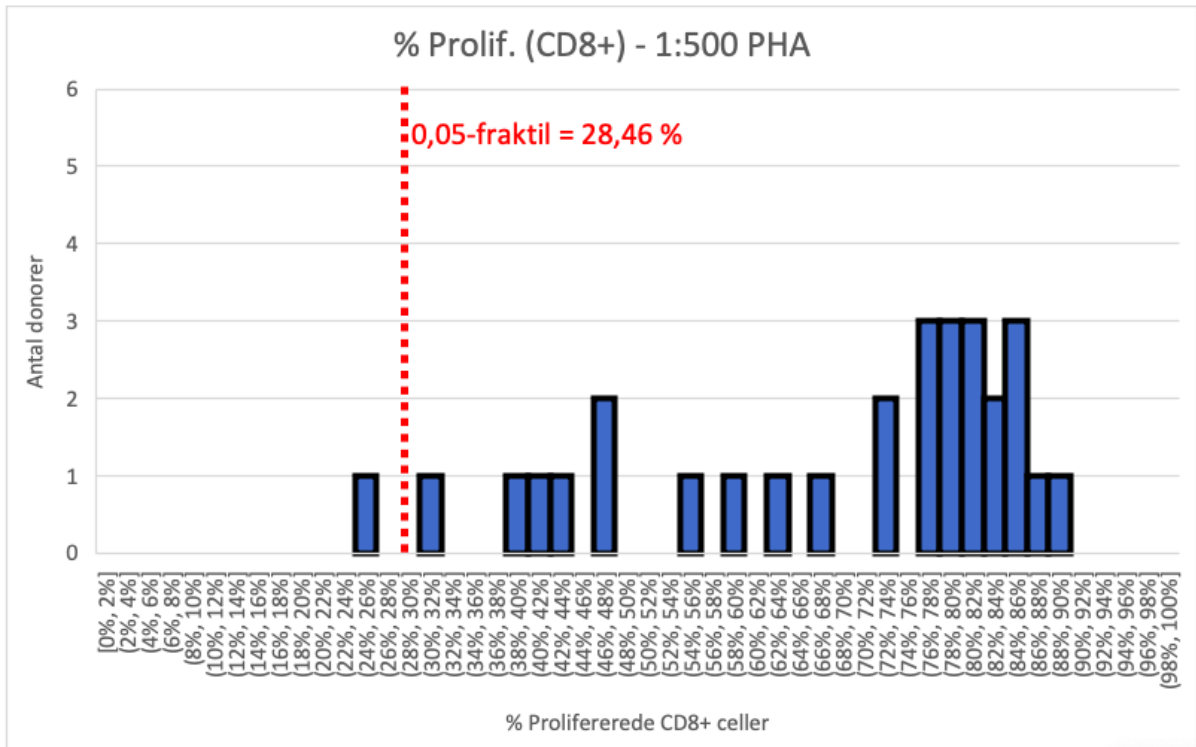
Figur 32: Fordeling af resultater for CD3+ celler stimuleret med 1:500 PHA

For de CD4+ celler (Figur 33) ligger resultaterne jævnt fordelt mellem 26 og 78%. Donor 4, 6 og 18 udgør de laveste resultater på hhv. 27,76, 27,92 og 26,78%. Heriblandt ligger 0,05 fraktilen, som blev beregnet til 27,24%.



Figur 33: Fordeling af resultater for CD4+ celler stimuleret med 1:500 PHA

For de CD8+ celler (Figur 34) ligger ca. 2/3 af resultaterne mellem 72-90%, hvoraf resten er jævnt fordelt mellem 25 og 68%. 0,05-fraktilen blev beregnet til 28,46%.



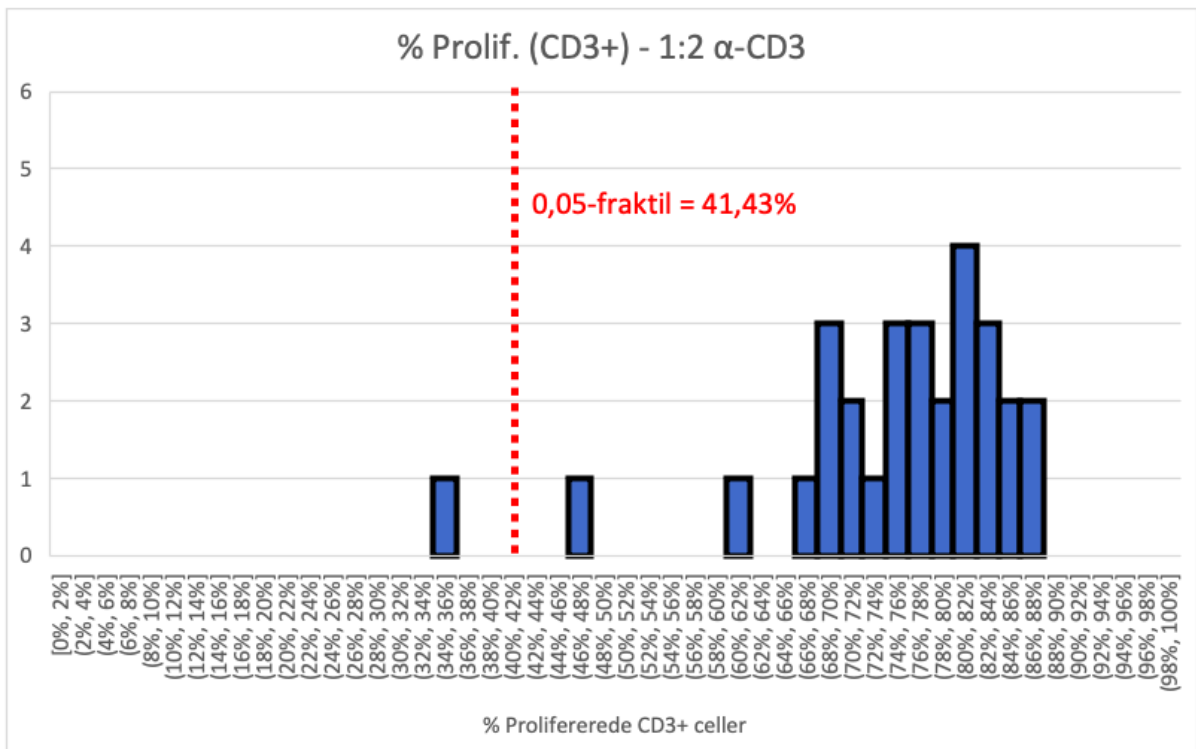
Figur 34: Fordeling af resultater for CD8+ celler stimuleret med 1:500 PHA

### 5.2.3 1:2 $\alpha$ -CD3

Af Figur 35-37 ses histogrammer for celler stimuleret med 1:2  $\alpha$ -CD3. Donor 10 inkl. duplikat blev ekskluderet, hvorfor der indgår 29 resultater i hvert af histogrammerne.

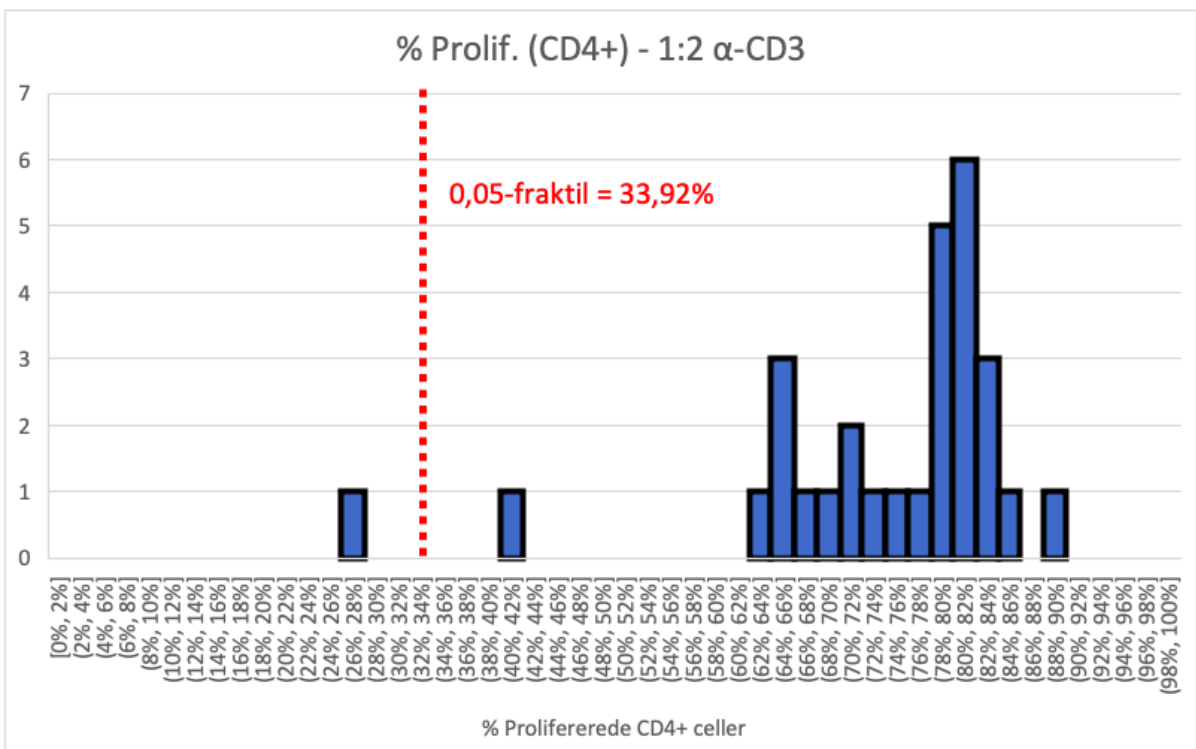
For de CD3+ celler (Figur 35) ligger 27 ud af 29 resultater mellem 60 og 88%.

Donor 6 og 27 udgør de laveste resultater på hhv. 47,66 og 35,40%. 0,05-fraktilen blev beregnet til 41,43%.



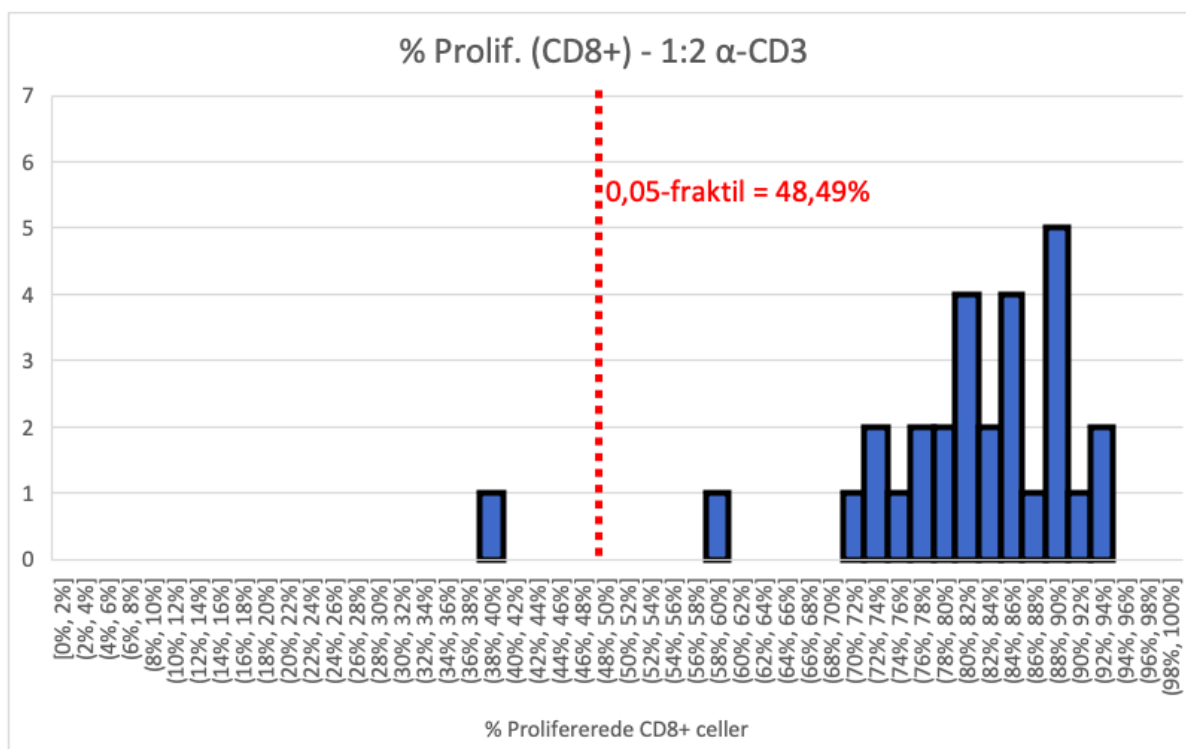
Figur 35: Fordeling af resultater for CD3+ celler stimuleret med 1:2  $\alpha$ -CD3

For de CD4+ celler (Figur 36) ligger størstedelen af resultaterne over 62%, halvdelen af resultaterne ligger mellem 78-84%. Resultaterne for donor 6 og 27 på hhv. 40,11 og 27,74% adskiller sig fra de øvrige resultater. 0,05 fraktilen blev beregnet til 33,92%.



Figur 36: Fordeling af resultater for CD4+ celler stimuleret med 1:2  $\alpha$ -CD3

For de CD8+ celler (Figur 37) fordeler 27 ud af 29 resultater sig mellem 70 og 94%. Donor 23 og 27 adskiller sig herfra med hhv. 58,56 og 38,42%. 0,05 fraktilen blev beregnet til 48,49%.



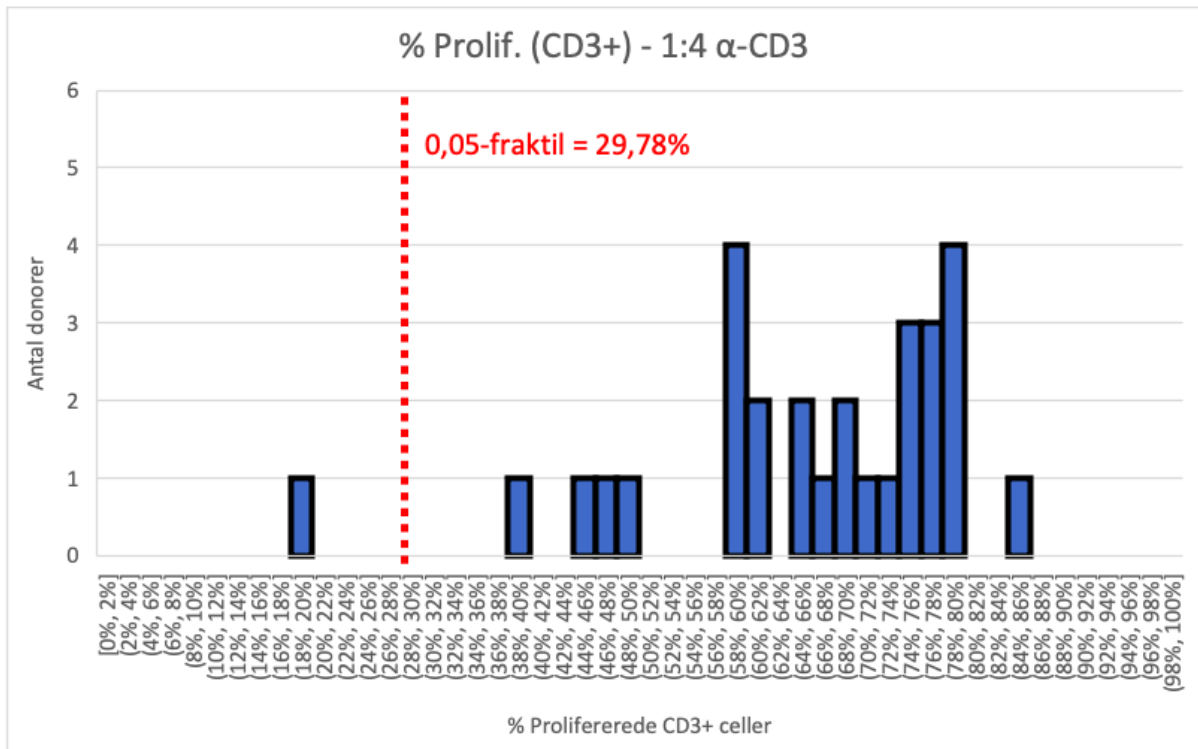
Figur 37: Fordeling af resultater for CD8+ celler stimuleret med 1:2  $\alpha$ -CD

#### 5.2.4 1:4 $\alpha$ -CD3

Af Figur 38-40 ses histogrammer for celler stimuleret med 1:4  $\alpha$ -CD3. I hvert histogram indgår 29 målinger, idet donor 10 inkl. duplikat blev ekskluderet. For donor 12 indgår kun det ene resultat for dobbelbestemmelsen, og dermed ikke en middelværdi af, som ved de øvrige.

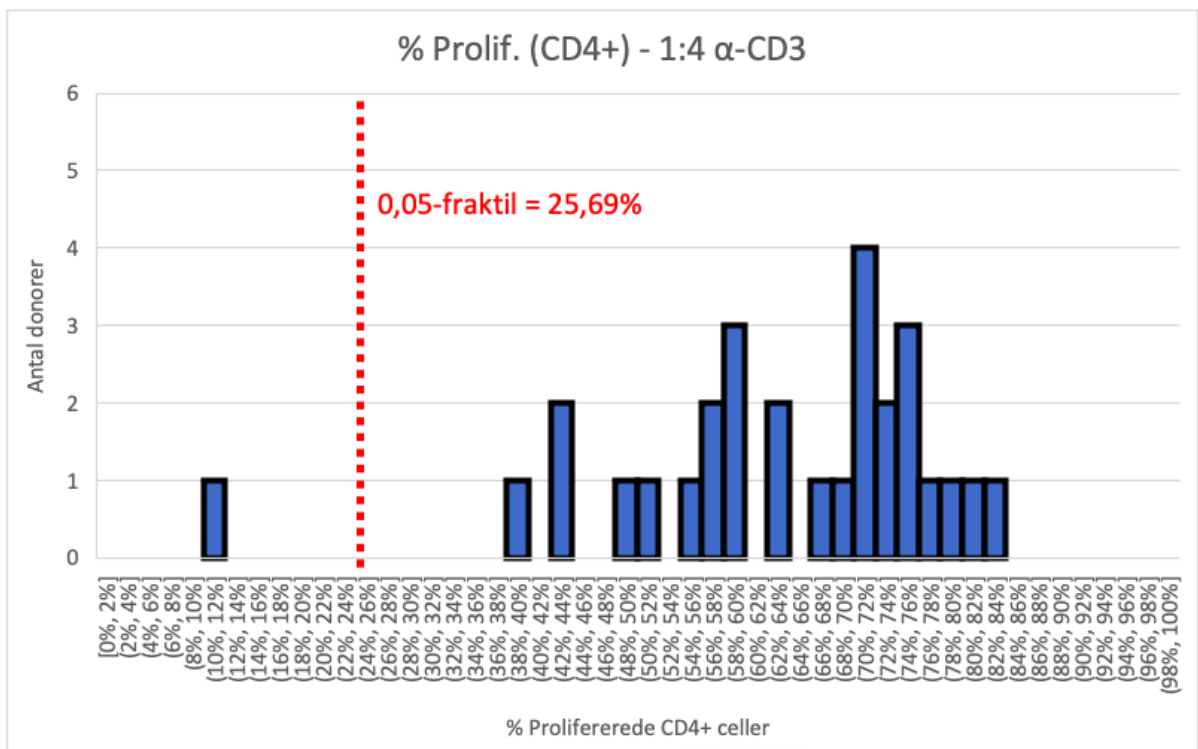
For de CD3+ celler (Figur 38) ses, at størstedelen af resultaterne ligger mellem 58 og 86%. Enkelte ligger herunder, hvoraf donor 6 ligger lavest med 19,78%. 0,05 fraktilen blev beregnet til 29,78%.





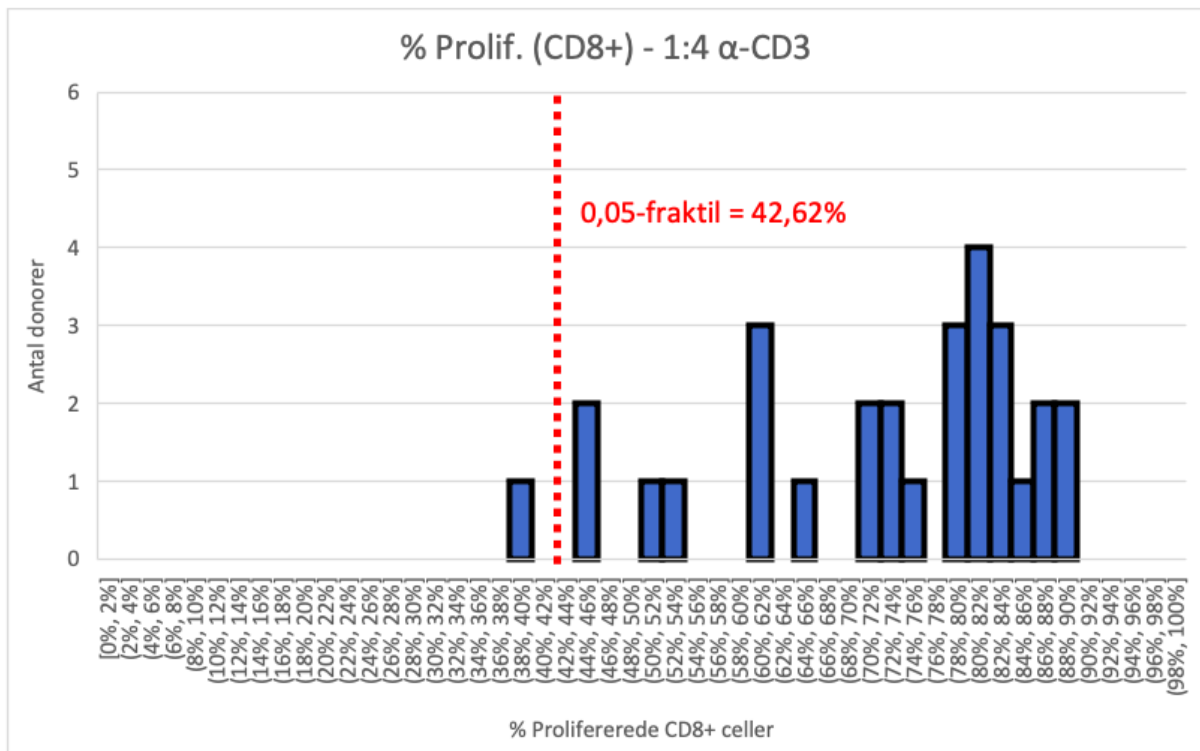
Figur 38: Fordeling af resultater for CD3+ celler stimuleret med 1:4  $\alpha$ -CD3

For de CD4+ celler (Figur 39) ses, at resultaterne for 28 ud af 29 donorer fordeler sig mellem 38 og 84%. Donor 6 adskiller sig fra de øvrige, med 11,45%. 0,05 fraktilen blev beregnet til 25,69%.



Figur 39: Fordeling af resultater for CD4+ celler stimuleret med 1:4  $\alpha$ -CD3

For de CD8+ celler (Figur 40) ligger resultaterne fordelt mellem 38 og 90%. Halvdelen dog mellem 78 og 90%. Ingen resultater skiller sig betydeligt ud. 0,05 fraktilen blev beregnet til 42,62%.

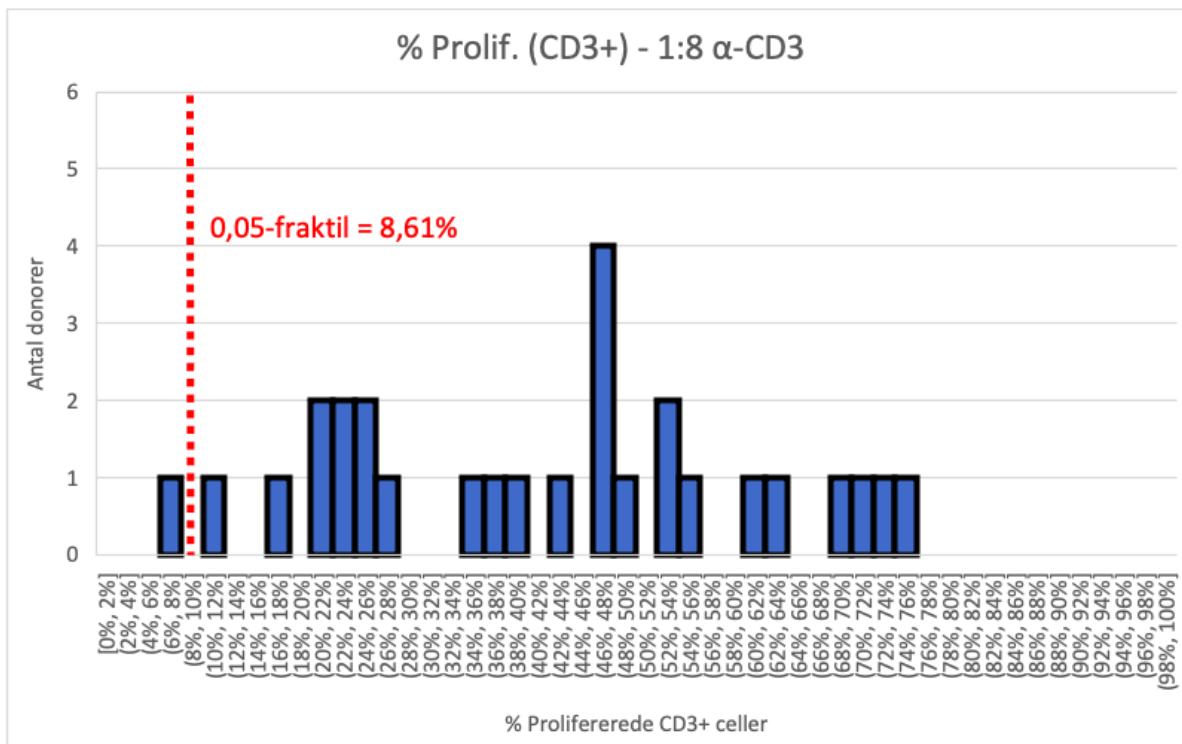


Figur 40: Fordeling af resultater for CD8+ celler stimuleret med 1:4 α-CD3

### 5.2.5 1:8 α-CD3

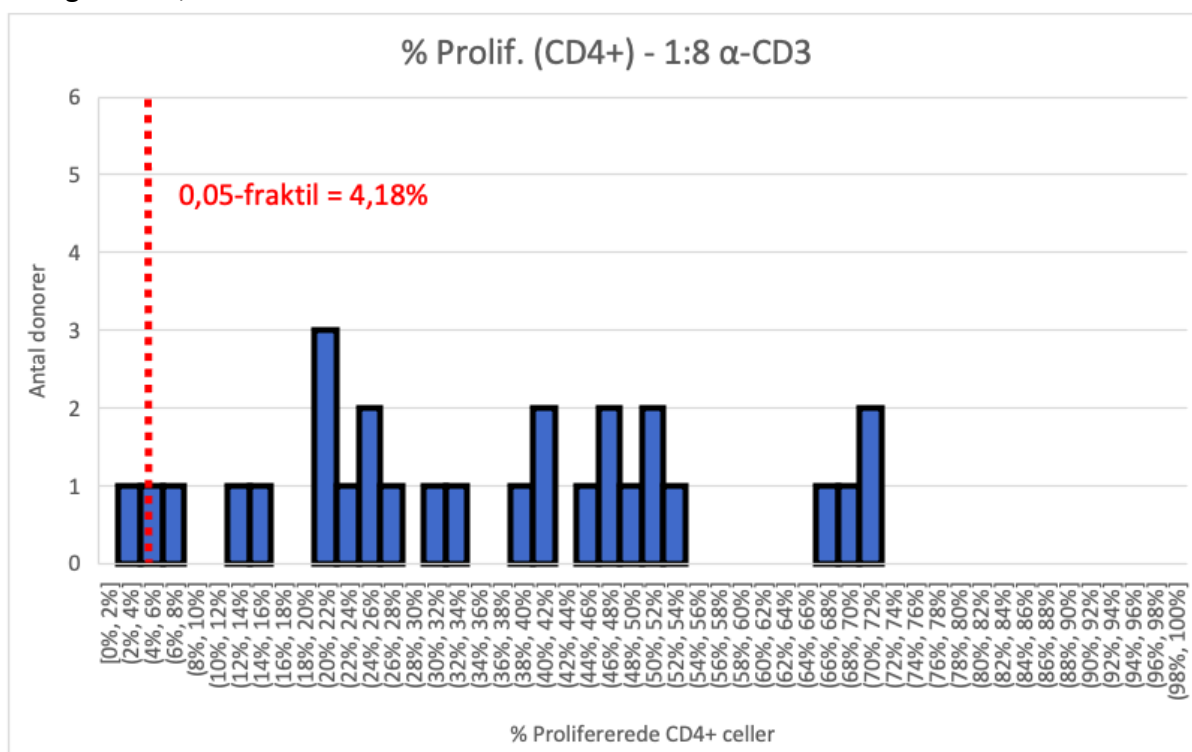
Af Figur 41-43 ses histogrammer for celler stimuleret med 1:8 α-CD3. Donor 10 inkl. duplikat og Donor 11 inkl. duplikat blev ekskluderet, hvorfor kun 28 målinger indgår i hvert histogram. Ved Donor 12 blev kun det ene resultat fra dobbeltbestemmelsen medtaget i histogrammerne.

For de CD3+ celler (Figur 41) ligger resultaterne fordelt mellem 6 og 76%. Her blev 0,05 fraktilen beregnet til 8,61%.



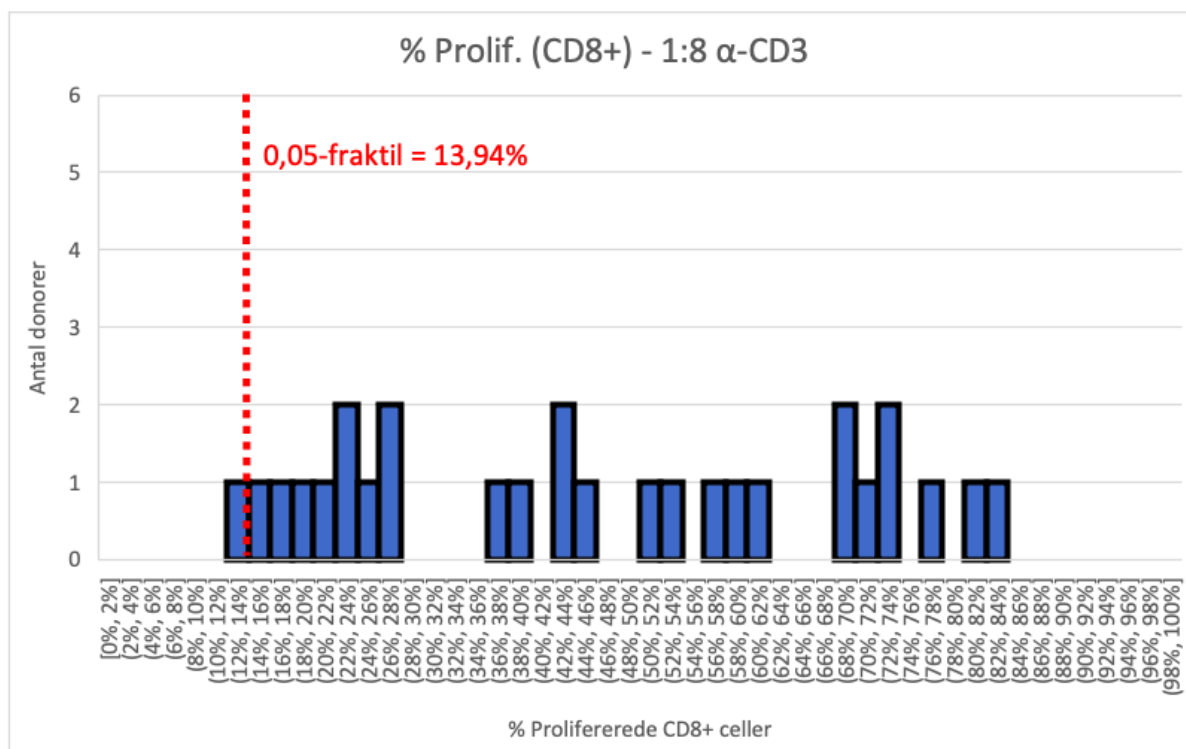
Figur 41: Fordeling af resultater for CD3+ celler stimuleret med 1:8  $\alpha$ -CD3

Resultaterne for de CD4+ celler (Figur 42) ligger fordelt mellem 2 og 72%. 0,05 fraktilen blev beregnet til 4,18%.



Figur 42: Fordeling af resultater for CD4+ celler stimuleret med 1:8  $\alpha$ -CD3

For de CD8+ celler (Figur 43) ligger resultaterne fordelt mellem 12 og 84%. 0,05 fraktilen blev beregnet til 13,94%



Figur 43: Fordeling af resultater for CD8+ celler stimuleret med 1:8  $\alpha$ -CD3

### 5.3 Beregnede 0,05-fraktiler

Af Tabel 5 fremgår en oversigt over de beregnede 0,05-fraktiler for alle histogrammer. Bemærk dog at der kun er tale om estimater på populationens 0,05-fraktil, idet de er beregnet på baggrund af en lille stikprøve (n=30).

Celletype Stimuli	CD3+ celler	CD4+ celler	CD8+ celler
1:100 PHA	62,61%	74,00%	57,28%
1:500 PHA	23,96%	27,24%	28,45%
1:2 $\alpha$ -CD3	41,53%	33,92%	48,49%
1:4 $\alpha$ -CD3	29,78%	25,69%	42,62%
1:8 $\alpha$ -CD3	8,61%	4,18%	13,94%

Tabel 5: Oversigt over beregnede 0,05-fraktiler ved hver celletype og stimuli.

## 6 Diskussion

In vitro T-celle proliferations analyse kan spille en vigtig rolle i udredningen af visse PID, idet nogle af disse patienters sygdomstilstand *kan* skyldes nedsat T-celle proliferationsevne. Projektets formål var at beskrive et referenceområde til analysen. For at opfylde dette blev analysen udført på blodprøver fra 30 bloddonorer. Fordelingen af resultaterne opnået herved blev afbildet i histogrammer og 0,05-fraktiler blev beregnet, som estimerer på de værdier 95% af raske individer forventes at ligge over. I det følgende vil udvalgte elementer af vores metode og resultater blive diskuteret.

### 6.1 Stikprøvens repræsentativitet

Vores referenceområder er baseret på resultater fra en stikprøve på 30 plasmadonorer. Om end vi ikke med sikkerhed kan udelukke, at donorerne har nedsat proliferationsevne, må disse betragtes som det bedste bud på repræsentanter for baggrundsbefolkningen med normal T-celle proliferationsevne. Dette eftersom plasmadonorer er underlagt en lang række helbredsmæssige krav. Samtidig var dette af praktiske og etiske hensyn det mest hensigtsmæssige, idet der i forvejen udtages blodprøver ved plasmafereser. Det at stikprøven er udtaget blandt plasmadonorer, kan imidlertid medføre en række begrænsninger ift. de patienter referenceområdet skal anvendes til diagnostik af. For det første er plasmadonorer mellem 17 og 75 år (35), hvorfor kun disse aldersområder kan være repræsenteret i vores referenceområder. Dette kan være en udfordring, idet PID ofte diagnosticeres i barnealderen. Denne problematik belyses i **Stone et al. (14)**, som påpeger, at anvendelse af voksne kontroller, kan føre til en systematisk underestimering ved diagnostik af børn. Heri henvises videre til et studie af **Hicks et al. (36)**, hvor man fandt at proliferationsevnen ved stimulation med mitogener falder 50% fra spædbarns- til voksenalderen. Når resultater fra børn sammenlignes med referenceområder, baseret på resultater fra raske voksne, indebærer det derfor en risiko for, at børn med nedsat proliferationsevne får falsk negative svar. Denne pointe bakkes videre op af, at *European Society for Immunodeficiencies*, i en opdateret diagnostisk protokol fra 2011 (**E de Vries et al. (37)**), anbefaler at anvende alders-matched kontroller til T-celle proliferations analyser. Af både etiske og praktiske årsager var det ikke muligt at inkludere børn i vores projekt. Klinikerne kan dog med fordel have dette med i overvejelserne ved tolkning af analyser foretaget på børn.

En anden faktor der kan spille ind, når stikprøven udtages blandt plasmadonorer er, at det ikke kan udelukkes, at den samme donor indgår i projektet flere gange. Dette eftersom prøverne blev indsamlet over 5 uger, og der kun kræves 11 døgns pause mellem to plasmafereser (35). Samtidig blev donorerne anonymiseret og udvalgt tilfældigt af personalet i Blodbanken. Hvis to resultater stammer fra samme donor, vil det i stedet for den *inter*-individuelle variation, være den *intra*-individuelle variation der undersøges mellem de to resultater. Under antagelse af, at den *intra*-individuelle variation generelt er mindre end den *inter*-individuelle, ville dette kunne få den biologiske variation i vores resultater til at se mindre ud, end den reelt er. At dette skulle være sket flere gange,

vurderes dog som værende mindre sandsynligt.

Om en stikprøvestørrelse på 30 donorer er tilstrækkelig til at repræsentere T-cellers proliferationsevne blandt alle i Region Nordjylland, som referenceområdet skal være gældende for, er tvivlsomt. På den ene side ses ved flere af vores histogrammer enkelte resultater, som ligger væsentligt lavere end de øvrige. For at kunne vurdere, om dette er udtryk for almindelig biologisk variation, eller om disse donorer udgør "særtilfælde", vil det være nødvendigt med en større stikprøve. Dette var dog af tids- og ressourcemæssige årsager ikke muligt indenfor projektets rammer. På den anden side, må viden om hvordan resultater fra 30 donorer fordeler sig give et væsentligt større indblik i normalområdet for T-cellers proliferationsevne, end de 1-2 kontroller der har været anvendt hidtil.

## 6.2 Gating

Flere forskellige parametre ved vores metode til gating kan have haft en indvirkning på vores resultater.

Først og fremmest er data for procentdelen af prolifererede celler afhængig af manuel placering af gates, og dermed subjektive vurderinger.

Da gates var foruddefinerede i analyseskabelonen, og grænserne mellem de enkelte cellepopulationer i de fleste tilfælde var tydelige, drejer det sig dog formentlig om en afvigelse på få procent.

Placering af gates omkring de prolifererede CD3+ celler i plot 9 (*Figur 26*), kunne dog være en udfordring, da plottet indeholder både CD4+ og CD8+ celler. Ideelt skulle gaten placeres mellem populationen af celler i generation 0 og 1 for både populationen af CD4+ og CD8+ celler. Eftersom CD8+ celler generelt lå lidt længere til højre på x-aksen end de CD4+ celler, var dette ikke altid muligt. Resultatet af procentdelen af prolifererede CD3+ celler, afhænger således af, om gaten blev placeret ud fra populationen af CD4+ eller CD8+ celler.

En anden usikkerhed ved vurdering af procentdelen af alle prolifererede CD3+ celler er, at der formentlig også indgår andre celletyper end T-celler i plot 9 (*Figur 26*), herunder f.eks. monocytter, B- og NK-celler. Dette eftersom cellerne overføres fra gaten i plot 4 (*Figur 24*), som også indeholder celler der hverken er CD4+ eller CD8+. Afhængigt af om disse celler er placeret indenfor eller udenfor gaten af prolifererede CD3+ celler i plot 9, vil de fejlagtigt medregnes som hhv. prolifererede eller ikke-prolifererede T-celler, og dermed påvirke resultatet.

I plot 10 og 11 (*Figur 26*) overføres cellerne derimod specifikt fra hver sin gate af hhv. CD4+ og CD8+ celler fra plot 5 (*Figur 24*), hvorfor de udefinerede celler ikke i samme grad spiller ind på resultaterne her.

Ud fra disse betragtninger kan det overvejes at undlade at vurdere procentdelen af prolifererede CD3+ celler ved analyse af patientprøver, da det ikke umiddelbart bidrager til information som procentdelen af prolifererede CD4+ og CD8+ ikke kan give.

Alternativt kunne det overvejes at inddrage fluorescens-mærkede antistoffer rettet mod

overflademærkerne CD14, CD19 og CD56, som findes på hhv. monocytter, B-celler og NK-celler, hvorved disse ville kunne ekskluderes. Om dette vil kunne betale sig økonomisk og tidsmæssigt afhænger af, hvor stor indvirkning disse celler viser sig at have på resultatet.

### 6.3 Metode til beskrivelse af referenceområde

Til beskrivelse af referenceområder blev anvendt histogrammer samt beregnet 0,05-fraktiler, sv.t. den værdi 95% af de inkluderede donorer har værdier over. Formålet med beregning af en 0,05-fraktiler var at fastlægge en objektiv beslutningsgrænse, til at skelne patienter med nedsat proliferationsevne fra raske individer. Dette for at gøre diagnostik af patienter mere entydig.

Om vores beregnede fraktiler reelt repræsenterer de værdier 95% af alle raske individer ligger over er imidlertid tvivlsomt. Da stikprøven kun er baseret på 30 donorer, har resultatet for hver enkelt donor stor indflydelse på størrelsen af den beregnede 0,05-fraktil. F.eks. vil de beregnede fraktiler blive betydeligt højere, hvis donor 6, som i samtlige histogrammer ligger væsentlige lavere end de øvrige donorer, blev ekskluderet.

Da en beregnet beslutningsgrænse baseret på en stikprøve altid vil være forbundet med en vis usikkerhed, vil det sandsynligvis, uanset stikprøvens størrelse, være mere sikkert at klinikerne i hvert enkelt patienttilfælde vurderer, hvor patienten ligger ift. de raske donorer i histogrammerne. I vurderingen af, hvorvidt patientens proliferationsevne er nedsat, kan herved også inddrages viden om hvor meget proliferationsevnen typisk er nedsat hos den PID-undertype der mistænkes, samt hvorvidt sensitivitet eller specificitet prioriteres højest i det enkelte tilfælde.

### 6.4 Metodeafvigelser

Som præsenteret i afsnit 5.1 (s. 31) måtte vi ved enkelte prøver afvige fra standard-metoden. Nogle af disse afvigelser vil blive diskuteret i det følgende.

#### 6.4.1 Gating uden singlet-gate

Donor 8 (1:500 PHA) er et eksempel på en prøve, som blev gatet uden benyttelse af singlet-gaten. Årsagen til dette er illustreret af *Figur 27*, hvor plottet med singlet-gaten for donor 8 er stillet op mod duplikatet, som repræsenterer en normal singlet-gate.

Af figuren fremgår forhøjede værdier på y-aksen (FSC-H signal) ift. duplikatet. En plausibel forklaring på dette kan være, kortvarig tilstedeværelse af en luftboble i flowcytometerets væskesystem, som kan gøre, at cellerne detekteres større end de reelt er. I og med at de øvrige plots med fluorescensmærkede antistoffer og CTV så normale ud, valgte vi at udelukke singlet-gaten fra gating-strategien.

Dette valg medfører, at der blandt de prolifererede celler i histogrammerne for denne prøve indgår flere dubletter. Dette kan potentielt føre til underestimering af procentdelen af prolifererede celler. Hvis dubletten f.eks. består af en prolifereret celle (lav CTV-intensitet) og en ikke-prolifereret celle (høj CTV-intensitet) vil de to celler pga. den høje samlede CTV-intensitet, formentlig detekteres som én ikke-prolifereret celle.

Samtidig kan der indgå dubletter af CD4+ og CD8+ celler. I og med at disse vil være positive for både CD4 og CD8, vil de ikke indgå i gaten af hverken CD4+ eller CD8+ celler, og dermed heller ikke i de tilsvarende histogrammer, hvor procentdelen af prolifererede celler vurderes. Til gengæld vil de indgå i gaten af CD3+ celler, hvorfor problemet formentlig vil være størst her.

Efter diskussion af dette med CIA's personale, blev vi dog enige om, at indvirkningen på det endelige resultat ville være så lille, at prøverne kunne inkluderes, uden singlet-gaten.

#### 6.4.2 Manglende fluorescens-mærkning af overflademærker

Af *Figur 28* blev vist et eksempel på plots fra donor 12 (1:4  $\alpha$ -CD3), hvor der kun var detekteret ganske få celler indenfor de foruddefinerede CD45/CD3/CD4/CD8-gates. Den mest sandsynlige forklaring på dette er, at der ved en fejl ikke var blevet tilsat fluorokrom-konjugeret antistof til prøven, forud for den flowcytometriske analyse. I plot 6 (*Figur 28*), hvor alle celler i prøven er inkluderet, fremgår det, at cellerne *er* farvet med CTV og *har* prolifereret. Men pga. manglende fluorescens-mærkning af de relevante overflademærker, er det ikke muligt at afgøre, *hvilke* celler der har prolifereret. Derfor valgte vi at ekskludere prøven.

Det at vi glemte at tilsætte antistof, gjorde os til gengæld opmærksomme på, at der indenfor gaten af prolifererede CD3+ celler i plot 9 (*Figur 28*), trods den manglende mærkning af overflademærker, ligger en population af celler. Pga. placeringen i gaten kan disse ved første øjekast tolkes som prolifererede CD8+. I og med at cellerne i prøven ikke antages at være farvet med CD45/CD3/CD4/CD8-antistof, og cellerne samtidig ikke findes i de foruddefinerede CD8-gates i plot 5 eller 11, formodes der dog at være tale om autofluorescens fra monocytter, B- og/eller NK-celler. Pga. cellernes placering i gaten i plot 9, vil disse altid indgå i gaten af prolifererede CD3+ celler, og dermed kunne føre til en overestimering heraf. Dette underbygger pointerne fra afsnit 6.2 om evt. at undlade en samlet vurdering af prolifererede CD3+ celler, eller alternativt udvide antistof-panelet.

#### 6.5 Analytisk variation og fejlkilder

Den variation der afspejles i vores resultater, vil sandsynligvis være en kombination af egentlig biologisk variation, som vi ønsker at undersøge, men også i større eller mindre grad tilfældig variation ifm. udførsel af analysen.

Jo større den *analytiske* variation er, jo mindre retvisende billede af den *biologiske* variation må histogrammerne antages at give. Hvilken type variation vores resultater er mest påvirket af, er imidlertid ikke mulig at skelne ud fra vores histogrammer.

Et bud på størrelsen af den analytiske variation kan dog opnås ud fra en vurdering af forskellen mellem de to resultater fra hver af vores dobbeltbestemmelser (fremgår udelukkende af rådata i *Bilag 9*). I langt størstedelen af tilfældene er denne forskel kun på få procent. Dette indikerer, at vores resultater generelt er præget af en meget lille analytisk variation. Særligt ift. hvad man kunne forvente ved en analyse som denne, med mange manuelle analysesteps. Samtidig vil analytisk variation aldrig kunne elimineres helt.



I enkelte tilfælde er forskellen mellem resultaterne fra dobbeltbestemmelserne dog helt op til 50%. Da der er tale om et fåtal, skyldes dette sandsynligvis fejl ifm. udførelse af analysen af de pågældende prøver.

Da analysen indebærer mange steps, er der også mange potentielle fejlkilder. Den største fejlkilde forventes dog at være tab af celler i procedurerne fra stimulation af cellerne frem til den flowcytometriske analyse. Dette kan f.eks. ske, når cellerne overføres fra 96-brønds pladen til falconrør inden farvning med fluorescens-konjugerede antistoffer, eller ved de efterfølgende vaskeproducerer. Hvis mange celler går tabt, vil procentdelen af prolifererede celler for de enkelte prøver kunne påvirkes i enten positiv eller negativ retning, afhængigt af om de mistede celler havde prolifereret eller ej.

Andre fejlkilder kan være at cellerne stimuleres med ukorrekte fortyndinger af stimuli, eller at der sker kontaminering fra én donorprøve til en anden under isolering og farvning med CTV af PBMC. Sidstnævnte vil dog ikke afsløres af en afvigelse af resultaterne for dobbeltbestemmelserne, da donorprøverne først efterfølgende opdeles i dobbeltbestemmelser i hver sin række i 96-brønds pladen.

## 6.6 Diskussion af resultater

Til stimulation af T-celler blev der anvendt 2 fortyndinger af mitogenet PHA hhv. 1:100 (100 µg/mL) og 1:500 (20 µg/mL) og 3 fortyndinger af  $\alpha$ -CD3, hhv. 1:2, 1:4 og 1:8. Hvilke fortyndinger der bedst beskriver den biologiske variation, og hvilke der er mest anvendelige ift. diagnostik af patienter kan diskuteres ud fra vores resultater.

Af histogrammerne ved stimulation med 1:100 PHA (*Figur 29-31*) ses generelt, at størstedelen af resultaterne ligger i et snævert interval mellem 80 og 96%. Ud fra denne betragtning må disse histogrammer på den ene side kunne udgøre et relativt entydigt sammenligningsgrundlag til tolkning af patientprøver. På den anden side kan man argumentere for, at der ikke nødvendigvis opnås et retvisende billede af den biologiske variation, når flere af resultaterne nærmer sig 100%. Samtidig risikeres det ved anvendelse af en så kraftig stimuli, som 1:100 PHA, at celler i patientprøver med let nedsat proliferationsevne også prolifererer så kraftigt, at de ikke kan skelnes fra donorerne, hvorved falsk negativt svar risikeres. Dette kan dog ikke hverken be- eller afkræftes, eftersom vi i dette projekt ikke har haft mulighed for at analysere patientprøver med kendt nedsat proliferationsevne.

Omvendt ses af histogrammerne med den laveste koncentration af PHA 1:500 (*Figur 32-34*), at resultaterne fordeler sig ud over et bredt interval (ca. 20-90%). Herved opnås sandsynligvis et mere retvisende billede af den biologiske variation. Til gengæld kan det være mere udfordrende at give et entydigt svar på, hvorvidt proliferationsevnen i en patientprøve er nedsat, ud fra histogrammerne eller 0,05-fraktilerne.

Alene ud fra vores resultater, og med det forbehold at vi ikke ved, hvor patienter ville ligge, vil det derfor måske være en fordel at inkludere en ekstra fortynding af PHA på f.eks. 1:250-fortynding (40 µg/µL). Dette i håbet om at få resultater i et mere snævert interval end ved 1:500, men med en større afstand til 100%, end ved 1:100 PHA, ligesom der ses ved vores

histogrammer ved stimulation med 1:4  $\alpha$ -CD3 (Figur 38-40).

Af histogrammerne ved stimulation med fortyndingerne af  $\alpha$ -CD3 gør samme mønster sig gældende, idet der ses lavere og mere spredte resultater, jo større fortynding af  $\alpha$ -CD3 der anvendes. Stimulation med 1:2  $\alpha$ -CD3 ser dog generelt ud til ikke at give et nær så kraftigt proliferativt respons som 1:100 PHA, og derudover ses også en lidt større spredning af resultaterne. Dermed giver denne fortynding muligvis et mere retvisende billede af den biologiske variation, og kan derfor også sandsynligvis være mere anvendelig ift. diagnostik end 1:100 PHA.

Ved stimulation med 1:8  $\alpha$ -CD3 (Figur 41-43) fordeler resultaterne sig jævnt mellem 3 og 83%. En 1:8 fortynding af  $\alpha$ -CD3 må herudfra vurderes at give et for svagt proliferativt signal, til at hverken histogrammer eller 0,05-fraktiler vil kunne bidrage til skelne patienter med nedsat proliferationsevne fra raske individer.

## 6.7 Sammenligning med videnskabelige studier

Vi har ifm. projektet forsøgt at identificere videnskabelige studier, som ligesom os har haft til formål at undersøge den biologiske variation i T-cellers proliferationsevne eller beskrive et referenceområde til in vitro T-celle proliferationsanalyse. Dette med henblik på evt. metode- og/eller resultatsammenligning.

Trods anvendelse af forskellige søgestrategier i forskellige databaser (Bilag 8), var det dog generelt en udfordring. En mulig forklaring på dette kan være, at relativt få patienter diagnosticeres med PID. Derfor har forskning i en analyse, som udelukkende anvendes hertil, måske heller ikke har været af højeste prioritet. Vi fandt dog et par nyere videnskabelige studier, som vil blive diskuteret i det følgende.

**Alsalamah et al.** fra 2019 (13) fremhæver netop det problematiske i, at der, trods proliferations analyser har været anvendt diagnostisk i over 50 år, endnu ikke er etableret referenceområder. I studiet udføres T-celle proliferations analyse på blodprøver fra 440 raske kontroller. Herudfra angives 95%-referenceintervaller ved beregning af 0,025 og 0,975-fraktiler. Vigtigt at bemærke er, at studiet anvender den nuværende "guldstandmetode" baseret på mærkning af cellerne med radioaktivt mærket thymidin. Derfor udgøres værdierne i intervallet af "stimulations-indexer", og ikke en procentdel af prolifererede celler som vores resultater. Dermed er en direkte resultatsammenligning ikke meningsfuld. Trods dette diskuteres en række pointer med relevans for vores projekt. Først og fremmest når studiet frem til et bredt interval ([134; 2220,5]), hvilket er et udtryk for, at der også eksisterer en stor biologisk variation, når der inddrages en større stikprøve end i vores projekt. Studiet påpeger derfor, at tolkning af patientprøver ud fra kontroller alene, indebærer en betydelig risiko for falsk positive og falsk negative analysesvar. Studiet inddrager endvidere resultater fra 39 patienter med SCID og 52 patienter med CID. Blandt patienterne med SCID blev der beregnet stimulationsindexer på mellem 0 og 4,1. Da disse ligger betydeligt under referenceintervallets nedre grænse, konkluderes det, at nedsat proliferationsevne hos disse patienter vil være forholdsvist let at identificere.

Ved gruppen af CID findes stimulationsindexer mellem 0,8 og 241,3. Ift. dette kan patienter med andre undertyper af PID, altså have en mindre nedsat proliferationsevne. Nogle af disse vil muligvis risikere falsk negativt svar, hvis der alene tolkes ud fra referenceintervallets nedre grænse. Det samme vil sandsynligvis gøre sig gældende når analysen foretages flowcytometrisk. Dette understreger en af de risici, der er forbundet ved udelukkende at anvende referenceintervaller/fraktiler til vurdering af patientprøver, og underbygger således også vores valg om også at præsentere resultater i form af histogrammer.

I **Marits et al.** (2014) (12) præsenteres ligeledes 95%-referenceintervaller, som anvendes til proliferations analyse på *Karolinska University Hospital* i Stockholm. Intervallet er baseret på beregninger af 0,025- og 0,975-fraktiler ud fra målinger på over 100 raske bloddonorer. Trods der her benyttes en flowcytometrisk analyse, varierer metoden betydeligt fra vores. Analysen foretages bl.a. på fuldblod og udføres på en anden type flowcytometer, som i stedet for procentdelen, måler antallet af prolifererede celler pr.  $\mu\text{L}$  blod. Herved er en direkte resultatsammenligning heller ikke mulig ift. dette studie.

I **Azariz et al.** (38) fra 2017 undersøges anvendelsen af en flowcytometrisk T-celleproliferations analyse til diagnostik af patienter med PID. Selvom studiets formål ikke direkte er at definere et referenceinterval, analyseres 25 raske individer, hvorefter middelværdien  $\pm$  SD benyttes til at afgøre, hvorvidt proliferationsevnen hos 46 patienter med klinisk mistanke om PID har nedsat proliferationsevne. Resultater angives, ligesom i vores metode, som procentdelen af prolifererede T-celler.

For de 25 kontroller udregnes middel  $\pm$  SD til  $67,9 \pm 8,79\%$ . For at kunne vurdere, hvordan dette stemmer overens med vores resultater, har vi for vores resultater for CD3+ celler ved stimulation med 1:500 PHA forsøgt at beregne en tilsvarende værdi, hvorved vi fik  $57,20\% \pm 15,04\%$ . Det skal dog bemærkes, at vi i vores projekt bevidst har fravalgt beregning af middelværdier og spredning, idet vi vurderede, at dette kun vil være meningsfuldt at anvende som referenceområde, såfremt data er normalfordelte. Derfor er denne beregning udelukkende foretaget, for at gå med på studiets præmis.

Taget i betragtning, at de i studiet stimuleres med den halve koncentration af PHA (1  $\mu\text{g}$  pr 100  $\mu\text{L}$ ), kunne man alene ud fra vores idé om, at målingerne spredtes mere og blive mindre, jo mindre kraftig stimuli der anvendes, forvente, at middelværdien i studiet havde været lavere. At dette ikke er tilfældet *kan* være et resultat af, at donorerne inkluderet i vores projekt i gennemsnit har højere proliferationsevne end kontrollerne inkluderet i studiets, og dermed et udtryk for stor biologiske variation. Dette ville understrege vores pointe om at hverken 25 eller 30 raske individer nødvendigvis er udtømmende ift. at beskrive denne. Det er dog vigtigt at bemærke, at studiets metode på flere punkter afviger fra vores. Bl.a. anvendes et andet fluorescerende farvestof end CTV, inkubationstiden er mindre, og der anvendes et flowcytometer fra et andet mærke og en anden gatingstrategi. Samtidig fremgår det ikke klart af metodeafsnittet, hvor stort cellevolumen, stimuli tilsættes, hvilket

er afgørende for de endelige resultater. Derfor er ovenstående alene baseret på antagelser. Studiet analyserer desuden proliferationsevnen hos 46 patienter, som i løbet af studiets varighed (5 år) diagnosticeres med forskellige undertyper af PID. Her beregnes middel  $\pm$  SD til  $31,1 \pm 28,8\%$ . Den store SD indikerer her, ligesom i **Alsalamah et al.**, at T-cellers proliferationsevne også kan variere blandt de enkelte typer af PID, hvilket må tages med i overvejelserne ved tolkning af patientprøver.

Det at alle de omtalte studier benytter metoder til proliferationsanalysen som i større eller mindre grad afviger fra vores, påpeger en anden mulig forklaring på vores udfordring ift. at identificere lignende studier; Så længe der ikke findes en standardiseret metode til udførelse af analysen, er det heller ikke muligt at fremstille referenceområder, som kan benyttes på tværs af laboratorier. Beskrivelse af referenceområder vil således kun have værdi, for det laboratorie det er fremstillet i.

Ydermere giver studierne udtryk for, at der eksisterer en stor biologisk variation i T-celle proliferationsevne både blandt raske individer, men også mellem de enkelte patienter. Dette indikerer at vurdering af proliferationsevne ikke er sort-hvid og understreger vores pointe om, at tolkning af patientprøver ikke nødvendigvis kan ske ud fra standardiserede kvantitative beslutningsgrænse. Trods dette må information om hvordan 30 donorer fordeler sig trods alt udgøre bedre sammenligningsgrundlag end 1-2 kontroller alene.

## 7 Konklusion

På baggrund af stor variation i de opnåede resultater blandt de inkluderede donorer, er det uklart, hvorvidt vores stikprøve på 30 donorer, giver et retvisende billede af den generelle biologiske variation i T-cellers proliferationsevne. Derfor må det også konkluderes, at benyttelse af vores fremstillede histogrammer og beregnede 0,05-fraktiler til tolkning af patientprøver er forbundet med en vis usikkerhed, hvorfor fraktilerne ikke udgør entydige diagnostiske beslutningsgrænser.

Hvilke af de fremstillede histogrammer og 0,05-fraktiler, der om nogle, vil være mest anvendelige ift. diagnostik af patienter med nedsat proliferationsevne, er uklart, pga. manglende mulighed for inddragelse af patientprøver. Inddraget videnskabelig litteratur indikerer dog, at graden af nedsættelse i proliferationsevne kan variere afhængigt af PID-undertypen.

Trods dette konkluderes det, at vores histogrammer og fraktiler i kombination med viden om de enkelte PID-undertyper, må udgøre et mere solidt sammenligningsgrundlag til tolkning af patientprøver end 1-2 kontroller alene.

## 8 Perspektivering

I dette projekt er der blevet forsøgt beskrevet referenceområder til in vitro proliferationsanalyse på KIA, AaUH. Denne analyse kan bidrage til udredning af patienter mistænkt for primær immundefekt. I foråret 2022 er netop denne patientgruppe blevet godkendt til at modtage helgenomsekventering via Nationalt Genom Center, som led i deres sygdomsudredning. Dette forventes at kunne bidrage til mere præcis diagnostik, og dermed også mere målrettet og individualiseret behandling.

Med sekventering følger imidlertid også et øget behov for afklaring af, hvorvidt fundne varianter i genotypen er årsag til patientens fænotypiske tilstand. Til dette er immunologiske analyser nødvendige. Dermed forventes den analyse vores projekt centrerer sig om, også at blive udført i stigende grad i de kommende år. Dette gør det kun endnu vigtigere at analysesvarene er af høj kvalitet, hvilket vores referenceområder forventes at kunne bidrage til. Den øgede udførelse af analysen i fremtiden, ser vi desuden som en oplagt mulighed for, at afdelingen inkluderer donorblodprøver ved hvert analyseopsæt, hvorved referenceområderne med tiden vil kunne udbygges og kvalificeres yderligere (39).

## 9 Referenceliste

1. Immun Defekt Foreningen. Immundefekter [Internet]. 2022 [henvist 6. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://idf.dk/immunsystemet/immundefekter>
2. Larsen CS, Guldager N. Primær immundefekt [Internet]. Sundhed.dk. 2019 [henvist 6. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.sundhed.dk/sundhedsfaglig/information-til-praksis/midtjylland/almen-praksis/patientforloeb/forloebbeskrivelser/b-blod-lymfe-og-immunsystem/primaer-immundefekt/>
3. Bay JT m. fl. Immunologi og transfusionsmedicin. 4. udgave. Nielsen O, Vestergaard KP, redaktører. Kbh.: Munksgaard; 2017.
4. Larsen CS, redaktør. Primære immundefekter. I: Immunologi. 1. udgave. Kbh.: FADL; 2017. s. 275–89.
5. Marquart HV. Retningslinjer for diagnostik og behandling af primær immundefekt [Internet]. 3. udgave. Region Hovedstaden; 2018 [henvist 24. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.regionh.dk/blodbanken/afdelingen/enheder-paarigshospitalet/Documents/retningslinier-for-diagnostik-og-behandling-af-primaer-immundefekt.pdf>
6. Eriksen LL. Flowcytometrisk T-celleproliferationsanalyse med CellTrace™ Violet. Stimulation med PHA og anti-CD3/28. Klinisk Immunologisk Afdeling, Aalborg Universitetshospital; 2022.
7. Marquart HVH, Nielsen KR, Sækmose SG, Berington T, Jensen JMB. National anbefaling for udredning af immundefekt i Klinisk Immunologi [Internet]. Dansk Selskab for Klinisk Immunologi; 2021 [henvist 24. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://dski.dk/retningslinjer-2/>
8. Sundhedsministeriet. Danmark indfører screening af spædbørn for alvorlig og dødelig immundefekt [Internet]. 2019 [henvist 9. april 2022]. Tilgængelig hos: [https://sum.dk/nyheder/2019/november/danmark-indfoerer-screening-af-spaedboern-for-alvorlig-og-doedelig-immundefekt?fbclid=IwAR2b4N2XQSSGJOCrmZBcH5rh2\\_v6EkRq5SB8Qa5DfGuwAxPXE3eM5UKvET4](https://sum.dk/nyheder/2019/november/danmark-indfoerer-screening-af-spaedboern-for-alvorlig-og-doedelig-immundefekt?fbclid=IwAR2b4N2XQSSGJOCrmZBcH5rh2_v6EkRq5SB8Qa5DfGuwAxPXE3eM5UKvET4)
9. Brot C. Meddelelse til landets obstetriske, pædiatriske, klinisk genetiske og klinisk immunologiske afdelinger, m.fl. om implementering af national screening for SCID via hælblodprøven hos nyfødte pr. 1 februar 2020 [Internet]. Sundhedsstyrelsen. 2019 [henvist 9. april 2022]. Tilgængelig hos: [https://www.sst.dk/-/media/Udgivelser/2020/Implementering-af-national-screening-for-SCID/Meddelelse-vedr\\_-implementering-af-neonatal-screening-for-SCID-per-1\\_-februar-2020.ashx?sc\\_lang=da&hash=086A2C07871EA0460E1D0C6B3C23E376](https://www.sst.dk/-/media/Udgivelser/2020/Implementering-af-national-screening-for-SCID/Meddelelse-vedr_-implementering-af-neonatal-screening-for-SCID-per-1_-februar-2020.ashx?sc_lang=da&hash=086A2C07871EA0460E1D0C6B3C23E376)
10. Bendtzen K, Marker O, Svehag SE, Svejgaard A, Kilian M. Basal og klinisk immunologi. 3. udgave. Kbh.: FADL; 2000.

11. Bilde ALF. Celleproliferations assays. Stimulation med mitogener, antigener og allogene celler. Klinisk Immunologisk Afdeling, Aalborg Universitetshospital; 2019.
12. Marits P, Wikström AC, Popadic D, Winqvist O, Thunberg S. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clinical Immunology*. 2014;153(2):332–42.
13. Alsalamah M, Vong L, Cimpean L, Dadi H. Establishing reference ranges for lymphocyte proliferation responses to phytohemagglutinin in patients with T cell dysfunction. *LymphoSign Journal*. 1. marts 2019;6(1):26–30.
14. Stone KD, Feldman HA, Huisman C, Howlett C, Jabara HH, Bonilla FA. Analysis of in vitro lymphocyte proliferation as a screening tool for cellular immunodeficiency. *Clin Immunol*. april 2009;131(1):41–9.
15. Muir T. Peripheral Blood Mononuclear Cells - A Brief Review [Internet]. StemExpress. [hentet 30. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://stemexpress.com/peripheral-blood-mononuclear-cells/>
16. Hokland M, redaktør. Det innate immunforsvar - cellulær immunitet. I: *Immunologi*. 1. udgave. Kbh.: FADL; 2017. s. 67–75.
17. Eggertsen PP, Rabe O, redaktører. T-celler. I: *Immunologi*. 1. udgave. Kbh.: FADL; 2017. s. 103–31.
18. Mak TW, Saunders ME. *The immune response: Basic and Clinical Principles*. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2006.
19. Fischer A. Primary T-lymphocyte immunodeficiencies. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2001;20(1):3–26.
20. McCusker C, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011;7(Suppl 1):S11.
21. Roifman CM, Somech R, Kavadas F, Pires L, Nahum A, Dalal I, m.fl. Defining combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(1):177–83.
22. Merico D, Sharfe N, Hu P, Herbrick JA, Roifman CM. RelB deficiency causes combined immunodeficiency. *LymphoSign Journal*. 2015;2(3):147–55.
23. Begum J, Day W, Henderson C, Purewal S, Cerveira J, Summers H, m.fl. A method for evaluating the use of fluorescent dyes to track proliferation in cell lines by dye dilution: *Cell Lines and Proliferation Dyes*. *Cytometry*. december 2013;83(12):1085–95.
24. Osinski V. Isolating immune cells from peripheral blood [Internet]. Novus Biologicals. 2019 [hentet 30. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.novusbio.com/antibody-news/isolating-immune-cells-from-peripheral-blood-how-and-when-to-use-density->

gradient-centrifugation

25. Stemcell Technologies. Lymphoprep - Density gradient medium for the isolation og mononuclear cells [Internet]. 2022 [henvist 30. april 2022]. Tilgængelig hos: [https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000000358-PIS\\_04.pdf?\\_ga=2.211294549.133457067.1651239547-1937122680.1651239547](https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000000358-PIS_04.pdf?_ga=2.211294549.133457067.1651239547-1937122680.1651239547)
26. Bick DJ. Optimization of Cell Proliferation Analysis Using Flow Cytometry [Internet]. 2021 [henvist 17. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.flowmetric.com/cytometry-blog/optimization-cell-proliferation-flow-cytometry>
27. Poltorak MP, Graef P, Tschulik C, Wagner M, Cletiu V, Dreher S, m.fl. Expamers: a new technology to control T cell activation. *Sci Rep.* 20. oktober 2020;10(1):17832.
28. Schrøder HD, Preiss BS, Schleidermann D, Bak M, Hansen TP, Jylling AMB, m.fl. Klinisk patologi. I: Thomsen HS, redaktør. *Diagnostiske fag.* Kbh.: Munksgaard; 2016. s. 185–226.
29. Manohar SM, Shah P, Nair A. Flow cytometry: Principles, applications and recent advances. *Bioanalysis.* februar 2021;13(3):181–98.
30. BioRad. Flow Cytometry Basics Guide [Internet]. [henvist 10. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2022/flow/flow-cytometry-basics-guide.pdf>
31. Miltenyi Biotec. Flow cytometry basics [Internet]. [henvist 8. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/resources/macshandbook/macstechnologies/flow-cytometry/flow-cytometry-basics.html>
32. Bio-Rad. Live / Dead Cell Exclusion - Flow Cytometry Guide [Internet]. Bio-Rad. [henvist 17. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-live-dead-exclusion.html>
33. Medical & Biological Laboratories. Labeled antibodies [Internet]. MBL Life Science. [henvist 17. april 2022]. Tilgængelig hos: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/conjugated.html>
34. Hughes OR, Stewart R, Dimmick I, Jones EA. A critical appraisal of factors affecting the accuracy of results obtained when using flow cytometry in stem cell investigations: Where do you put your gates? *Cytometry Part A.* 2009;75A(9):803–10.
35. Dansk Selskab for Klinisk Immunologi. Transfusionsmedicinske Standarder [Internet]. 2022 [henvist 24. maj 2022]. Tilgængelig hos: <https://dski.dk/wp-content/uploads/2022/03/tms-5-3.pdf>
36. Hicks MJ, Jones JF, Thies AC, Weigle KA, Minnich LL. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte function from birth to old age. *Am J Clin Pathol.* august 1983;80(2):159–63.



37. de Vries E. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. Clin Exp Immunol. 2012;167(1):108–19.

38. Azarsiz E, Karaca N, Ergun B, Durmuscan M, Kutukculer N, Aksu G. In vitro T lymphocyte proliferation by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester method is helpful in diagnosing and managing primary immunodeficiencies. J Clin Lab Anal. 2018;32(1).

39. Patienter med primær immundefekt tilbydes nu omfattende genetiske analyser via Nationalt Genom Center (NGC) [Internet]. [henvist 29. maj 2022]. Tilgængelig hos: <http://ngc.dk/nyheder/2022/maj/trine-mogensen>

## 10 Bilagssamling

Bilag 1 – Reference 11 - Celleproliferations assays. Stimulation med mitogener, antigener og allogene celler (ikke-offentligt tilgængeligt dokument)

Bilag 2 – Reference 6 - Flowcytometrisk T-celleproliferationsanalyse med CellTrace™ Violet. Stimulation med PHA og anti-CD3/28 (ikke-offentligt tilgængeligt dokument)

Bilag 3 - Reagenser, apparatur og utensiler

Bilag 4 – Information til donorer

Bilag 5 - Sysmex XN-1000 (ikke-offentligt tilgængeligt dokument)

Bilag 6 - Antigen og mitogen opløsninger (ikke-offentligt tilgængeligt dokument)

Bilag 7 - Flowcytometri på NovoCyte 3000 - NovoCyte Advanteon (ikke-offentligt tilgængeligt dokument)

Bilag 8 - Litteratursøgning

Bilag 9 - Rådata og beregninger

Bilag 10 - Rådata NovoExpress