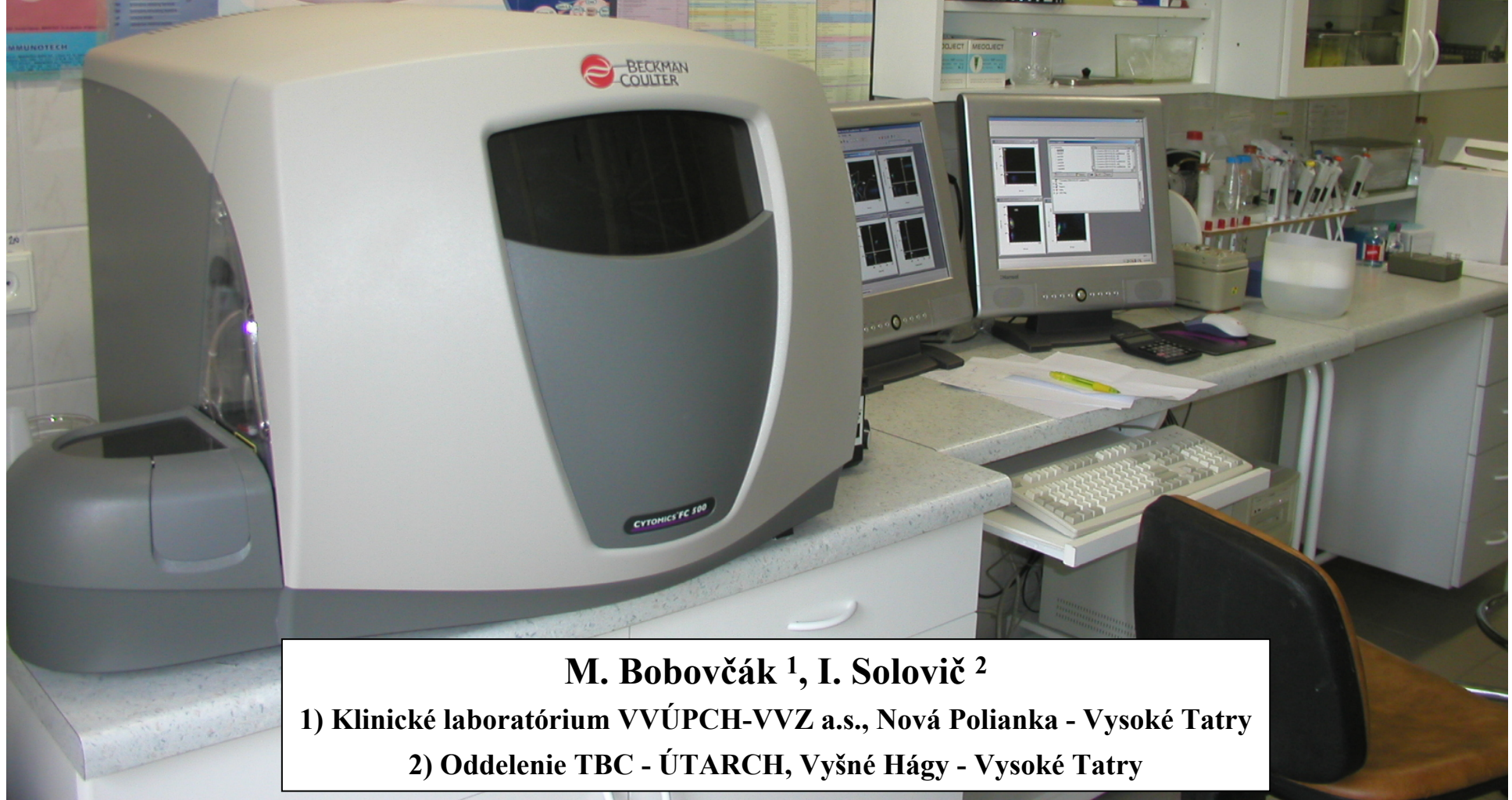


Beckman Coulter - Uživatelské stretnutie Prerov 2007

Detekcia antigén špecifických T lymfocytov u TBC



M. Bobovčák ¹, I. Solovič ²

1) Klinické laboratórium VVÚPCH-VVZ a.s., Nová Polianka - Vysoké Tatry

2) Oddelenie TBC - ÚTARCH, Vyšné Hágy - Vysoké Tatry

Prečo práve TBC ?



- 1/3 svetovej populácie je latentne infikovaná TB - migrácia
- pacient s aktívnou neliečenou tbc infikuje 10-15 / ročne
- 10% riziko ochorenia u imunokompetentných / život
- 10% riziko ochorenia u imunokompromitovaných / rok (HIV)
- každoročne umiera na TBC infekciu 2 000 000 ľudí
- TB eliminácia - diagnostika a liečebná profylaxia !!!

Diagnostika TBC

Aktívna TBC

- RTG, šítkovanie
- Zlatý štandard – mikroskopia, kultivácia z rôzneho materiálu
- PCR – molekulárna biológia
- TST – screening (PPD) interpretačné problémy, vakcinácia
- anti TB protilátky
- dôkaz TB reaktívnych buniek v krvi (Th1,Tc1,Tc2?) **POMOCNÉ VYŠETRENIE !**

Latentná TBC

Dôkaz TB reaktívnych buniek v krvi =? TB antigén špecifická T bunková odpoveď

Techniky in vitro a detekcia odpovede: kultivácia s antigénom

1, Tradičné - radioaktívne, ^{51}Cr -release, ^3H -Tymidín inkorporácia.

2, Sekrécia aktivačných molekúl, chemokínov, cytokínov....ELISA, ELISPOT

3, Aktivačné molekuly kultivovaných buniek, povrchová a intracelulárna detekcia - Flow cytometry.

Detekcia antigén špecifických T lymfocytov

Antigény u TB

PPD – hrubý extrakt BCG a enviromentálnych MB 100% senzitivita, 0% špecifita !
RD1 lokus MTb antigény a odvodené peptidy (1995):

ESAT-6 , CFP-10, TB7.7(p4) evokujú silnú CMI – MB tuberculosis komplex =
(tbc, bovis, africanum)+ kansasii,szulgai, marinum. Neprítomné BCG, >env. M
Ag85, Rv2653.....

(Príprava novej substance pre TST a vakcíny)

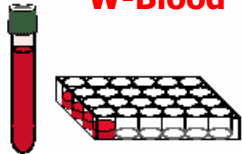
Použiteľné Techniky u TB

- Komerčná Quantiferon TB GOLD – (PPD) – detekcia uvoľneného IFNg – ELISA
- Komerčná Tspot.TB – (ESAT6,CFP10) – Elispot na báze IFNg
- Detekcia intracelulárneho IFNg, TNFa, IL2, IL4, IL12... Flow cytometry
- Detekcia povrchových molekúl CD69, CD40L, CD154 Flow cytometry
- Detekcia TB- ag špecifických buniek tetramér-peptid (ag prezentujúca molekula)
- Detekcia uvoľneného cytokínu capturing technikou na povrchu bunky (bivalent AB)

QaantiFERON- TB – Gold (in tube) Celestis


Stage One – Blood Stimulation and Harvesting

W-Blood

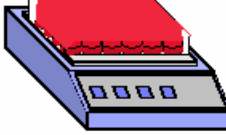


Dispense 1 mL of subject's heparinized whole blood into 4 wells of a 24-well culture plate.

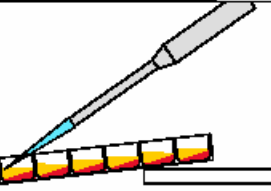
NIL, PHA, TBag



Add 3 drops of the appropriate stimulating antigen to each well.

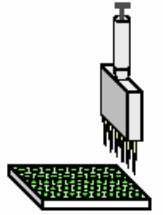


Shake covered plate for 1-2 min. Incubate for 16-24 hrs at 37°C (humidified).

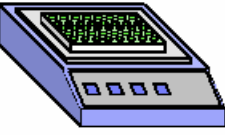


Harvest at least 200 μ L plasma from each well. Store in racked microtubes or uncoated microplates.

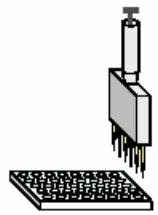
Stage Two – Human IFN- γ ELISA



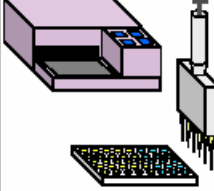
Add 50 μ L of conjugate solution to each well. Add 50 μ L of plasma or standard.




Shake covered plate for 1 min. Incubate for 120 minutes at Room Temperature.



Wash plate \geq 6 times. Add 100 μ L of substrate. Incubate 30 min. at Room Temperature.



Add 50 μ L of stop solution. Read absorbance within 5 min at 450nm (620-650nm ref).



Calculate Results using standard analysis programs (QFT-Gold Analysis Software available soon).

Citlivost': 70-90 %
Špecifita: 80-99 %
podľa oblasti rizika infekcie,
99% u lat. infekcie
BCG vakcinácia OK

cellestis

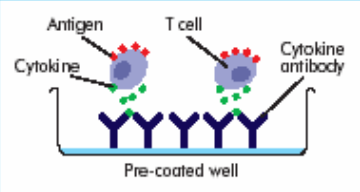
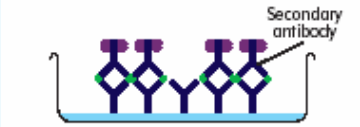
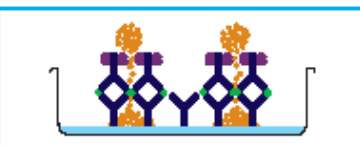
Výhody:

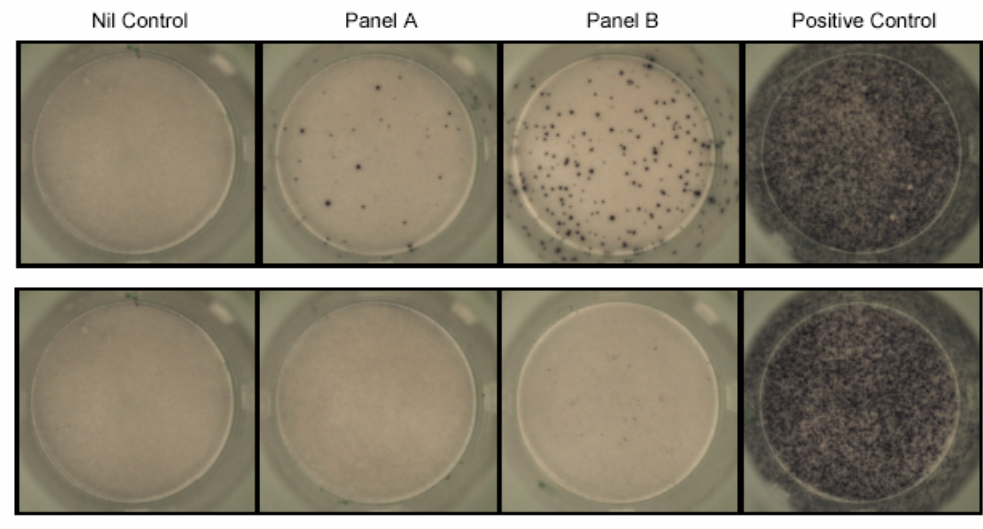
In tube možnosť kultivácie pre 1 pacienta
laboratórne menej náročné – menej chýb
skladaný test, Antigény, Skúmavky, ELISA
Termostat, centrifúga, E-reader, washer

Nevýhody:

Povaha imunologickej odpovede?
Cena – 800 Sk / pacienta
Počet buniek v kultivácii – intenzita?

T-SPOT.TB – Oxford Immunotec

Step 1	Collect the blood sample and centrifuge to separate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)	
Step 2	Wash and count the PBMCs	
Step 3	Add PBMCs to wells with antigens and incubate overnight (37°C, CO ₂)	
Step 4	Wash and add secondary antibody	
Step 5	Add substrate and count any resulting spots. One spot = one T cell	



Citlivosť: 80-97 %,

Špecifita: 85-99 %

podľa oblasti rizika infekcie

BCG vakcinácia OK

Nevýhody:

Povaha imunologickej odpovede?
laboratórne intenzívne – viac chýb
väčšie nároky na sterilitu

Termostat CO₂, mikroskop, centrifúga,
reader, washer, chemikálie, TK-plastware
8 – strip test, pre viac pacientov
Cena – 1200 Sk / pacienta

Výhody:

Štandardný počet bb – PBMC
odráža počet efektorových buniek
monitorovanie terapie?

Detekcia antigén špecifických T lymfocytov – Flow cytometry

Výhody:

Ani ELISA ani ELISPOT nehovoria nič o povahe imunologickej odpovede, multiparametrová prietoková cytometria dovoľuje „single cell“ detekciu subpopulácii aktivovaných buniek, povrchovú a intacelulárnu detekciu molekúl !
Cena vyšetrenia je nižšia ako u komerčných setov, možnosť vyšetrenia 1 pacienta. (cca 400 SK)

Nevýhody: Laboratórne intenzívne - ELISA, ELISPOT, Prietokový cytometer, (WB, izolované Leu, izolované PBMC, protilátky, chemikálie)

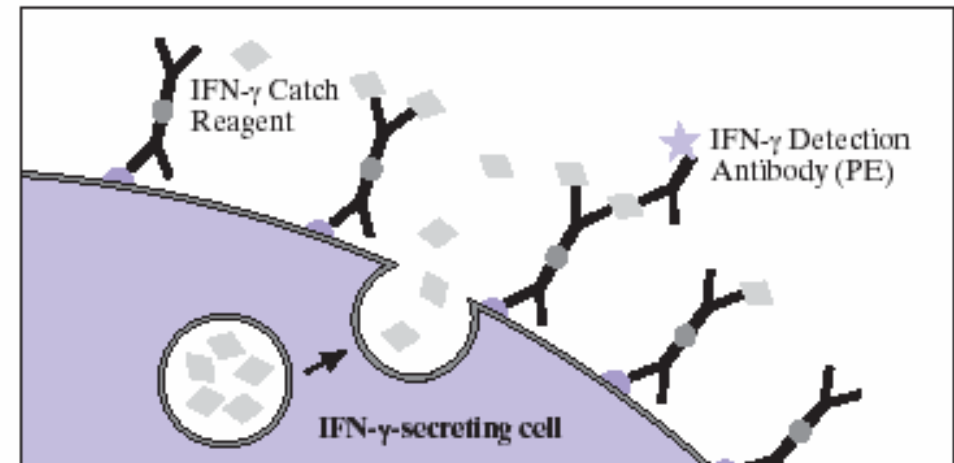
Okrem súčasnej fenotypizácie CD3, CD4, CD8 (NK) CD1 r T... :

-súčasná S detekcia aktivačných markerov – CD69, CD40L, CD154 – < špecifické

- súčasná IC detekcia viacerých syntetizovaných peptidov (pre TB: IFN γ , IL4 – Th1,Th2,Tc1,Tc2)

- súčasná S capturing technika bivalentnými protilátkami

- S farbenie T špec. tetramérmi HLADR,



Cieľ a metódy práce

- dôkaz TB reaktívnych Lymfocytov v periférnej krvi – MP prietokovou cytometriou.
- štúdium zúčastnených reaktívnych subpopulácií
- dôkaz TB špecifickej odpovede – optimálna FC metóda
- finančná efektívnosť
- laboratórna náročnosť
- senzitivita, špecificita, reprodukovateľnosť
- dif. diagnostika pleurálnych punktátov



Pacienti:

22 (4 ženy)

BCG vakcinovaní, RTG nález- aktívna TBC, MDR 3, recidíva 4, Ca - 3

Vzorka:

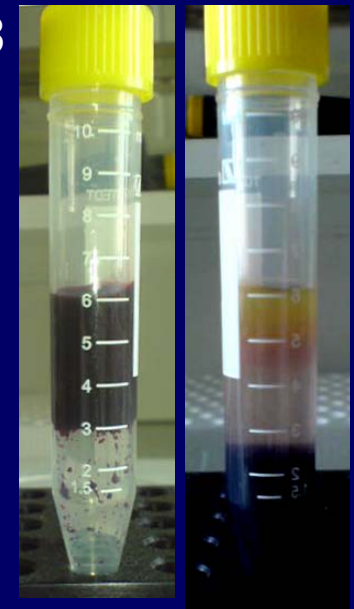
7 ml heparín-Na WPB,
bezprostredne spracovaná po odbere.

kultivované bunky: WB ? , Izolované LEU ? , Izolované PBMC ?

Izolované LEU – menšia záťaž buniek, Ery - PHA,

možnosť nastaviť ich počet v autológnej plazme: LYMFO 2500/ μ l

Absolútny počet Ly, Mo, Gra+PI viabilita Ly (94 – 100 % , 98 %)



Antigény:

QuantiFERON TB Gold = 1. NIL , 2. Mitogén-PHA, 3. ESAT6, CFP10 (47 Sk/p)

Kultivácia:

200 ul suspenzie Leu (2500 Ly / μ l) + stimulans (NIL,PHA, zmes TBag), EPP termostat 37°C, 16 hodín.

NIL, TBAg – po 11 hod – aliquot 100 ul + BFA

Detekcia: FC 500 cytometer Beckman-Coulter, softvér CXP

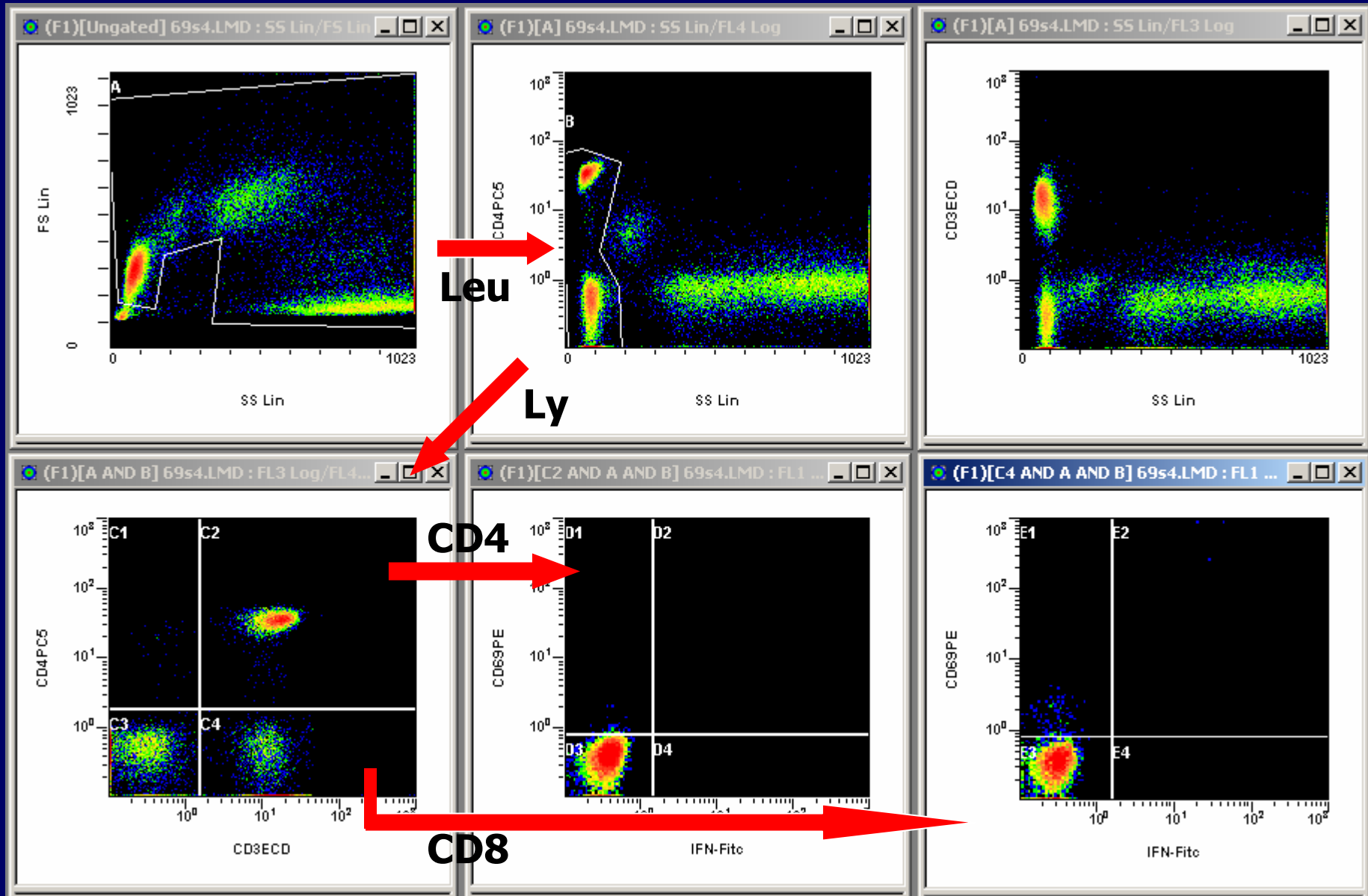
IFNg-FITC (IC-BD) / CD69-PE (BD) / CD3- ECD (BC) / CD4-PC5 (BC) (400Sk/p)
protokol vykompenzovaný na PMA/ionomycín, izotyp,

- povrchové farbenie CD69/3/4 – 20ul - suspenzie, kultúry , Versalyse, 250 sek.

-CD69/3/4+intracelulárne farbenie CD69, IFNg – kultúry s BFA (NIL,TBag) 100ul
permeabilizácia Fix&Perm Caltag, izotypy, Meranie 10000 CD3+4+ buniek.

0,01%=10 bb, 0,1% - 100 bb. - čistota a nastavenie cytometra

Stratégia gatingu



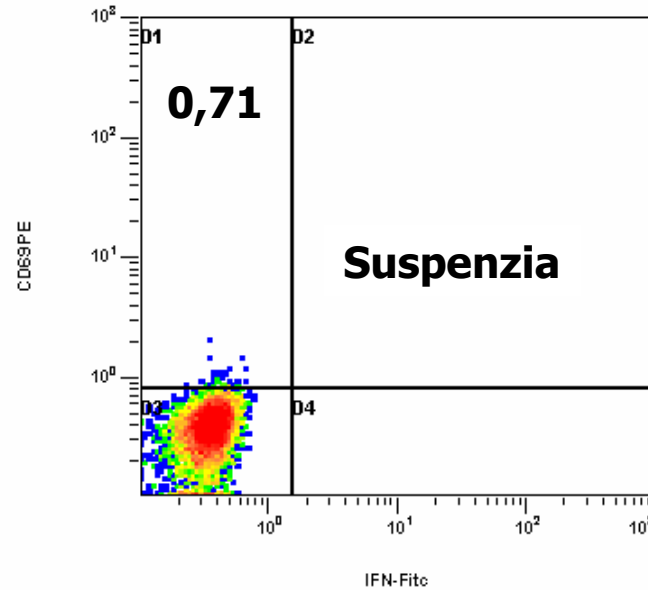
CD3+4+

Málo reaktívny pacient

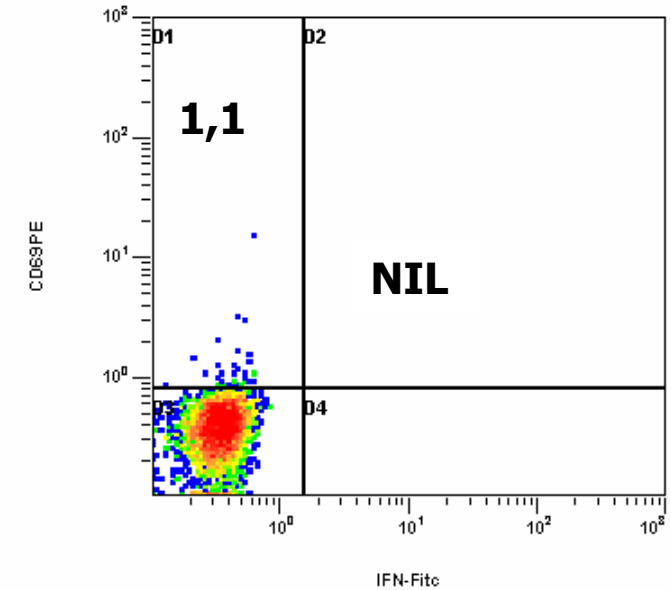
Mikr +
Kult ?
MII 12mm
+ dg C34
AT – 29d

PHA – 46,3%

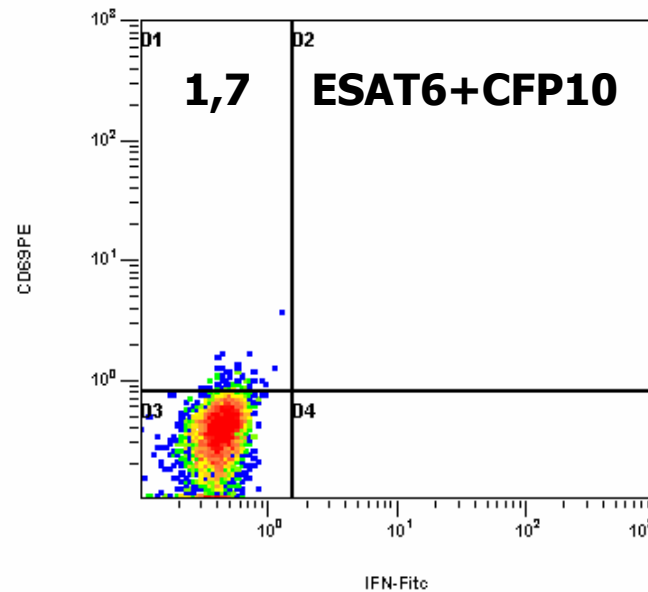
[F1][C2 AND A AND B] 69s4.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



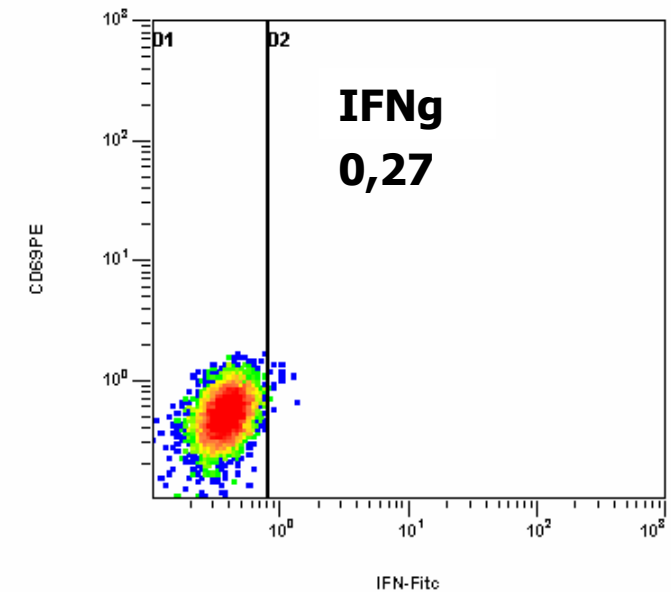
[F1][C2 AND A AND B] N04.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C2 AND A AND B] T04.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C2 AND A AND B] T104.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



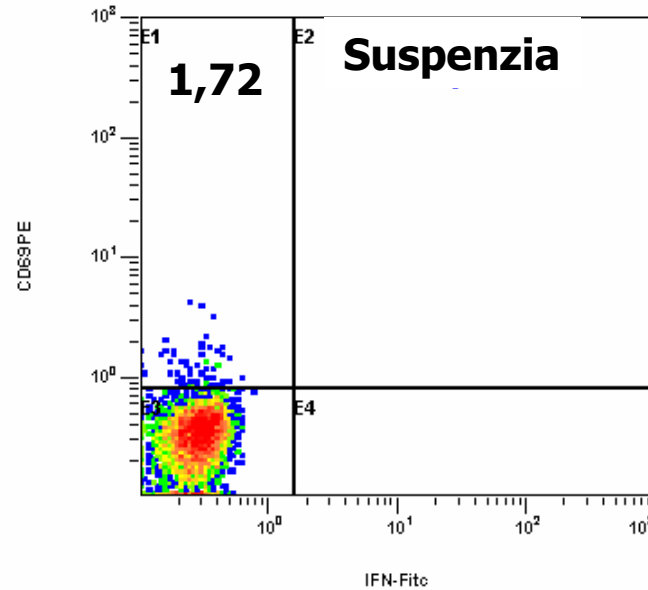
CD3+8+

Málo
reaktívny
pacient

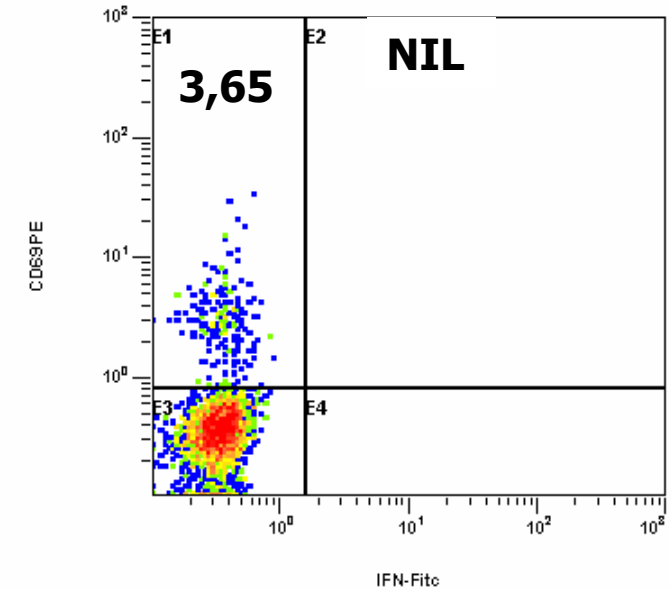
Mikr +
Kult ?
MII 12mm
+ dg C34
AT – 29d

PHA – 49,1%

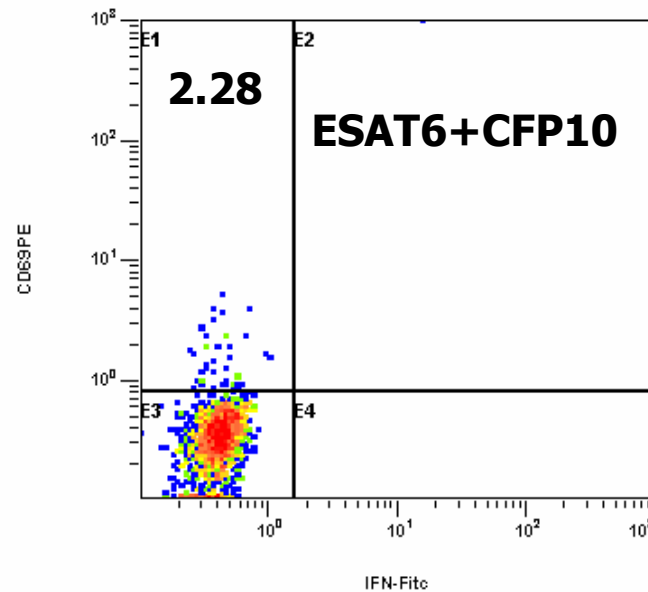
[F1][C4 AND A AND B] 69s4.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



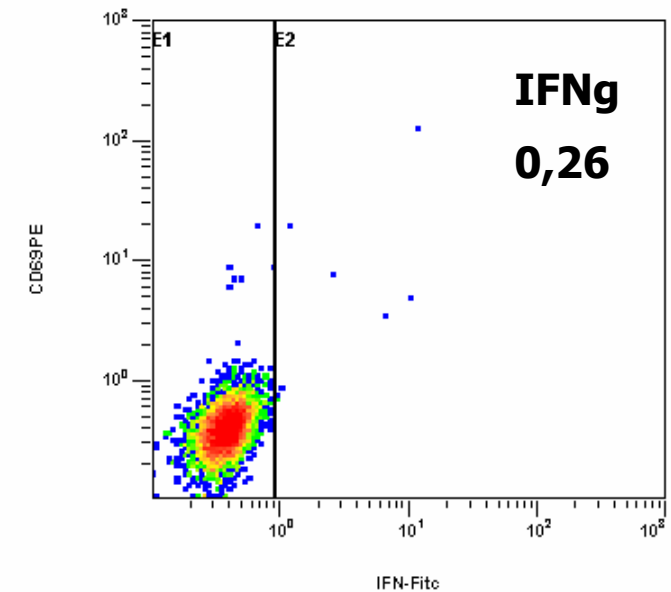
[F1][C4 AND A AND B] N04.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C4 AND A AND B] T04.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C4 AND A AND B] T104.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



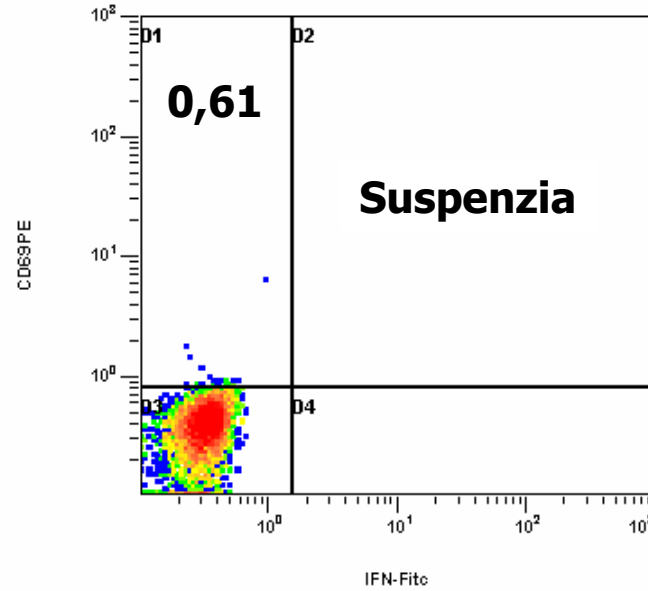
CD3+4+

Pacient
NIL>TbAg

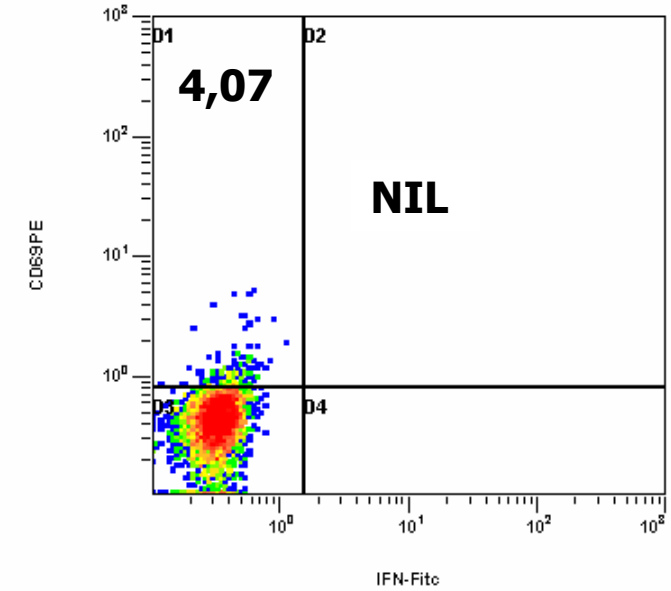
Mikr -
Kult ?
MII 12mm
AT – 26d

PHA – 22,4%

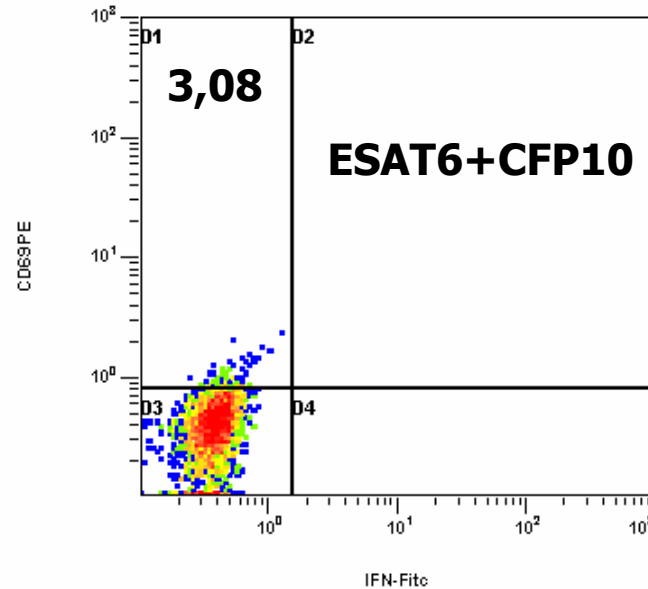
[F1][C2 AND A AND B] 69s5.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



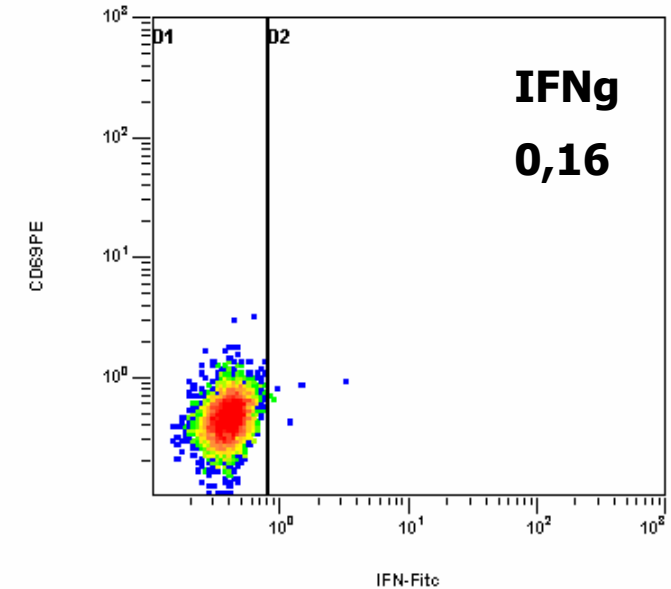
[F1][C2 AND A AND B] N05.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C2 AND A AND B] T05.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C2 AND A AND B] T105.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



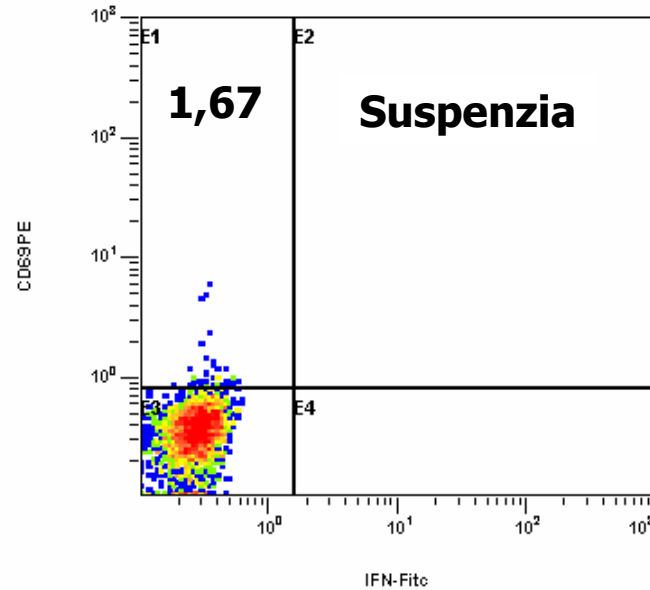
CD3+8+

Pacient
NIL>TbAg

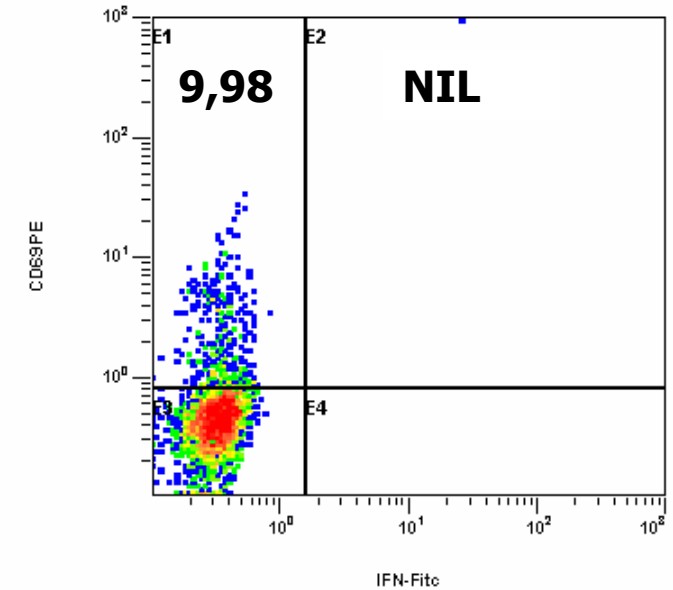
Mikr -
Kult ?
MII 12mm
AT – 26d

PHA – 32,5%

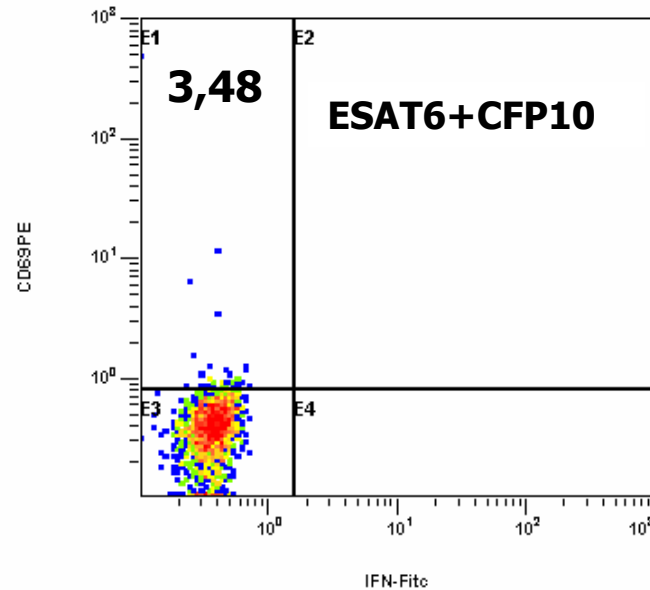
[F1][C4 AND A AND B] 69s5.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



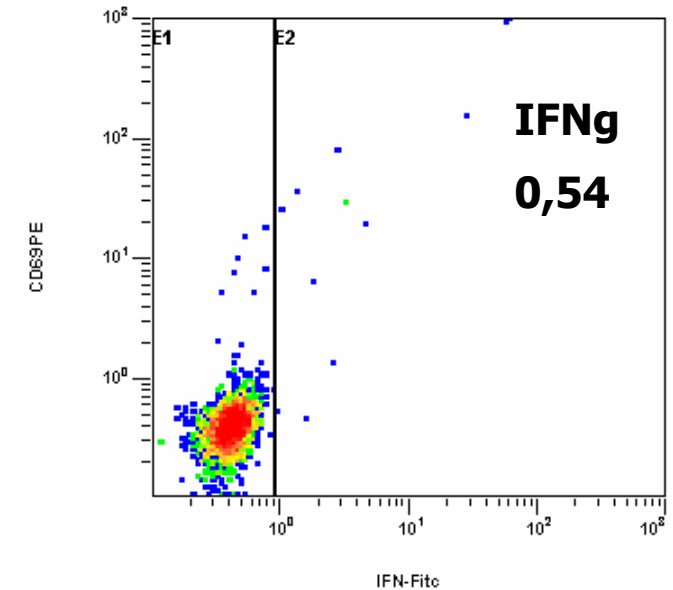
[F1][C4 AND A AND B] N05.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C4 AND A AND B] T05.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



[F1][C4 AND A AND B] T105.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



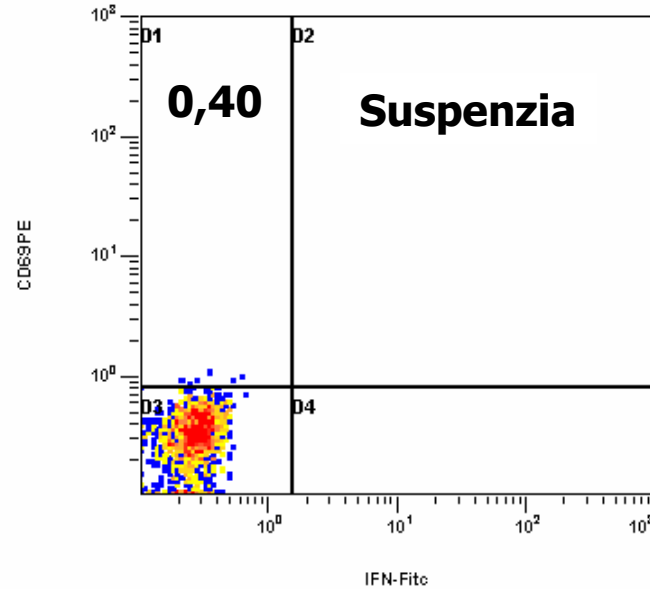
CD3+4+

Reaktívny
Pacient

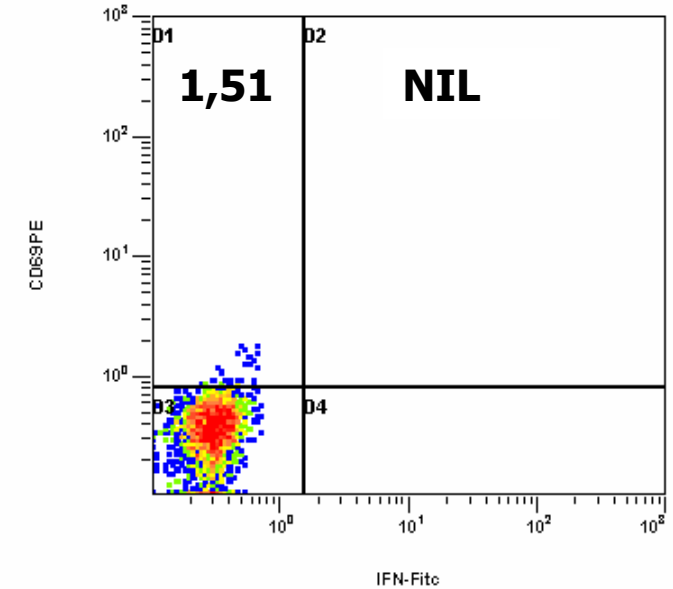
Mikr +
Kult ?
MII 6mm
AT – 1d
+C34

PHA – 11,9%

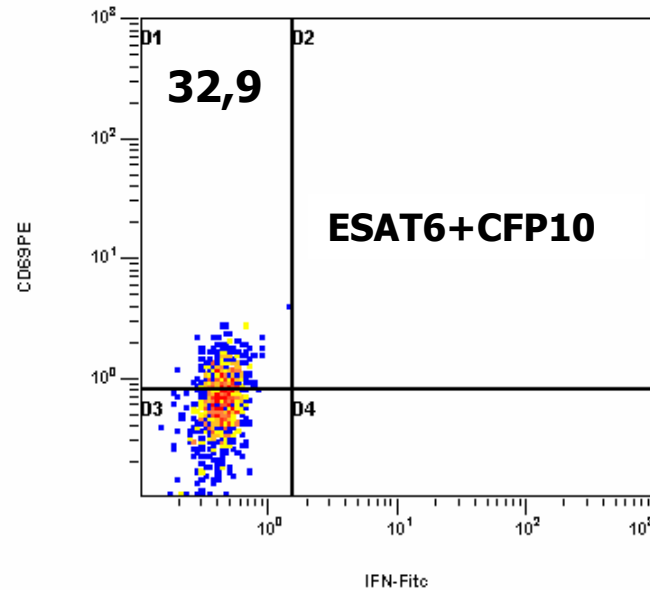
(F1)[C2 AND A AND B] 69s12.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



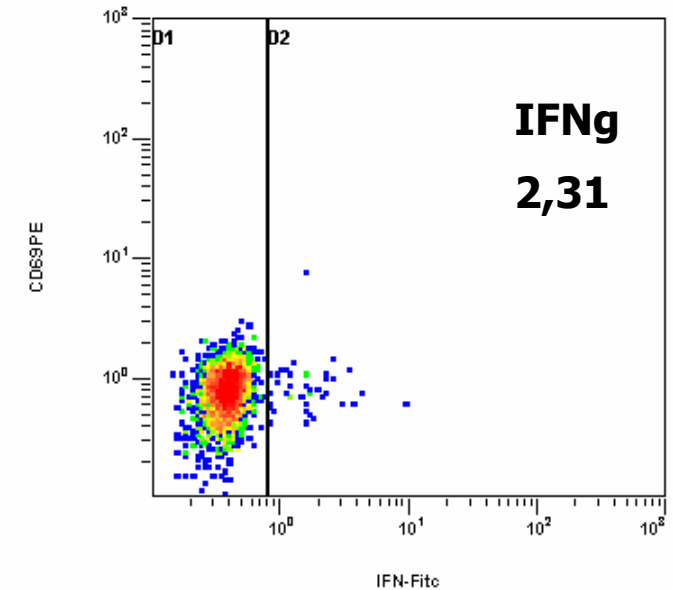
(F1)[C2 AND A AND B] N12.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



(F1)[C2 AND A AND B] T12.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



(F1)[C2 AND A AND B] T112.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



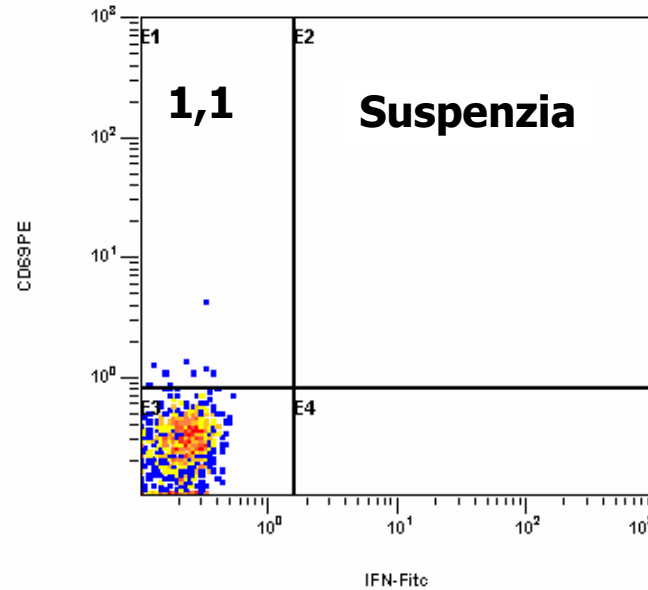
CD3+8+

Reaktívny
Pacient

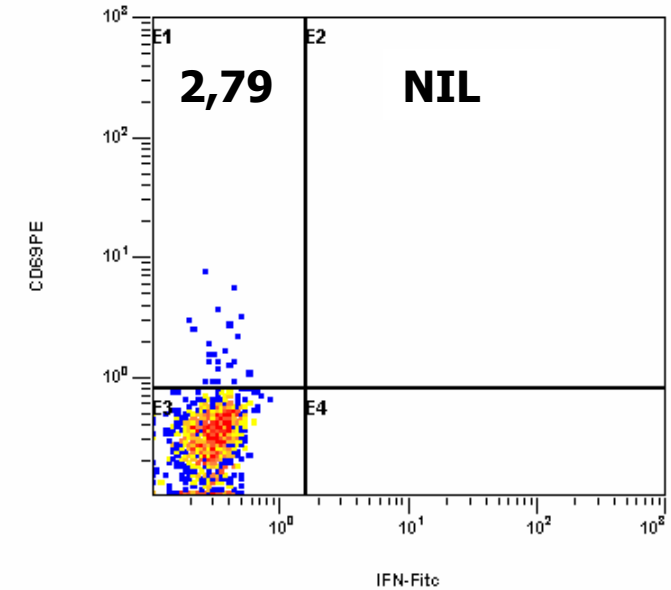
Mikr +
Kult ?
MII 6mm
AT – 1d
+C34

PHA – 20,9%

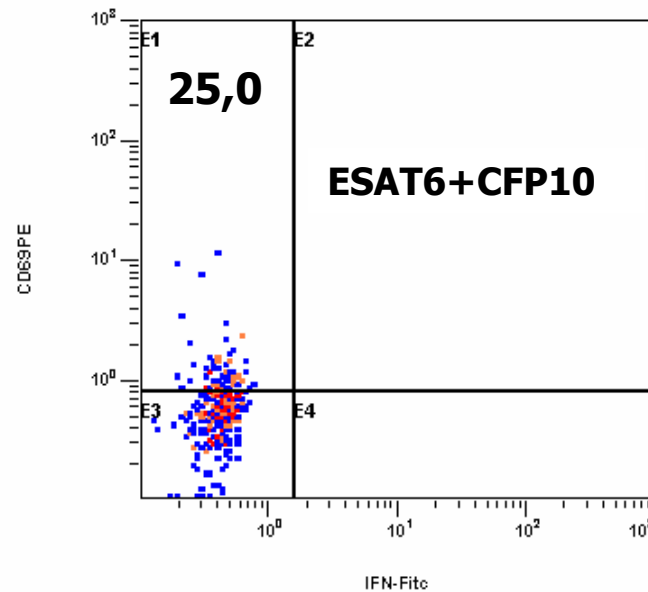
(F1)[C4 AND A AND B] 69s12.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



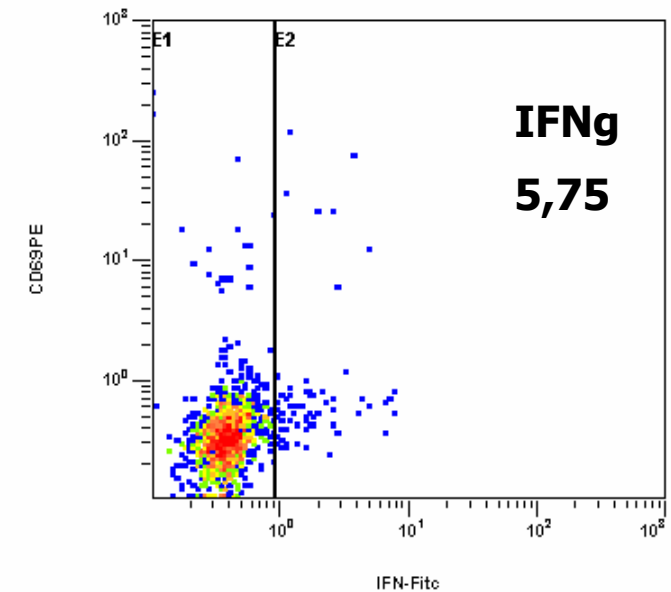
(F1)[C4 AND A AND B] N12.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



(F1)[C4 AND A AND B] T17.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



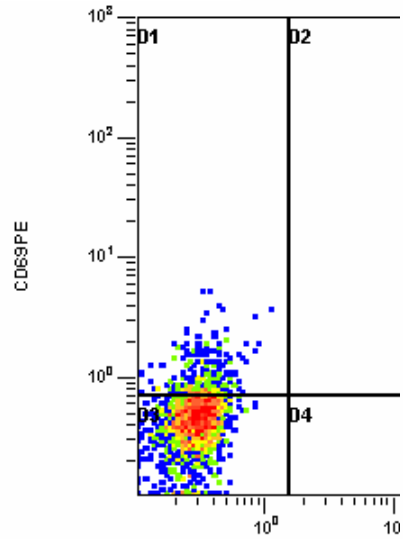
(F1)[C4 AND A AND B] T112.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



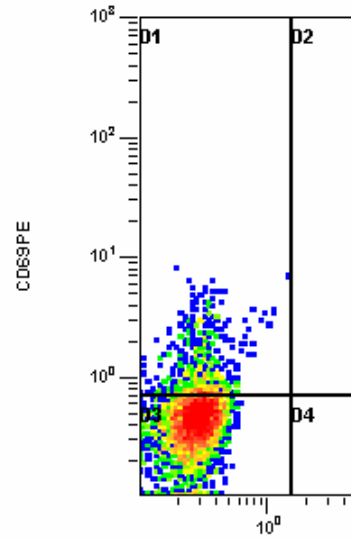
Mitogénova kontrola PHA CD69+

CD3+4+

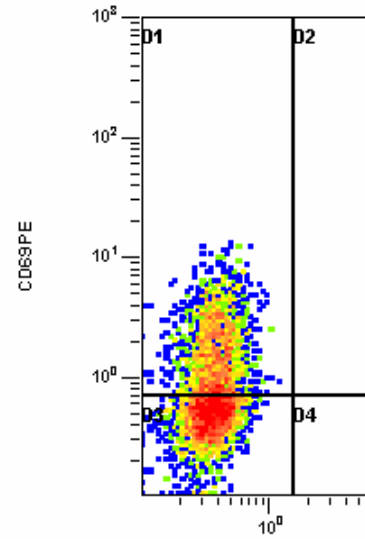
(F1)[C2 AND A AND B] P12.LMD : FL



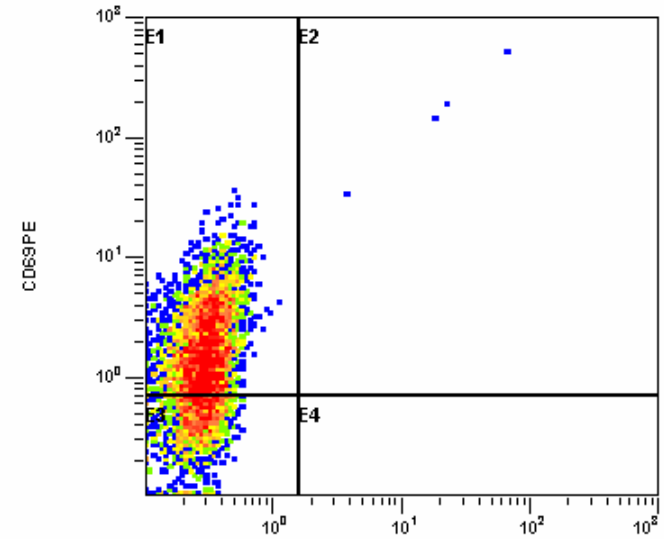
(F1)[C2 AND A AND B] P07.LM



(F1)[C2 AND A AND B] P08.LMD

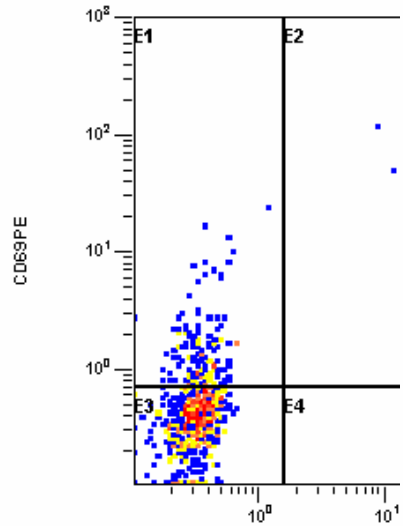


(F1)[C4 AND A AND B] P14.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



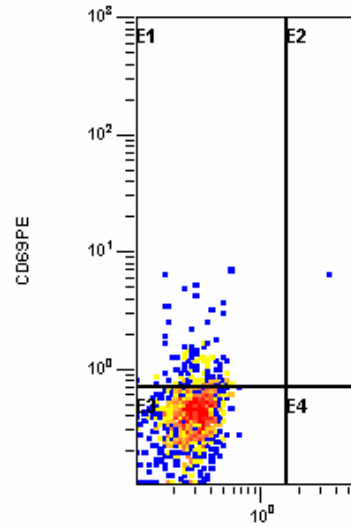
CD3+8+

(F1)[C2 AND A AND B] P12.LMD : FL1

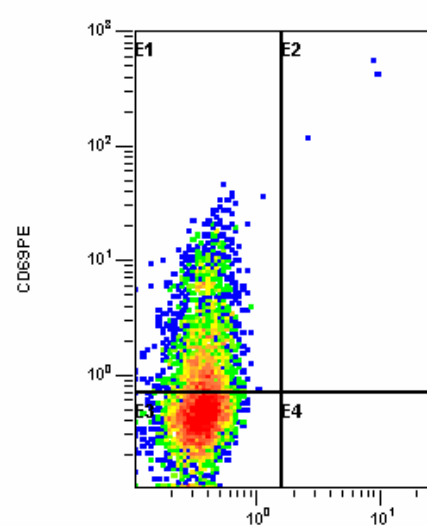


IFN-Fi

(F1)[C4 AND A AND B] P07.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



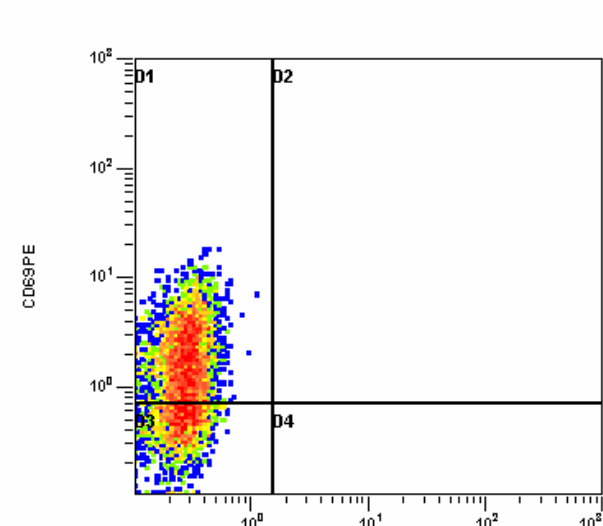
(F1)[C4 AND A AND B] P08.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



IFN-Fitc

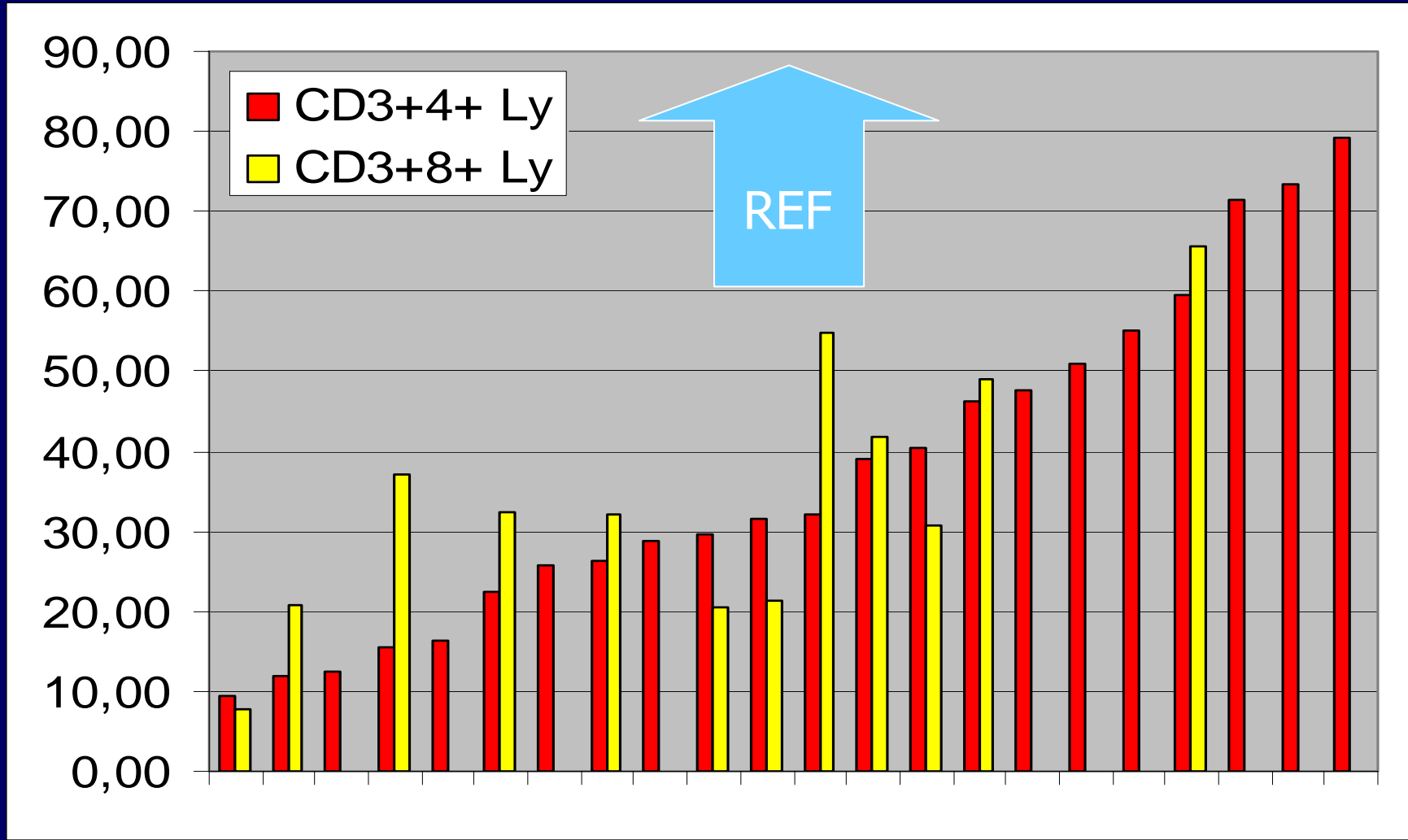
Zdravá kontrola

(F1)[C2 AND A AND B] P14.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC

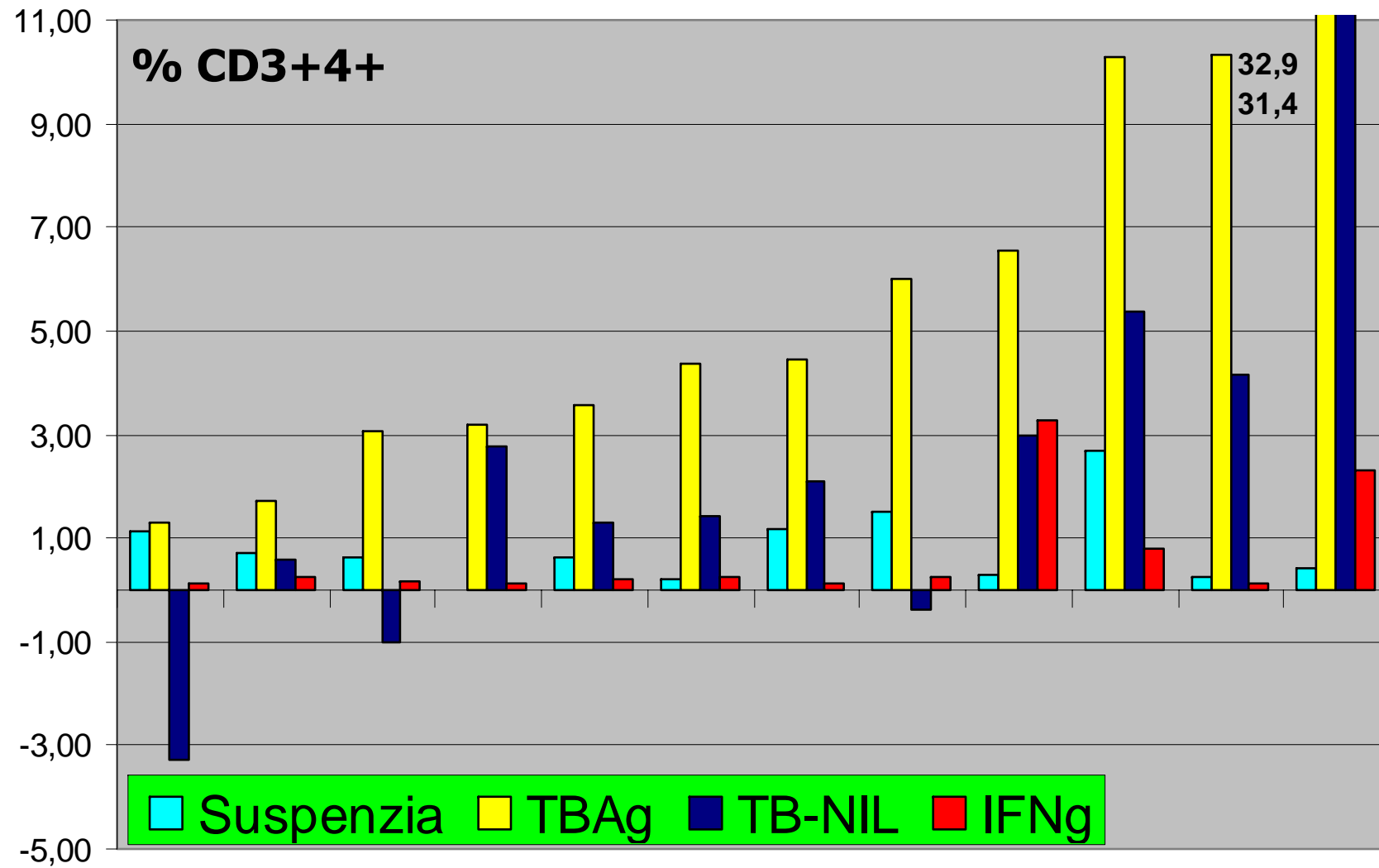


IFN-Fitc

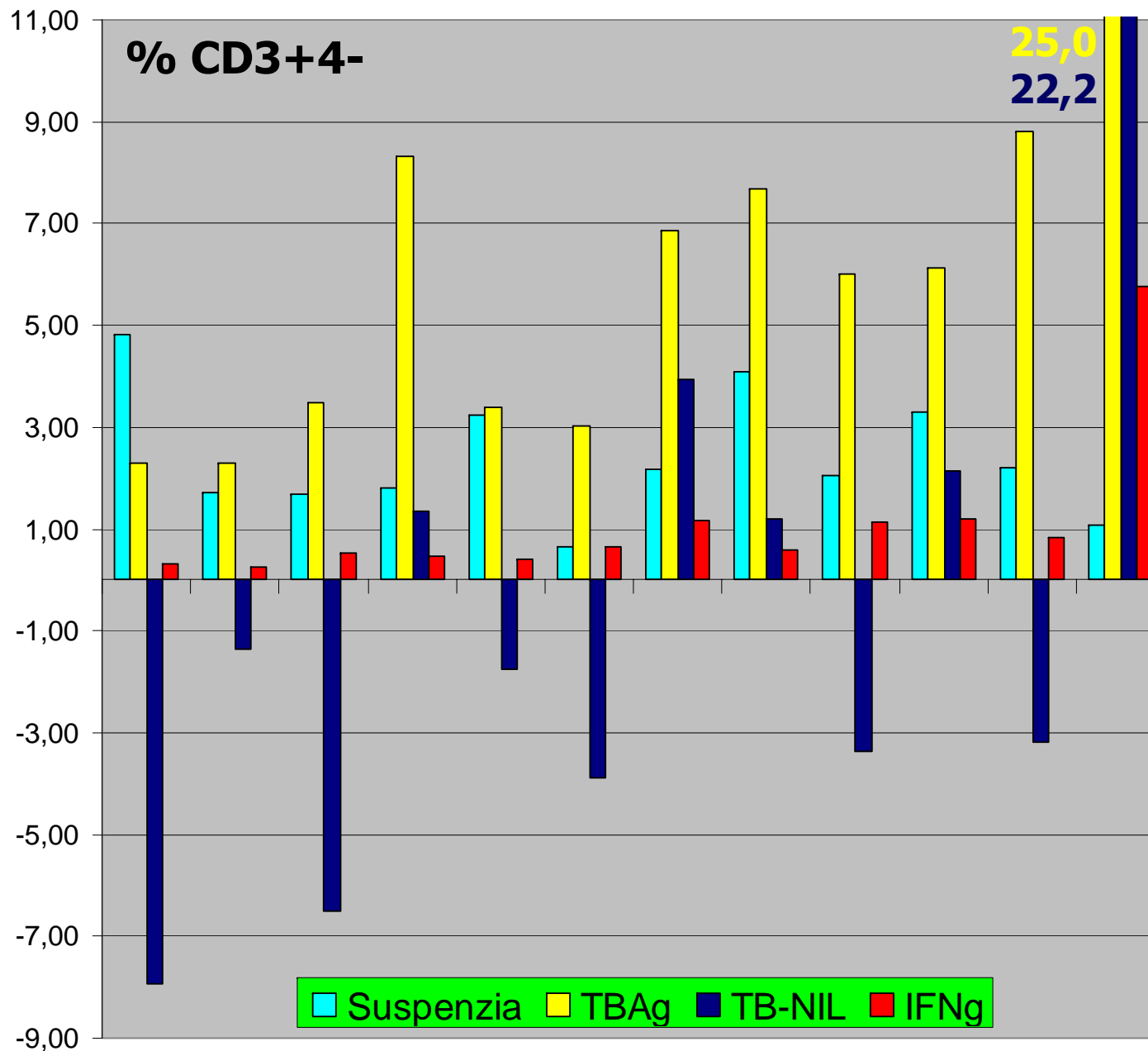
Mitogénová kontrola PHA % CD69+ buniek



CD3+4+69+ a CD3+4+IFNg+ Th odpoved' u TBC pacientov



CD3+8+69+ a CD3+8+IFN γ + Tc odpoved' u TBC pacientov



Pacienti a výsledky

Všetci BCG vakcinovaní + Rtg nález				CD3+4+69+ % CD3+4+					%	
AT-dni	Mikroskop	Kult	MII-mm	Suspenszia	PHA	NIL	TBAg	TBAg-NIL	IFNg	Pozn.
360	0	0	18	0,00	39,10	0,44	3,20	2,76	0,14	atyp M.
21	1	n	8	0,19	59,60	2,96	4,38	1,42	0,24	
22	1	n	15	0,31	32,12	3,57	6,54	2,97	3,28	
29	1	n	12	0,71	46,25	1,10	1,70	0,60	0,27	Ca
26	0	n	12	0,61	22,37	4,07	3,08	-0,99	0,16	
146	3	1	16	0,24	15,47	6,17	10,34	4,17	0,12	Recidíva
8	2	n	6	0,62	9,49	2,28	3,58	1,30	0,2	
19	3	n	14	2,67	40,47	4,90	10,29	5,39	0,8	
36	1	n	3	1,49	26,20	6,38	6,00	-0,38	0,27	(+/-)
7	0	n	12	1,14	29,75	4,56	1,30	-3,26	0,12	Recidíva
15	3	n	20	1,18	31,52	2,35	4,44	2,09	0,13	
1	1	n	6	0,40	11,86	1,51	32,88	31,37	2,31	Ca
2	0	0	6	4,26	16,30	22,00	4,11	-17,89	0,09	Ca,DB,Ex-TBneg
3	3	n	6	0,40	12,60	9,30	23,90	14,60	0,52	
2	3	n	6	2,82	28,80	9,80	6,50	-3,30	0,1	Rec.Cirh,Psor,SpM,OH,ex
31	2	n	14	0,36	73,40	3,09	7,00	3,91	2,43	
33	3	n	21	0,59	79,30	8,60	22,30	13,70	2,61	
30	3	1	n	0,11	47,60	1,72	3,40	1,68	0,27	MDR,hepatopat
35	3	n	17	0,51	50,90	1,52	4,82	3,30	0,33	DB
10	2	1	6	0,22	55,10	3,24	3,97	0,73	0,21	Rec.DB,CHOCHP,A
90	3	1	n	0,71	25,80	4,07	5,32	1,25	0,38	MDR,HepPat,A
90	1	1	n	0,51	71,5	0,38	2,43	2,05	0,4	MDR,

Ciele a Závery

- dôkaz TB reaktívnych Lymfocytov v periférnej krvi – MP prietokovou cytometriou
- štúdium zúčastnených reaktívnych subpopulácií
- dôkaz TB špecifickej odpovede – optimálna FC metóda
- finančná efektívnosť
- laboratórna náročnosť
- senzitivita, špecificita, reprodukovateľnosť
- dif. diagnostika pleurálnych punktátov

- vedľa sledovania povrchového aktivačného markera (CD69) je potrebná súčasná detekcia sekrécie cytokínov najlepšie IFN γ a IL4 súčasne.
- plánujme povrchovú single cell detekciu cytokínov na subpopuláciách
- alebo detekciu konjugátmi peptid- tetramér ak budú finančne dostupné prípadne kombinácia oboch.
- Quantiferón – Možno nahradiť Mitogénovú kontrolu CD69 + testom ELISA - výhodnejšia cena Opti-EIA BD 2x lacnejšia)

