

NVC aanbeveling voor flowcytometrische analyses van B- en T-cel subsets

Werkgroep Immunmonitoring TBNK subsets:

Joyce van Beers (MUMC), Hetty Bontkes (AUMC), Jan Damoiseaux (MUMC), Willemijn Hobo (Radboudumc), Tim Hutten (UMCU), Carin Koelman (Meander MC), Hans Koenen (Radboudumc), Annechien Lambeck (UMCG), Jacqueline Leuvenink (JBZ), Ellen van Lochem (Rijnstate), Monique van Ostaïjen-ten Dam (LUMC), Sharon Veenbergen (Erasmus MC)

In Nederland is een interlaboratorium vergelijking operationeel voor de flowcytometrische bepaling van B- en T-cel subsets. Deelnemende laboratoria gebruiken verschillende panels voor de B- en T-cel subset analyses. Met de NVC werkgroep en deelnemers van de T- en B-cel subset interlaboratorium vergelijking is een aanbeveling opgesteld voor een geharmoniseerd basis flowcytometrie panel en bijbehorende gating strategie. Daarnaast wordt advies gegeven omtrent de te gebruiken klonen en fluorochromen en is er informatie opgenomen over de interpretatie en normaalwaarden. Deze aanbeveling is opgesteld aan de hand van relevante literatuur en expert opinion.

1.1. Immuundeficiëntie

Primaire immuundeficiëntie (PID) is een aangeboren defect in het immuunsysteem en kan resulteren in een verhoogde vatbaarheid voor chronische of ernstige infecties (oor- of longontstekingen, huidinfecties, sinusitis, darminfecties, meningitis, etc.). Naast genetische afwijkingen, kunnen verschillende factoren leiden tot een secundaire immuundeficiëntie, waardoor infectierisico in deze situaties ook verhoogd is. Voorbeelden hiervan zijn infecties (HIV), kanker, auto-immuunziekten of immuunsuppressieve middelen voor therapeutische doeleinden (corticosteroïden, cytostatica, Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD), biologicals, etc). Voor de diagnostische laboratoriumevaluatie van een patiënt met (verdenking op) een primaire en/of secundaire immuundeficiëntie kan middels flowcytometrie een lymfocyten fenotypering ingezet worden¹⁻³. In verschillende diagnostische criteria in het kader van primaire immuundeficiënties zijn (specifieke) lymfocyten subsets opgenomen (Tabel 1). De vraagstellingen richten zich over het algemeen op de aan- of afwezigheid van (specifieke) lymfocyten (sub)populaties.

Tabel 1. Lymfocyten subsets opgenomen in PID criteria.^{1,2}

Populatie	Markers in PID criteria	Toepassing
Ig-switched memory B-cellen, CD4 ⁺ T-cellen (aantal/ μ L), % naïeve CD4 ⁺ T-cellen	Niet gespecificeerd	CVID
CD19 ⁺ (CD20 ⁺) B-cellen, CD3 ⁺ T-cellen, CD4 ⁺ en CD8 ⁺ T-cellen	CD19, CD20, CD3, CD4, CD8	Agammaglobulinemia
Dubbel negatieve T-cellen (TCR α β CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻)	TCR α β CD3, CD4, CD8	ALPS
CD4 ⁺ T-cellen (aantal/ μ L), % naïeve CD4 ⁺ T-cellen	Niet gespecificeerd	HIGM, HIES (uitsluiten klasse-switch probleem t.g.v. T-helpercel deficiëntie)
FOXP3 expressie in CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-cellen	CD4, CD25, FOXP3	IPEX
CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , naïeve T-cellen, CD56 ⁺ /16 ⁺ NK-cellen, CD19 ⁺ B-cellen	CD3, CD4, CD8, CD56/CD16, CD19, CD45RA/CD45RO	Hielprikscreening SCID (afwijkende TREC-uitslag)

CVID: common variable immunodeficiency; ALPS: auto-immuun lymfo proliferatief syndroom; HIGM: hyper IgM syndroom; HIES: hyper IgE syndroom; Ig:immunoglobuline; IPEX: immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked; TREC T-cell receptor excision circles; SCID: severe combined immunodeficiency.

1.2. Immuunmonitoring

Zoals beschreven in onderdeel 1.1. speelt fenotypering van lymfocyten subsets een belangrijke rol in het monitoren van patiënten met een secundaire immuundeficiëntie. Op beperkte wijze wordt dit routinematig toegepast enerzijds bij patiënten met een HIV besmetting om de absolute aantallen CD4⁺ T-cellen te vervolgen en anderzijds bij patiënten die in het kader van een auto-immuunziekte behandeld worden met CD20 antilichamen om de B-cellen te depletieren. In het laatste geval zou men kunnen volstaan met het vervolgen van de absolute aantallen CD19⁺ B-cellen, maar verdere fenotypering biedt de mogelijkheid om het onderscheid te maken tussen terugkerende transitionele B-cellen en niet verwijderde plasmablasten. Ook de mate van hernieuwde opbouw van memory B-cellen kan relevant zijn voor beslissingen ten aanzien van verdere behandeling van betreffende patiëntengroep.⁴ Eerder is beschreven dat de repopulatie van memory B-cellen na anti-CD20 behandeling een vertraagd herstel laat zien, tot wel 2 jaar na behandeling, en dat tijdens de vroege herstelfase de B-celpopulatie voornamelijk gedomineerd wordt door transitionele B-cellen.⁵

Daarnaast is er een grote patiëntengroep die voor hun chronische immunologische aandoening jarenlang met (een combinatie van) immunosuppressieve therapie behandeld wordt. Afhankelijk van het type en de duur van therapie heeft dit zijn weerslag op de omvang en samenstelling van de lymfocyten subsets zoals gemeten in de circulatie. Het verlies van NK-cellen door langdurig gebruik van bijvoorbeeld azathioprine verhoogt het risico op maligniteiten, terwijl T-cel gerichte therapie op termijn kan resulteren in sterk verlaagde CD4⁺ T-cel aantallen (<200/μL) met een verhoogd risico op opportunistische infecties zoals bekend bij HIV patiënten met dergelijk lage CD4⁺ T-cel aantallen. Hoewel er vooralsnog geen richtlijnen bestaan voor het monitoren van lymfocyten subsets in deze patiëntengroep, verdient deze toepassing wel aandacht in deze aanbeveling, zeker in het kader van besluitvorming omtrent stoppen of doorzetten van therapie en vaccinatieadviezen (zie aanvullend RIVM vaccinatieadviezen bij chronische inflammatoire aandoeningen).⁶

1.3. Immuunrestitutie

Ook bij patiënten die een stamceltransplantatie hebben ondergaan kan een uitgebreide lymfocyten fenotypering extra informatie opleveren over de kwaliteit van de immuunrestitutie. Snel herstel van het immuunsysteem qua samenstelling en functie is belangrijk voor de genezing en de lange-termijn overleving van patiënten na een stamceltransplantatie. Tijdens de periode dat de verschillende immuuncelpopulaties afwezig of verlaagd zijn, zijn deze patiënten zeer kwetsbaar voor infecties. Bovendien spelen de immuun effectorcellen (o.a. TCR α β T-cellen, TCR γ δ T-cellen en NK-cellen) een belangrijke rol in de genezende anti-tumor reacties. Om deze reden is het belangrijk dat het herstel van de verschillende immuun effectorpopulaties vervolgd wordt.^{7, 8} Onder andere het type voorbehandeling (conditionering) en het type transplantaat dat de patiënt gekregen heeft kunnen de immuunrestitutie snelheid beïnvloeden. Over het algemeen herstellen de NK-cellen relatief snel (~1 maand), gevolgd door T-cellen (~3-6 maanden) en B-cellen (6 maanden). Vanuit de RIVM en EBMT richtlijnen vaccinatieadviezen bij hematologische aandoeningen zijn tijdsriteria nog vaak leidend voor (her)vaccinaties om voldoende respons te krijgen. Biologische criteria zoals CD4⁺ T-cellen > 200 / μL en CD19/CD20⁺ B-cellen > 20 / μL zijn hierin nog meer onderzoek nodig.^{7, 9}

2. B- en T-cel subset analyse

2.1. Panels

In deze aanbeveling zijn onderstaande basispanels opgesteld voor een B- en T-cel subset analyse op perifeer bloed. Aanvullend op de basispanels kan voor de T-cellen gekozen worden voor extra kleuringen om T-cel activatie (CD38⁺ en/of HLA-DR⁺) en recente thymus-emigranten (RTE, CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺) te onderzoeken. Voor de B-cellen kan er in meer detail gekeken worden naar de isotype-geswitchte memory B-cellen (IgG/IgA/IgE). Voor het rapporteren van absolute aantallen van

de verschillende B- en T-cel subsets is het noodzakelijk om een kwantitatieve bepaling uit te voeren. In Tabel 2 staan in dit kader enkele bekende opties voor het definiëren van T-, B- en NK-cellen.

Tabel 2. Absolute aantallen T-, B- en NK-cellen*

Marker	Kloon
CD3	SK7, UCHT1
CD4	SK3, SFC12T4D11
CD8	SK1, SFC121Thy2D3
CD16	B73.1**, 3G8
CD19	SJ25C1, J3-119
CD45	2D1, B3821F4A, J33
CD56	NCAM16.2, N901

* Voorbeelden van CE-gemarkeerde beschikbare testen: TBNK BD Multitest met BD TruCount tubes, TBNK met Aquios Tetra-1/Tetra-2 kit.

**Bij een enkele CD16 kleuring zonder CD56 wordt kloon 3G8 aanbevolen in verband met CD16 epitoom deficiëntie in sommige patiënten door een mutatie in het CD16 epitoom waar kloon B73.1 bindt.

Tabel 3. B-cel subset analyse

	Marker	Kloon
Basis	CD19*	J3-119, SJ25C1, HIB19
	CD20*	B9E9(HRC20), 2H7
	CD24	ALB9, ML5
	CD27	M-T271, 1A4CD27, O323, L128
	CD38	HB7, LS198-4-3, HIT2
	CD45	J33, HI30, 2D1
	IgD	IA6-2
	IgM	MHM-88, SA-DA4, G20-127
Aanvullend (optioneel)	CD3	SK7, UCHT1
	CD5	UCHT-2, BL1a, L17F12
	CD10	ALB1, HI10a
	CD21	B-ly4, BL13, Bu32
	IgA	IS11-8E10, polyklonaal
	IgE	Polyklonaal, IgE21
	IgG	G18-145, polyklonaal

* Voor deze markers geldt: CD19 of CD20

Tabel 4. T-cel subset analyse

	Marker	Kloon
Basis	CD3	SK7, UCHT1
	CD4	OKT4, 13B8.2, SFC12T4D11, SK3
	CD8	B9.11, SK1
	CD27*	M-T271, 1A4LDG5.3.1, O323, L128
	CD28*	CD28.2
	CD45	J33, HI30, 2D1
	CD45RA*	2H4LDH11LD89, HI100, L48
	CD45RO*	UCHL1
	TCR $\alpha\beta$ *	IP26A, WT31, BMA031
	TCR $\gamma\delta$ *	11F2, Immuno 510, 11F2
Aanvullend (optioneel)	CD25	2A3, M-A251
	CD31	MEM-05, 5.6E, WM59
	CD38	HB7, HIT2
	CD127	hIL-7R-M21 en A019D5, eBioRDR5
	CD197	FR11-11E8, G043H7, 2-L1-A
	HLADR	L243, Immu-357, G46-6
	Intracellulair FOXP3**	PCH101

* Voor deze markers geldt: CD45RA of CD45RO; TCR $\alpha\beta$ of TCR $\gamma\delta$; ~~CD127~~

** Fixatie permeabilisatie protocol noodzakelijk

2.2. B-cel marker motivatie

CD5 is een pan T-cel marker, maar komt ook voor op bepaalde benigne B-cellen in bloed en lymfoïde weefsels, voornamelijk bij kinderen en jongvolwassenen.

CD10 komt tot expressie op voorloper B-cellen, maar ook op voorloper T-cellen. CD10 expressie op B-cellen neemt af naarmate B-cellen differentiëren van onrijpe naar rijpe B-cellen. Transitionele B-cellen hebben nog expressie van CD10. Daarnaast komt CD10 tot expressie op germinal center B-cellen en neutrofiele granulocyten.

CD19 is een marker om B-cellen te identificeren en wordt gezien als één van de lijn definiërende markers. CD19 komt tot expressie tijdens alle maturatie stadia van de B-cel. CD19 maakt onderdeel uit van een (B-cel co-receptor) complex met CD21 en CD81.

CD20 is een algemene B-cel marker die in verschillende ontwikkelingsstadia van de B-cel tot expressie komt: vanaf het stadium van de late pre-B-cel tot aan dat van mature en memory B-cellen. CD20 komt op plasmacellen/plasmablasten onvoldoende tot expressie om met anti-CD20 therapie gedepleteerd te worden.

CD21 expressie is aanwezig op zowel naïeve als memory B-cellen. Vroege transitionele B-cellen, plasmablasten en plasmacellen hebben geen CD21 expressie. B-cellen met verlaagde/afwezige CD21 expressie kunnen sterk verhoogd zijn bij mensen met bepaalde virale en parasitaire infecties, CVID en auto-immuunziekten, het betreffen hier CD21 negatieve cellen die tevens CD38 negatief (en dus geen plasmablasten/plasmacellen) zijn. CD21 vormt samen met CD19 en CD81 een (B-cel co-receptor) complex.

CD24 is een B-cel differentiatie marker. CD24 expressie is hoog op transitionele B-cellen (naast CD38). CD24 komt niet tot expressie op plasmacellen. CD24 wordt ook door andere, zowel hematologische als niet-hematologische, cellen tot expressie gebracht, o.a. granulocyten en epitheelcellen.

CD27 is marker voor memory B-cellen. In combinatie met IgD en/of IgM kan onderscheid gemaakt worden tussen niet-isotype geswitchte memory B-cellen (IgD⁺/CD27⁺) en isotype geswitchte memory B-cellen (IgD⁻/CD27⁺). Plasmablasten brengen tevens CD27 hoog tot expressie en kunnen hierdoor onterecht tot memory B-cellen worden gerekend.

CD38 is een marker die tot expressie komt op nagenoeg alle pre-B-cellen, transitionele B-cellen, plasmacellen (inclusief plasmablasten) en thymocyten. Om onderscheid te maken tussen transitionele B-cellen en plasmablasten kan CD38 gecombineerd worden met IgD, waarbij transitionele B-cellen, in tegenstelling tot plasmablasten, IgD expressie hebben.

CD38 komt verder ook tot expressie op geactiveerde T-cellen, NK-cellen, myeloblasten en erythroblasten. Daarnaast is CD38 t a r g e t v o o r o . a . d a r a t u m u m a b e n d flowcytometrie antistoffen.

CD45 wordt gebruikt als marker voor hematopoëtische cellen. Uitrijpende megakaryocyten en erythroïde cellen, alsook niet hematopoëtische cellen, zijn CD45 negatief. CD45 kan daarmee gebruikt worden om de lymfocyten/leukocyten gate te zuiveren en de overige lymfocytensubset analyses te verbeteren.

IgG, IgA en IgE komt tot expressie op de isotype-geswitchte memory B-cellen en plasmacellen en brengen in de vorm van de B-cel receptor het antilichaam dat ze maken tot expressie respectievelijk op het oppervlak en in de intracellulaire ruimte van de cel. Elke memory B-cel en plasmacel brengt slechts 1 type B-celreceptor (en dus immuunglobuline) tot expressie. Een disbalans in de verhouding van de verschillende immuunglobuline klassen kan een aanwijzing zijn voor een immuundeficiëntie.

IgM en IgD zie ook CD38 en CD27. IgM en IgD vormen een type BCR die voorkomt op niet-isotype geswitchte memory B-cellen. Voor IgM geldt dat deze ook tot expressie komt op IgM⁺ memory B-cellen.

2.3. T-cel marker motivatie

CD3 is een marker om T-cellen te identificeren. Zowel T-cellen m a c t e l e r r e c e p t o r a l s c e l r e c e p t o r b r e n g e n c o n s t i t u t i e f C D 3 e n h o g e r t s e x p r e s d a n o p c e l l e n , i s h e t v e r s c h i l n i e t a l t i j d g r o o t g e n o e g o m b e i d e s u b s e t s v a n e l k a a r t e onderscheiden.

CD25 is de IL-2 R α keten -affine IL-2 receptor. Regulatoire T-cellen hebben een hoge, constitutieve expressie van CD25, terwijl conventionele T-cellen CD25 tot expressie brengen na activatie. Ook andere leukocyten kunnen CD25 tot expressie brengen. Om onderscheid te maken tussen regulatoire T-cellen en geactiveerde conventionele T-cellen kan CD25 gecombineerd worden met CD127 (IL-7 R α keten), waarbij in tegenstelling tot conventionele T-cellen, een lage CD127 expressie hebben.

CD27 is een lid van de tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamilie en dient als een belangrijke marker in de immunologie, met name bij het identificeren van verschillende stadia van T-cel differentiatie en activatie. CD27 wordt tot expressie gebracht door naïeve T-cellen en het verlies van CD27 is gerapporteerd als een kenmerk van het effector fenotype van T-cellen. CD27 wordt gebruikt als biomarker voor het identificeren en kwantificeren van verschillende T-cel subsets bij diverse ziekten, waaronder infecties, auto-immuunziekten en kanker.

CD28 is een co-stimulerend molecuul dat constitutief tot expressie wordt gebracht op de meeste CD4⁺ T-cellen en op een groot deel van de CD8⁺ T-cellen. Hoge expressie wordt met name gevonden op naïeve T-cellen en met toenemende T-cel differentiatie neemt de expressie af. Als gevolg van chronische inflammatie kan de expressie van CD28 op T-cellen afnemen bij sommige individuen.

CD31 is binnen de CD4⁺ T-cel populatie een marker voor cellen die recent de thymus hebben verlaten, de zogenoemde recente thymus-emigranten. De naïeve CD4⁺ T-cellen die CD31 tot expressie brengen zijn relatief jong. Dit geldt niet voor CD8⁺ T-cellen en TCR $\gamma \delta$ -cellen.

CD38 is een marker welke tot expressie kan komen op onder andere T-cellen. Binnen de T-cel populatie kan het toegepast worden als activatie marker. Daarnaast komt CD38 tot expressie op NK-cellen, B-cellen, myeloblasten en erytroblasten.

CD45 zie onderdeel 2.2. B-cel marker motivatie.

CD45RA en CD45RO zijn varianten van het CD45 molecuul die ontstaan door differentiële splicing. CD45RO (R-nul) heeft geen extra domeinen in tegenstelling tot CD45RA met drie extra domeinen, waarbij het A-domein het extra-cellulaire uiteinde vormt. CD45RA komt tot expressie op naïeve T-cellen en ver-gedifferentieerde T-cellen. Bij de transitie naar memory T-cellen is er geleidelijk verlies van CD45RA en komt CD45RO tot expressie. Het onderscheid tussen naïeve en memory T-cellen op basis van deze markers kent een aantal cruciale beperkingen:

- In de overgang van naïef naar memory hebben de T-cellen een intermediate fenotype; voor harmonisatie is het van belang eenduidige afspraken te maken over de indeling van deze cellen bij het naïeve of memory T-cel compartiment, afhankelijk van het gebruik van CD45RA of CD45RO als marker (zie ook Bijlage 1).
- Chronisch gestimuleerde T-cellen, met name CD8⁺ T-cellen maar ook CD4⁺ T-cellen, die hun co-stimulatoire markers CD27 en/of CD28 verliezen, kunnen opnieuw CD45RA tot expressie brengen. Deze cellen dienen niet abusievelijk als naïeve T-cellen aangemerkt te worden.
- Sommige mensen hebben een zogeheten CD45RA-afschakel defect waardoor CD45RA, in tegenstelling tot CD45RO, geen onderscheid maakt tussen naïeve en memory T-cellen.

CD127 is de IL-7 R α keten receptor. Regulatoire T-cellen hebben, in tegenstelling tot conventionele T-cellen, een lage CD127 expressie. In combinatie met CD25 kan CD127 gebruikt worden om regulatoire T-cellen te identificeren. Bij een IPEX vraagstelling dient voor het identificeren van regulatoire T-cellen FOXP3 als marker gebruikt te worden (zie onder).

CD197 is een chemokine receptor (CCR7) welke een belangrijke rol speelt in de homing van bepaalde subpopulaties van T-cellen en antigeen-presenterende cellen. Binnen de T-cel populatie komt CD197 tot expressie op naïeve T-cellen en central memory T-cellen.

TCR α β en TCR γ δ zijn de antigeen-specifieke receptoren van de T-cellen. T-cellen brengen slechts één van deze twee TCR types tot expressie en daarom is één marker voldoende om binnen de CD3-positieve populatie onderscheid te maken tussen TCR α β -cellen en TCR γ δ -cellen.

HLA-DR is een eiwit behorende tot de HLA-klasse-II moleculen dat tot expressie komt op met name antigeen-presenterende cellen, zoals monocysten en B-cellen. Expressie van HLA-DR op T-cellen kan, net als CD38, gezien worden als een activatie marker en gebruikt worden om T-cel activatie te bepalen.

FOXP3 is een transcriptiefactor welke een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling en functie van regulatoire T-cellen. Dit eiwit kan middels een intracellulaire kleuring gebruikt worden om regulatoire T-cellen te identificeren.

3. Fluorchromen

Door de NVC is een handreiking opgesteld voor de keuze van fluorochromen voor flowcytometrische immuunfenotypering. Deze is terug te vinden via onderstaande link.
<https://cytometrie.nl/werkgroep/HandreikingSelectie%20van%20fluorochromen%20voor%20IFT.pdf>

4. Gating strategie

In Bijlage 1 zijn voorbeelden opgenomen van gating strategieën voor de B- en T-cel analyses. De volgende definities van de verschillende populaties worden aangehouden:

Tabel 5. Lymfocyten

Subset	Markers
CD3 ⁺ T-cellen	CD45 ⁺ CD3 ⁺
CD4 ⁺ T-cellen	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD8 ⁺ T-cellen	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
B-cellen	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺
NK-cellen	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺

Tabel 6. B-cel subsets (basis)

Subset	Markers
Binnen CD19⁺ (of CD20⁺) B-cellen	
Transitionele B-cellen	CD27 ⁻ IgD ⁺ IgM ^{hi} CD24 ^{hi} CD38 ⁺
	CD24 ^{hi} CD38 ⁺
Naïeve mature B-cellen	CD27 ⁻ IgD ⁺ IgM ⁺ CD24 ^{int} CD38 ^{int}
	CD27 ⁻ IgD ⁺
Niet-isotype geswitchte memory B-cellen*	CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ^{hi} CD38 ^{int}
Isotype-geswitchte memory B-cellen	CD27 ⁺ IgD ⁻ IgM ⁻ CD38 ^{int}
Dubbel-negatieve B-cellen	CD27 ⁻ IgD ⁻ IgM ⁻ CD38 ^{lo}
Plasmablasten	CD27 ^{hi} IgM ⁻ IgD ⁻ CD24 ⁻ CD38 ^{hi}

* Niet-isotype geswitchte memory B-cellen worden ook wel marginal zone of natural effector B-cellen genoemd.

Tabel 7. B-cel subsets (aanvullend)

Subset	Markers
Binnen CD19⁺ (of CD20⁺) B-cellen	
Memory B-cellen	CD27 ⁺ IgD ⁻ CD38 ^{int}
• Memory IgM	CD27 ⁺ IgD ⁻ IgM ⁺ CD38 ^{int}
• Memory IgG	CD27 ⁺ IgD ⁻ IgG ⁺ CD38 ^{int}
• Memory IgA	CD27 ⁺ IgD ⁻ IgA ⁺ CD38 ^{int}
• Memory IgE	CD27 ⁺ IgD ⁻ IgE ⁺ CD38 ^{int}
CD21 ^{low} B-cellen	CD21 ^{low} CD38 ⁻

Tabel 8. T-cel subsets (basis)

Subset	Markers
Binnen CD3⁺ T-cellen	
CD4 ⁺ CD8 ⁻ binnen CD3 ⁺ T C R ⁺ α-β-cellen	CD45, CD3, CD4, CD8, TCR α β TCR γ δ
T C R ⁺ γδ-cellen	CD45, CD3, CD4, CD8, TCR α β TCR γ δ
T C R ⁺ α-β-cellen	CD45, CD3, CD4, CD8, TCR α β TCR γ δ
Binnen CD4⁺ T-cellen	
Naïeve T-cellen	CD45R0 ⁻ of CD45RA ⁺ i.c.m. CD27 ⁺ of CD28 ⁺
Binnen CD8⁺ T-cellen	
Naïeve T-cellen	CD45R0 ⁻ of CD45RA ⁺ i.c.m. CD27 ⁺ of CD28 ⁺

Tabel 9. T-cel subsets (aanvullend)

Subset	Markers
Binnen CD4⁺ T-cellen	
Central memory T-cellen	CD45R0 ⁺ of CD45RA ⁻ i.c.m. CCR7 ⁺ of CD27 ⁺
Effector memory T-cellen	CD45R0 ⁺ of CD45RA ⁻ i.c.m. CCR7 ⁻ of CD27 ⁻
Ver-gedifferentieerde T-cellen	CD45R0 ⁻ of CD45RA ⁺ i.c.m. CCR7 ⁻ of CD27 ⁻
Recente thymus-emigranten (RTE)	CD45RA ⁺ CD31 ⁺
Geactiveerde T-cellen	HLA-DR ⁺ HLA-DR ⁺ /CD38 ⁺
Regulatoire T-cellen	CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (IPEX vraagstelling)
Binnen CD8⁺ T-cellen	
Central memory T-cellen	CD45R0 ⁺ of CD45RA ⁻ / CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ / CD27 ⁺
Effector memory T-cellen	CD45R0 ⁺ of CD45RA ⁻ / CCR7 ⁻
Ver-gedifferentieerde T-cellen	CD45R0 ⁻ of CD45RA ⁺ / CCR7 ⁻ CD45RA ⁺ / CD27 ⁻
Geactiveerde T-cellen	HLA-DR ⁺ of CD38 ⁺

4.1. Toelichting gating strategie B-cellen

Voor het gaten van de B-cel subsets worden eerst de lymfocyten geselecteerd op basis van een lage SSC-A en CD45 expressie. Voor het gaten van de B-cellen kan gekozen worden voor CD19, CD20, of beide. Indien de B-cellen geselecteerd worden m.b.v. alleen CD20 moet er rekening gehouden worden

met het feit dat de plasmablasten niet meegenomen worden, aangezien plasmablasten negatief zijn voor CD20. Bij verdenking op een CD19 deficiëntie is het belangrijk om naast CD19 ook CD20 toe te voegen. Bij patiënten die behandeld worden met rituximab is het juist belangrijk om CD19 mee te nemen, gezien rituximab een monoklonaal antilichaam is gericht tegen CD20. CD38 en CD24 zijn noodzakelijk voor het gaten van de transitionele B-cellen. Membraangebonden IgD en CD27 zijn noodzakelijk voor het onderscheiden van de naïeve mature B-cellen en de memory populaties. Binnen de memory B-cellen wordt membraangebonden IgM gebruikt om de niet-geswitchte memory B-cellen van de isotype-geswitchte memory B-cellen te kunnen onderscheiden.

Additioneel kan er gebruik worden gemaakt van CD3 (exclusie) om de B-cellen accurater te kunnen gaten. Voor verdere onderverdeling van de isotype-geswitchte memory B-cellen kan er gebruik worden gemaakt van membraangebonden IgE, IgG en/of IgA. CD21 en CD38 kunnen toegevoegd worden voor het bepalen van de CD38⁻CD21^{low} B-cellen. Deze zogenaamde CD21^{low} B-cellen, die in gezonde controles slechts een kleine populatie van de B-cellen vertegenwoordigen ($\leq 0\%$), kunnen (sterk) verhoogd zijn in CVID patiënten en in patiënten met auto-immuunziekten.

4.2. Toelichting gating strategie T-cellen

Voor het gaten van de T-cel subsets worden eerst de lymfocyten geselecteerd op basis van een lage SSC-A en CD45 expressie. De T-cellen worden geselecteerd op basis van de CD3 expressie. Vervolgens worden de helper en cytotoxische T-cellen afzonderlijk geselecteerd op basis van respectievelijk CD4 en CD8 expressie.

Voor de gating strategie met de basis markers wordt naast TCR α (of TCR γ) CD3, CD4 en CD8 gebruik gemaakt van CD45RA (of CD45R0) en CD27 (of CD28) om de naïeve (CD27⁺/CD28⁺ en CD45RA^{hi}/CD45R0⁻) T-cellen te onderscheiden van de memory, effector en ver-gedifferentieerde T-cellen. De dubbel-negatieve (CD4⁻CD8⁻) TCR α β -cellen, voor de diagnostiek van ALPS, worden binnen de T⁺CD3⁺ populatie bepaald op basis van afwezige expressie van CD4 en CD8.

Bij de gating strategie o.b.v. de basis en aanvullende markers wordt gebruik gemaakt van CD45RA (of CD45R0), CD197, CD27 (of CD28). Binnen de CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen wordt de CD45RA en CD197 expressie gebruikt om de naïeve (CD45RA⁺CD197⁺), central memory (CD45RA⁻CD197⁺), effector memory (CD45RA⁻CD197⁻) en ver-gedifferentieerde (CD45RA⁺CD197⁻) T-cellen te definiëren. De CD27 (of CD28) expressie kan vervolgens gebruikt worden om te checken of de naïeve T-cellen correct geïdentificeerd zijn; de naïeve T-cellen moeten allen CD27 (en CD28) tot expressie brengen. Binnen de CD4⁺ T-cellen worden de recente thymus-emigranten (T-cellen die recent de thymus hebben verlaten) geselecteerd als CD45RA⁺CD31⁺. Binnen de CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen kunnen de geactiveerde T-cellen geselecteerd worden op basis van HLA-DR of CD38 expressie. Regulatorische T-cellen kunnen betrouwbaar geïdentificeerd worden op basis van CD25 en CD127 expressie (CD25^{hi}CD127⁻), maar voor de PID diagnostiek in het kader van IPEX is, naast CD25 en CD127, een FOXP3 kleuring noodzakelijk. In een deel van de IPEX patiënten dat deficiënt is voor FOXP3⁺ regulatorische T-cellen worden namelijk wel CD25^{hi}CD127⁻ regulatorische T-cellen gedetecteerd.¹⁰

5. Interpretatie

5.1 Immuundeficiënties

5.1.1 Afwijkingen in B-cel subsets

Er wordt, aan de hand van de relatieve en absolute aantallen van de verschillende B-cel subsets onderzocht of er sprake is van een defect in de perifere B-cel differentiatie. Hierbij is belangrijk om op te merken dat bij de meeste, maar niet alle CVID patiënten een defect in de perifere B-cel differentiatie wordt vastgesteld.

Mogelijke afwijkingen in de perifere B-cel subset verdeling zijn:

- Het meest voorkomende probleem bij CVID patiënten is een defect in de differentiatie van naïeve mature B-cellen (CD27⁺IgD⁺) naar memory B-cellen (CD27⁺), waarbij alleen het totaal aantal memory B-cellen verlaagd is.
- Een defect in klasse switch van de memory B-cellen. Hierbij zijn er wel memory B-cellen aanwezig, maar is het aantal isotype-geswitchte memory B-cellen verlaagd.
- Een defect in de proliferatie/overleving van de B-cellen, waarbij met name het aantal naïeve mature B-cellen (CD27⁺IgD⁺), maar ook de aantallen niet-isotype geswitchte memory B-cellen (CD27⁺IgD⁺) en isotype-geswitchte memory B-cellen (CD27⁺IgD⁻) verlaagd zijn.
- Een defect in de aanmaak van B-cellen vanuit het beenmerg, waarbij met name het aantal transitionele B-cellen (CD38⁺,CD24⁺), maar ook de overige B-cel subsets verlaagd zijn.
- Een verhoogd percentage transitionele B-cellen en verlaagd percentage isotype-geswitchte memory B-cellen (CD27⁺IgD⁻IgM⁺) wordt in een deel van de patiënten met activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome (APDS) gezien.^{11, 12}
- Een verhoogd percentage CD21^{lo} is bij CVID patiënten geassocieerd met auto-immuun fenomenen. Deze populatie kan tevens verhoogd zijn bij patiënten met bepaalde virale en parasitaire infecties, CVID en auto-immuunziekten.^{13, 14}

5.1.2. Afwijkingen in T-cel subsets

- Circa 1% van de bevolking is drager van een polymorfisme van het CD45 gen, waardoor CD45RA niet kan switchen naar CD45RO. Bij deze mensen zijn de memory T-cellen CD45RO⁺CD45RA⁺. Dit wordt het CD45RA afschakel defect genoemd. Dit heeft voor zover bekend geen functionele gevolgen.
- Een verhoogd aantal CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (dubbel-negatieve) T-cellen kan veroorzaakt worden door een verhoogd aantal TCR γ δ -cellen of door een verhoogd aantal dubbel-negatieve TCR α β -cellen. Een verhoogd percentage TCR γ δ -cellen (>10%) kan veroorzaakt worden door bv. een infectie of een auto-immuun ziekte of wordt gezien indien het absoluut aantal TCR α β -cellen laag is. Een verhoogd aantal dubbel-negatieve TCR α β -cellen (TCR α CD β ⁺CD4⁻CD8⁻ v a n d e CD3⁺ TCR α β cellen >6%)¹ komt voor bij patiënten met het auto-immuun lymfoproliferatief syndroom (ALPS). Deze patiënten hebben een mutatie in Fas (of FasL of een signaleringsmolecuul in de Fas cascade), waardoor de T-cellen niet in apoptose gaan. Aan het einde van iedere immuunrespons dienen effector cellen weer geëlimineerd te worden om een goede homeostase van het immuunsysteem te waarborgen. CD95 (Fas) speelt hier een belangrijke rol in en triggering van Fas door Fas-ligand leidt tot apoptose van de T-cellen. Bij ALPS patiënten ontstaat er een ophoping van T-cellen in de lymfeklieren en de milt, wat gepaard gaat met auto-immuun verschijnselen. Een normaal percentage dubbel-negatieve TCR α β -cellen sluit de diagnose ALPS echter niet uit, aangezien de cellen zich ook in de weefsels kunnen bevinden. Verhoogde percentages dubbel-negatieve TCR α β T-cellen kan ook gezien worden bij o.a. CVID.
- Een verlaagd aantal naïeve T-cellen (CD4 en/of CD8), verhoogd aantal TCR γ δ -cellen kan gezien worden bij combined immunodeficiency.
- Een verhoogd percentage (leeftijdsafhankelijk) ver-gedifferentieerde CD8⁺ T-cellen (CD8⁺CD27⁻) past bij een latente CMV infectie en is niet afwijkend indien de patiënt seropositief is voor CMV. Bij een CMV seronegatieve patiënt is een verhoogd percentage ver-gedifferentieerde CD8⁺ T-cellen afwijkend en een aanwijzing voor een mogelijke immuundeficiëntie.¹⁵
- Verlaagde of afwezige expressie van FOXP3 in CD4⁺ CD25⁺ T-cellen kan passen bij IPEX. De CD25 expressie is dan normaal.
- Een verlaagde of afwezige expressie van CD25 kan passen bij een CD25 deficiëntie. Enkele andere voorbeelden van deficiënties - niet alles omvattend en gericht op toepassing van de panels - zijn MHCII, CD27 en CD28 deficiënties.
- Een verlaagd percentage regulatoire CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} T-cellen kan een teken zijn van verminderde perifere tolerantie en passen bij auto-immuniteit.
- Een verhoogd percentage CD38^{hi}HLA-DR⁺ T-cellen (CD4⁺ en CD8⁺) kan een teken zijn van hyperinflammatie en immuundysregulatie, mits er geen sprake is van een infectie.

5.2 Immuunmonitoring

Het monitoren van lymfocyten subsets is het meest bekend van de patiënten met een HIV besmetting waarbij de absolute aantallen CD4⁺ T-cellen een belangrijke parameter zijn om opportunistische infecties in te schatten. Sinds het gebruik van B-cel depletie als therapie voor verschillende auto-immuunziekten wordt ook het monitoren van absolute aantallen B-cellen veel gebruikt om de therapie frequentie vast te kunnen stellen. Herstel vindt plaats vanuit het beenmerg en daarom is het verschijnen van transitionele B-cellen een teken van repopulatie. In sommige ziekten, zoals SLE, bevinden zich relatief veel plasmablasten in de circulatie die resistent zijn tegen de meeste vormen van B-cel depletie. Onderscheid tussen transitionele B-cellen en plasmablasten is daarom van toegevoegde waarde ten aanzien van besluitvorming over het herhalen van therapie. Bovenmatige aanwezigheid van plasmablasten kan bovendien een overweging zijn om belimumab (anti-Blys) toe te voegen als therapie. Immunosuppressie, zoals veelal gegeven wordt bij ziektebeelden als SLE en ANCA-geassocieerde vasculitis (AAV), resulteert in ernstige aantasting van het immuunsysteem. De kritische ondergrens van 200 CD4⁺ T-cellen/ μ L, die gehanteerd wordt bij HIV patiënten, wordt ook bij patiënten langdurig behandeld met cyclofosfamide en/of corticosteroïden regelmatig gepasseerd. Adequate profylaxe tegen opportunistische infecties is dan ook aangewezen. Bovendien biedt immuunmonitoring de mogelijkheid voor de arts om een goede afweging te maken met betrekking tot het delicate evenwicht tussen enerzijds een effectieve behandeling van de auto-immuunziekte en anderzijds het risico op infecties, maligniteiten en/of hart- en vaatziekten. Hierbij is informatief de aanwezigheid van (i) geactiveerde T-cellen als teken van ziekteactiviteit (ii) NK-cellen, vaak gereduceerd na langdurig azathioprine gebruik en risicofactor voor het ontwikkelen van maligniteiten (iii) effector memory T-cellen in het CD4⁺ T-cel compartiment, als risicofactor voor hart- en vaatziekten en (iv) effector memory T-cellen in het CD8⁺ T-cel compartiment, als afspiegeling van chronische virale infecties. Het effectief gebruiken van immuunmonitoring vergt derhalve een goede kennis van de differentiële effecten van immunosuppressieve therapieën op de lymfocyten subsets zoals bepaald in een uitgebreide immuunfenotypering.

5.3 Immuunrestitutie

Bij de immuunrestitutie bepalingen worden de resultaten direct gerapporteerd aan de kliniek. Na stamceltransplantatie kan de aanvragend arts de resultaten gebruiken voor:

- Het vaststellen van discontinuatie cotrimoxazol behandeling op basis van het CD4⁺ T-cel aantal (in verband met *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP) risico).
- Het vaststellen van discontinuatie IVIG-behandeling op basis van het B-cel aantal.
- Starten vaccinatie schema.
- Interpretatie van klinisch graft-versus-host beeld op basis van het CD8⁺ T-cel aantal. Indien het aantal CD8⁺ T-cellen laag is, dan is de kans dat er sprake is van graft-versus-host ziekte nihil.

6. Referentiewaarden

Er worden diverse referentiewaarden gebruikt, gebaseerd op literatuur of zelf gegenereerde referentiewaarden¹⁶⁻²². Belangrijk aspect bij de referentiewaarden is dat deze leeftijdsafhankelijk zijn.

Het verdient aanbeveling om referentiewaarden van lymfocyten subset bepalingen uitgevoerd volgens deze aanbeveling opnieuw uit te voeren in een multi-center setting. Dit om een indruk te verkrijgen van de variatie van de testresultaten en te bepalen of het mogelijk is om universele referentiewaarden vast te stellen.

7. Rapportage

De resultaten worden geïnterpreteerd op basis van de flowcytometrische analyse, referentiewaarden en relevante klinische gegevens. Afhankelijk van de afspraken met de aanvragers wordt de vakinhoudelijke interpretatie van de resultaten eventueel gedeeld middels een tekstuele conclusie of in een MDO/casuïstiek bespreking.

8. Referenties

1. ESID Registry Working Party criteria (<https://esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria>)
2. Adviescommissie Neonatale Screening SCID. Vervolgbeleid na verwijzing vanuit de hielprikscreening op SCID.
3. J.J.M. van Dongen, M. van der Burg, T. Kalina et al. EuroFlow-based flowcytometric diagnostic screening and classification of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Frontiers Immunol.* 2019;13:10:1271.
4. J. Damoiseaux, E.P.A. Kamer, V.H.J. Van der Velden. Herstel van B-celimmunitet na B-celdepletie: het belang van immuunmonitoring. *NTVH* 2012;18:60-67.
5. P. Roll, A. Palanichamy, C. Kneitz et al.. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Aug; 54(8):2377-86.
6. Vaccinatieadviezen bij chronisch inflammatoire aandoeningen: <https://lci.rivm.nl/overig/chronisch-inflammatoire-aandoeningen> (Publicatiedatum 29-04-2019).
7. A. Sureda, S. Corbacioglu, R. Greco. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*, ISBN 978-3-031-44079-3, 2024. Springer. (Online versie: www.ebmt.org)
8. HOVON SCT werkgroep. Leidraad sampling na allogene stamceltransplantatie. 2024. Unpublished.
9. RIVM richtlijn: <https://lci.rivm.nl/overig/hematologische-aandoeningen> (Publicatiedatum 06-05-2023).
10. K. Otsubo, H. Kanegane, Y. Kamachi et al. Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4 +CD25+CD127low) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Clin Immunol.* 2011; 141(1):111-20
11. E. Elkaim, B. Neven, J. Bruneau et al. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):210-218
12. T.I. Coulter, A. Chandra, C.M. Bacon et al. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome: A large patient cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Feb;139(2):597-606
13. C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008;111 (1): 77 -85.
14. J. Boileau, G. Mouillot, L. Gérard et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: Correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *J. Autoimmun.* 2011;36 (1): 25-32
15. T.W. Kuijpers, M.T. Vossen, M.R. Gent et al. Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *Immunol.* 2003 Apr 15;170(8):4342-8.
16. P. Saule, J. Trauet, V. Dutriez et al. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006;127: 274-281
17. M. van der Burg, T. Kalina, M. Perez-Andres, et al. The EuroFlow PID Orientation Tube for Flow Cytometric Diagnostic Screening of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. *Frontiers Immunol.* 2019;Mar 4:10:246.
18. G.J. Driessen, V..A.S.H. Dalm, P.M. van Hagen et al. Common variable immunodeficiency and idiopathic primary hypogammaglobulinemia: two different conditions within the same disease spectrum. *Haematologica.* 2013 Oct;98(10):1617-23.
19. R. van Gent, C.M. van Tilburg, E.E. Nibbelke et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin. Immunol.* 2009 Oct;133(1):95-107
20. W.M. Comans-Bitter, R. de Groot, R. van den Beemd et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.* 1997 Mar;130(3):388-93

21. D.J. aan de Kerk, M.H. Jansen, I.J.M. ten Berge et al. Identification of B cell defects using age-defined reference ranges for in vivo and in vitro B cell differentiation. *J. Immunol.* 2013 May 15;190(10):5012-9.
22. A. Oras, B. Quirant-Sanchez, D. Popadic et al. Comprehensive flow cytometric reference intervals of leukocyte subsets from six study centers across Europe. *Clin. Exp. Immunol.* 2020;202: 363-378.