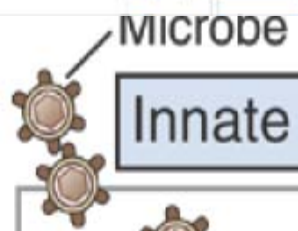


## **BILAN *IN VITRO* D'UNE SUSPICION D'IMMUNODEFICIENCE**

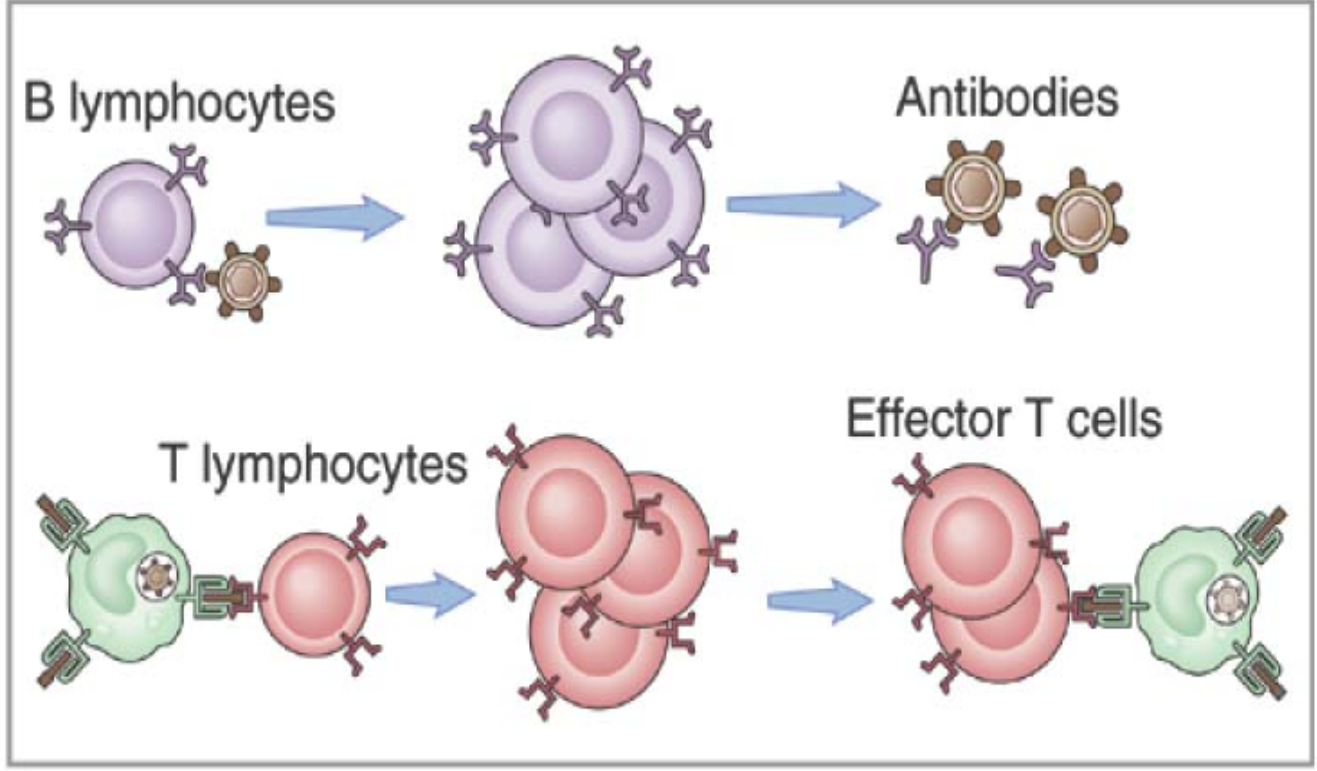
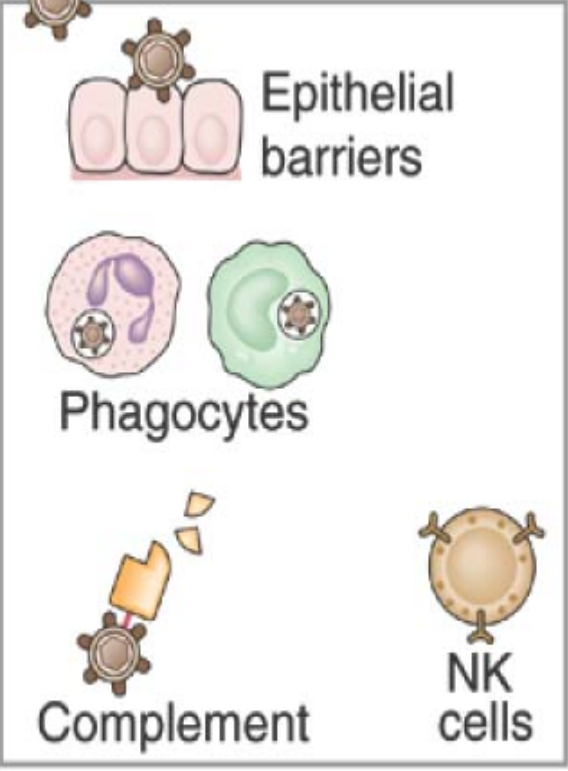
Dr J. Smet  
Clinique d'Immunobiologie  
Hôpital Erasme  
[Julie.Smet@erasme.ulb.ac.be](mailto:Julie.Smet@erasme.ulb.ac.be)

15 mars 2012



# Innate immunity

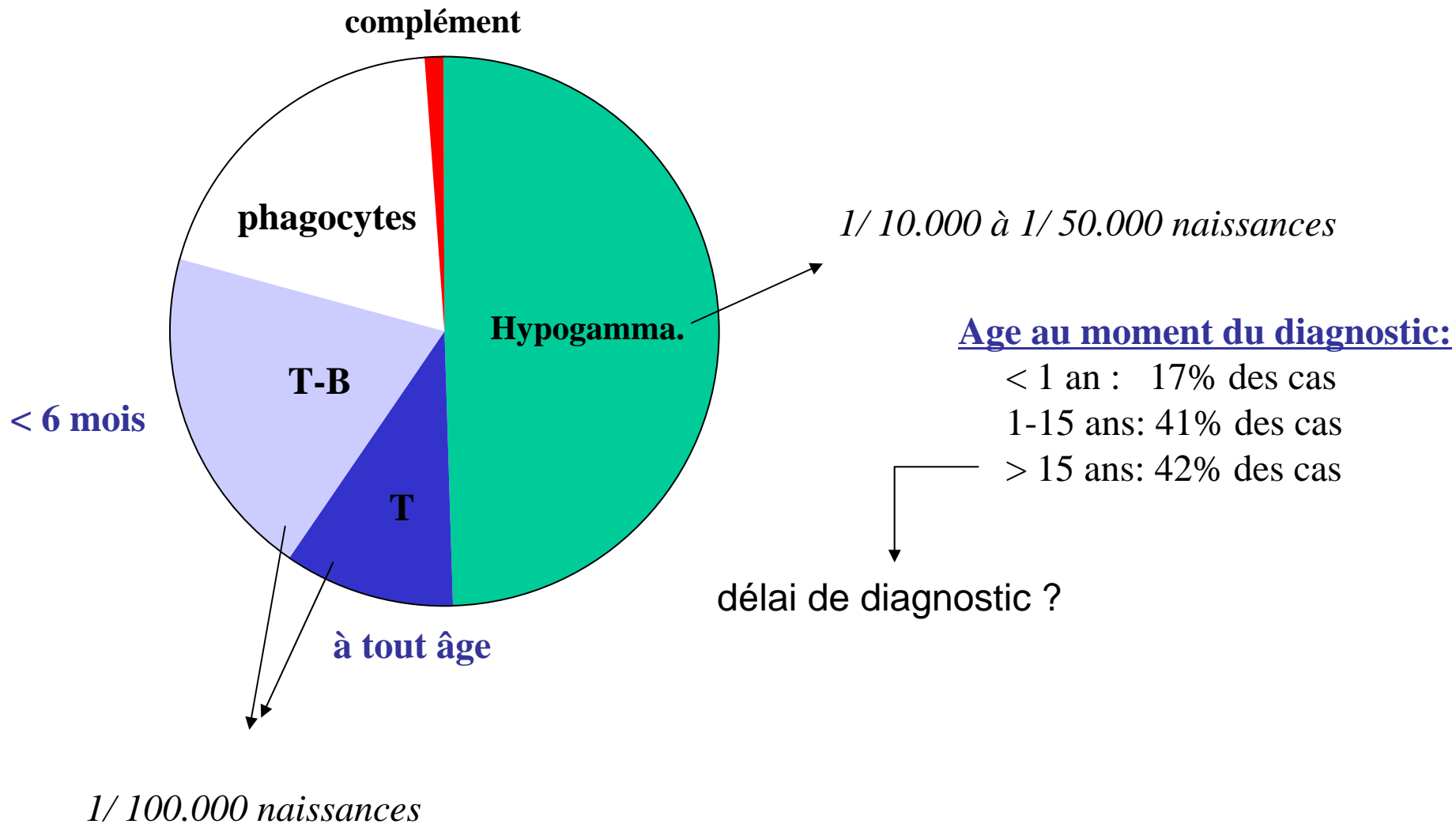
# Adaptive immunity



# Immunodéficiences primaires

## Orientation de la mise au point:

### Age du patient



# Orientation de la mise au point: en fonction de l'agent pathogène rencontré

- **Bactéries extra-cellulaires:**

*H. Influenzae* non typable  
*Streptococcus pneumoniae*  
pfs *Staphylococcus aureus*  
Meningocoque  
Streptocoque groupe A  
*M pneumoniae*, *U urealyticum*  
Giardia lamblia, Campylobacter jejuni

...infections des VRS/ VRI



**Hypogammaglobulinémie**  
**Neutropénie**  
**Déficit en complément**

*Asplénie*  
*def IRAK-4/ NEMO (Pneumo)*  
*(signalisation TLR)*

*Staphylococcus aureus*  
pfs *Klebsiella*  
*E Coli*  
*Enterobacter, serratia*  
*Pseudomonas, Salmonella*

...infections cutanées/ abcès



**Déficit des poly neutro**

- **Protozoaires**

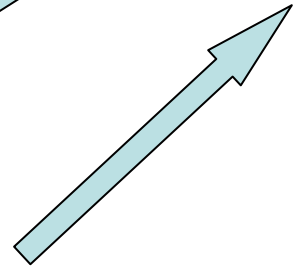
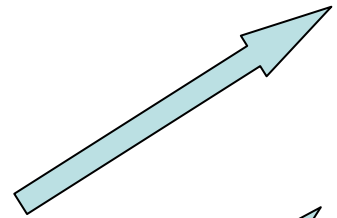
- toxoplasme
- microsporidium
- cryptosporidium



**Déficit lympho T**

- **Bactéries intra cellulaires**

- Mycobacterium spp
- salmonella



- **Champignons**

- SUPERFICIEL** candidose
- aspergillus, cryptocoque
- histoplasme
- Pneumocystis jiroveci/carinii*

- INVASIF**

- candidose disséminée
- aspergillus
- nocardia



**Déficit des poly neutro**

**Il est facile d'exclure l'existence d'un déficit immunitaire**

**MAIS**

**Il est parfois difficile d'identifier avec précision la nature du déficit immunitaire**

## I. HYPOGAMMAGLOBULINEMIES

### Signes cliniques suspects:

- **infections oto-broncho-pulmonaires récurrentes**
- parfois diarrhée chronique
- parfois méningite
- parfois septicémie

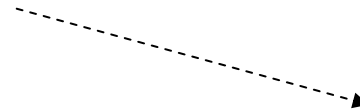
### Pathogènes suspects:

- surtout des bactéries avec capsule polysaccharidique:  
**Haemophilus influenzae type b- Pneumocoque**  
Méningocoque
- parfois d'autres bactéries:  
Campylobacter – Pseudomonas
- certains parasites:  
Giardia – cryptosporidium
- certains virus:  
herpès zoster - virus écho (polio) - rotavirus

## La mise au point biologique de départ

- examen hématologique + formule sg
- vitesse de sédimentation / CRP

+



- Dosage des **Immunoglobulines tot.**  
IgG, IgA, IgM, IgE

- EFO des protéines (Alb.)

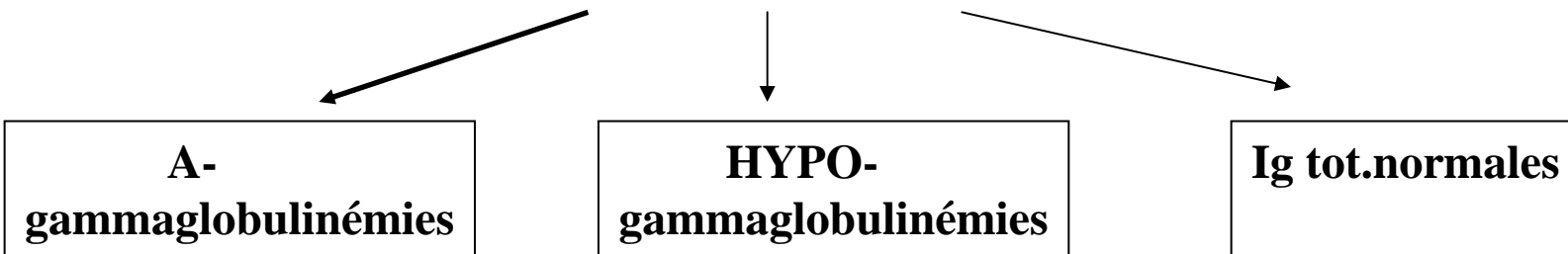
- recherche d'**anticorps spécifiques**:  
allo-hémagglutinines  
IgG anti-pneumocoque  
IgG anti-tétanos

- Complément hémolytique total  
voie classique

- Compl. voie alterne  
et dosage de la MBP



# HYPOGAMMAGLOBULINEMIES



- liée à X (BTK)
- autosomique récessif

- transitoire de l'enfance
- ID commune variable

- 1 isotype: IgA
- 1 sous-classe: IgG1 / IgG2...
- 1 chaîne légère: ch kappa
- anticorps: SAP

Ig totales

Anticorps spécifiques

*Jeunes enfants*

*Enfants /  
Adultes*

*Enfants /  
Adultes*

# HYPOGAMMAGLOBULINEMIES



**HYPO-  
gammaglobulinémies**

**enfants < 3 ans**

**Hypogammaglobulinémie  
TRANSITOIRE  
de l'enfance**

↓ IgG, ↓ IgA, ↓ IgM

Synthèse d'anticorps spécifiques  
généralement N

Spontanément résolutif

**Immunodéficience commune  
variable**

↓ IgG, ↓ IgA, ↓ IgM

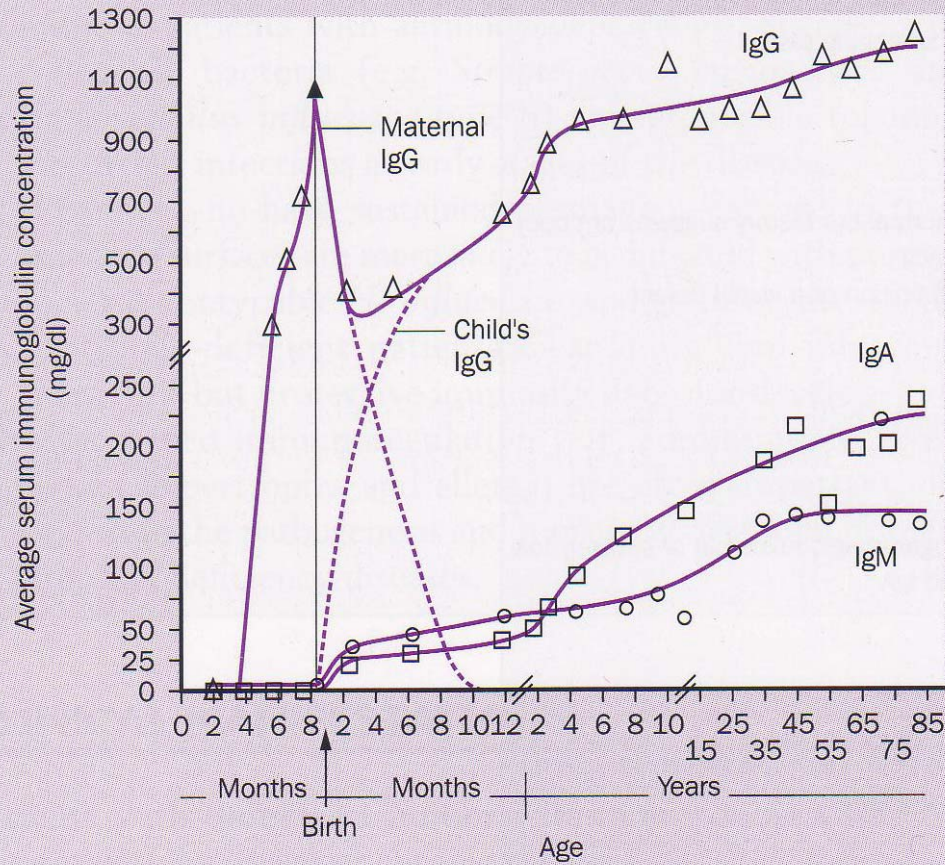
**ABSENCE** de synthèse d'Ac spécifiques

Traitement substitutif indispensable

Complications:

- Manifestations auto-immunes
- Lymphoprolifération
- Affections granulomateuses

### Age-related changes in the serum concentration of immunoglobulins



## Quels ANTICORPS rechercher ?

...anticorps normalement présents chez des enfants du même âge sans hypogammaglobulinémie.....

< 6 mois

?

> 6 – 12 mois

Ac >< antigène **protéique**:  
IgG anti-anatoxine tétanique

> 12 mois

Ac >< antigène **polysaccharidique**

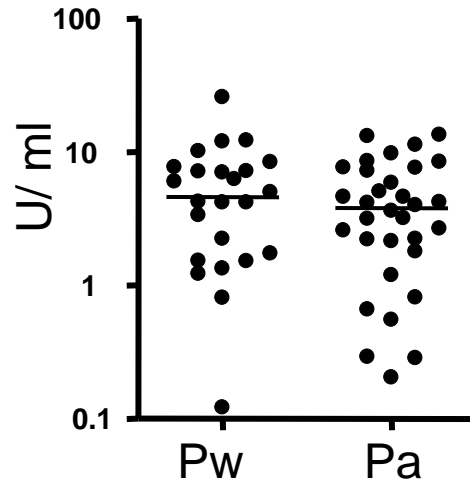
- Ac naturels : les allo-hémagglutinines (IgM)
- Ac acquis : IgG anti-polysaccharides du pneumocoque

## Taux d'anticorps spécifiques >< antigène protéique

### Les IgG anti-anatoxine tétanique: avant / 3 sem après rappel

- sérum
- Technique ELISA peu standardisée mais robuste
- Taux protecteur 0.01 U/ml
- Technique valable pour taux d'Ac > 0.15 U/ml
- Non remboursé par l'INAMI (6 E)

6 months





## Taux d'anticorps spécifiques

### IgG anti-polysaccharides du pneumocoque: avant/ 3 sem après vaccin polysaccharidique

- Dosage des IgG >< polysaccharides du vaccin pneumo 23
  - test non standardisé
  - limites du test définies à Erasme:
    - < 11 U très faible ou absent
    - 11 – 15 U taux faible
    - > 15 U taux correct
- Dosage des Ac >< différents sérotypes
  - choix des sérotypes 14, 19F, 23F, 1, 7F (!! Indiquer le statut vaccinal)
  - technique standardisée
  - résultats exprimés en ng/ml
  - difficultés d'établissement des normes
- Coût des tests:
  - avt vaccin : 18 E par test facturé au patient - max 3 tests
  - après vaccin: remboursé par l'INAMI**

# Vaccins pneumococciques

- **Pneumovax®** : Pneumo23:  
1, 2, 3, **4**, 5, **6B**, 7F, 8, 9N, **9V**, 10A, 11A, 12F, 14, 15B,  
17F, **18C**, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F
- **! Prévenar®** : vaccin conjugué: 7-valent:  
4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
- **Synflorix**: vaccin conjugués 10-valent:  
4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, **1**, **5**, **7F**
- **Prevenar 13**: vaccin conjugués 13-valent:  
4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, **1**, **5**, **7F**, **3**, **6A**, **19A**

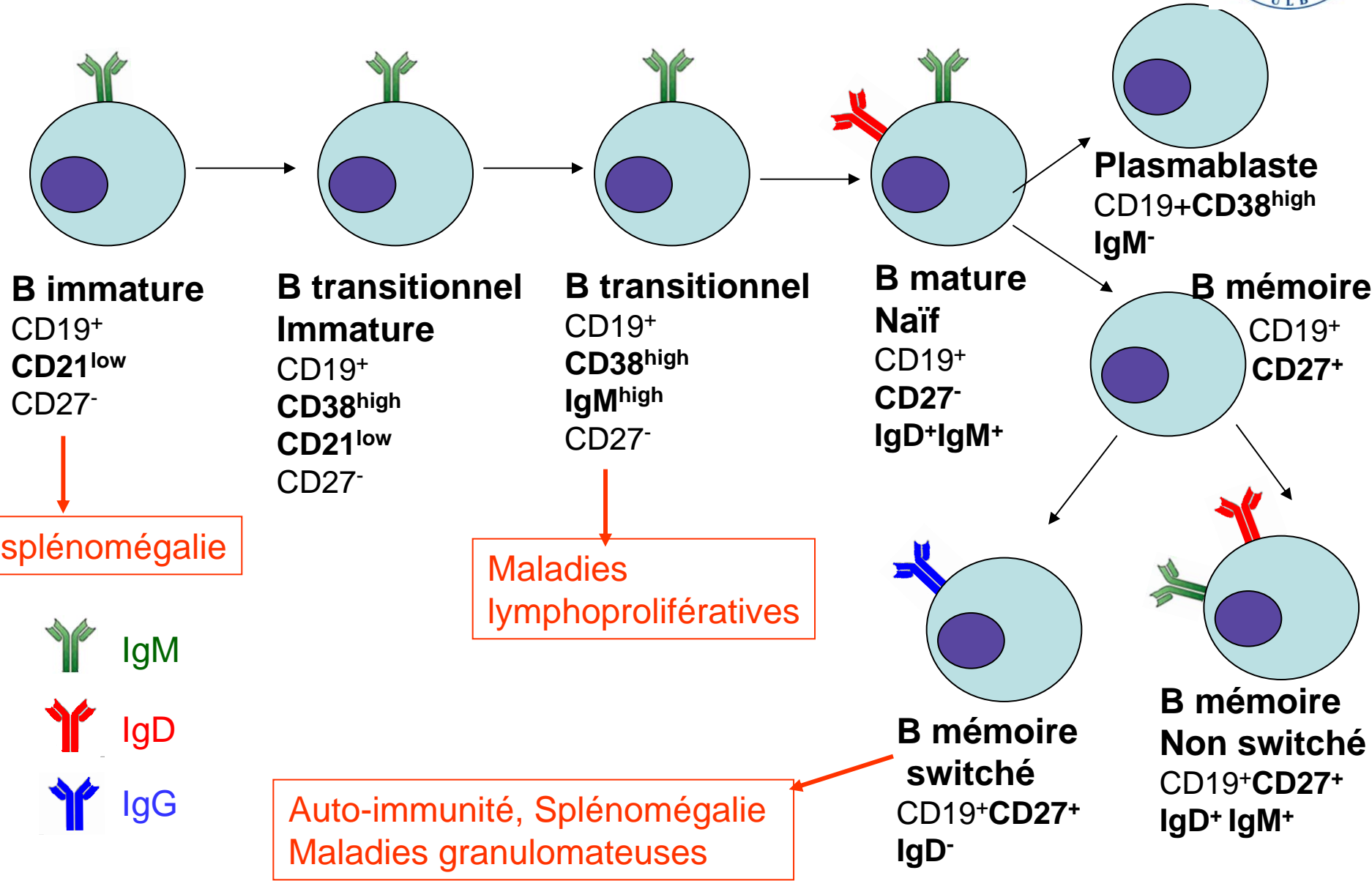


# La mise au point biologique complémentaire de l'HYPOGAMMAGLOBULINEMIE

## 1° Phénotypage des lymphocytes circulants

- **Agammaglobulinémie:** absence de lymphos B CD19+ circulants
  - **CVID (Immunodéficience commune variable):**
    - \* *Le phénotypage des lymphos B est actuellement la base d'une classification*  
*Tentatives d'associations de certains marqueurs phénotypiques aux complications*
- CD19 CD27 IgD**      apparition de CD27 sur les lympho B MEMOIRES  
disparition de l'IgD sur les lympho b « switchés »
- CD21**                      non exprimé sur les B immatures

# Maturation du lymphocyte B



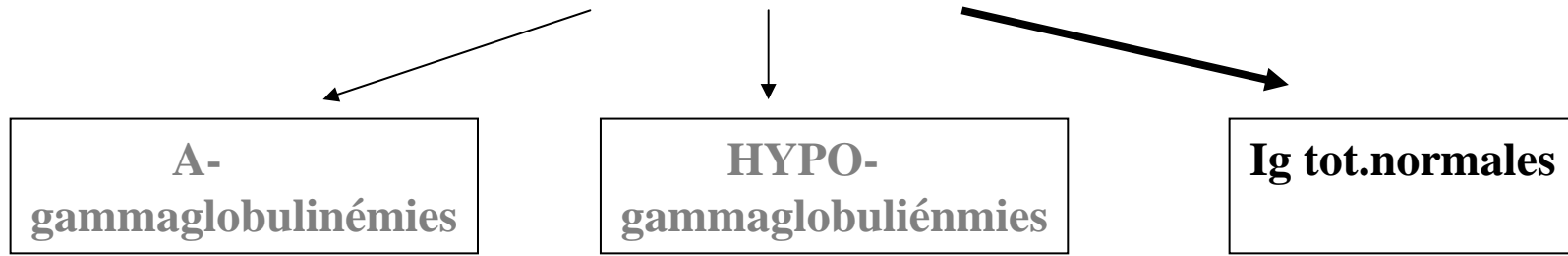
## La mise au point biologique complémentaire

### 2° Evaluation fonctionnelle des lymphos. T

- test de transformation lymphoblastique aux mitogènes
- test de transformation lymphoblastique aux antigènes (anatoxine tétanique)

### 3° Confirmation génétique

# HYPOGAMMAGLOBULINEMIES



- liée à X
- autosomique récessif

- transitoire de l'enfance
- ID commune variable

- 1 isotype: IgA
- 1 sous-classe: IgG1 / IgG2...
- 1 chaîne légère: ch kappa
- anticorps: SAD (specific Ab deficiency)
- syndrome hyper IgM

Ig totales

Anticorps spécifiques

## HYPOGAMMAGLOBULINEMIES

↓ IgA: < 5 mg/ 100ml

### Interprétation des résultats et attitude

- 1 / 600 donneurs de sang (prévalence Europe: 1:163 à 1:875)
- origine autosomique récessive (dominant)  
parfois sporadique  
parfois induit par des médicaments
- exclure un autre déficit associé:**
  - défaut de synthèse des anticorps >< polysaccharides
  - (IgG2)
- évaluer le « risque transfusionnel »: anti-IgA**

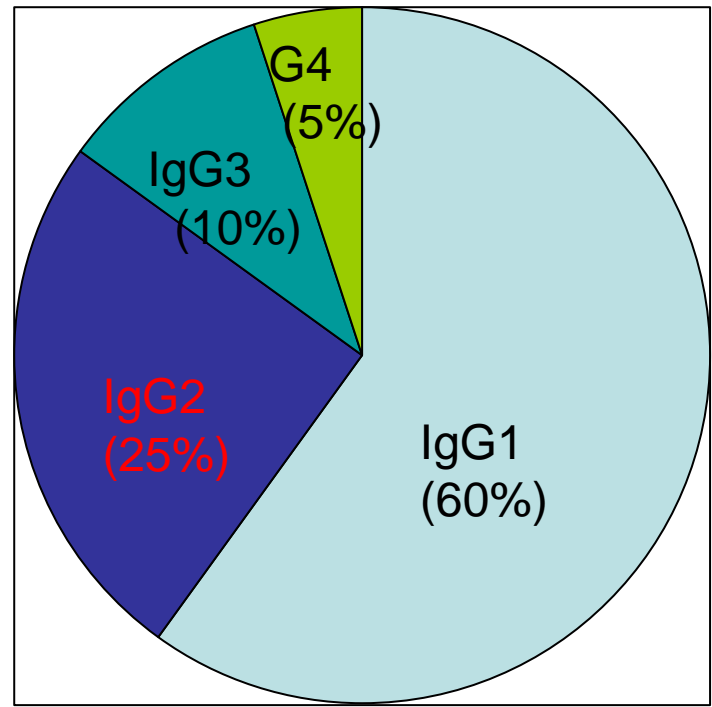
# HYPOGAMMAGLOBULINEMIES

↓ sous-classe d'IgG

Hypo IgG 3    Hypo IgG4

Hypo IgG2:

- Normes difficiles à établir
- souvent asymptomatique
- rechercher déficit associé:  
SYNTH Ac >> POLYSACCH.



IgG1: hypo IgG

## Défaut de synthèse d'anticorps anti-polysaccharides

**Enfants / adultes**

**Infections répétées ORL / voies resp par bactéries encapsulées**

- **concentrations normales d'Ig totales**
- **synthèse normale d'anticorps >< antigènes protéiques**
- **défaut de synthèse d'anticorps anti-polysaccharides:**
  - **absence d'allo-hémagglutinines**
  - **absence de synthèse d'IgG anti-polysaccharide du pneumocoque même après vaccination avec le vaccin polysaccharidique**
- **Peut être isolé**
- **Peut faire partie d'un syndrome**
  - **syndrome de Di George**
  - **syndrome hyper IgM**
  - **défaut de signalisation intracellulaire (NEMO / IRAK4)**

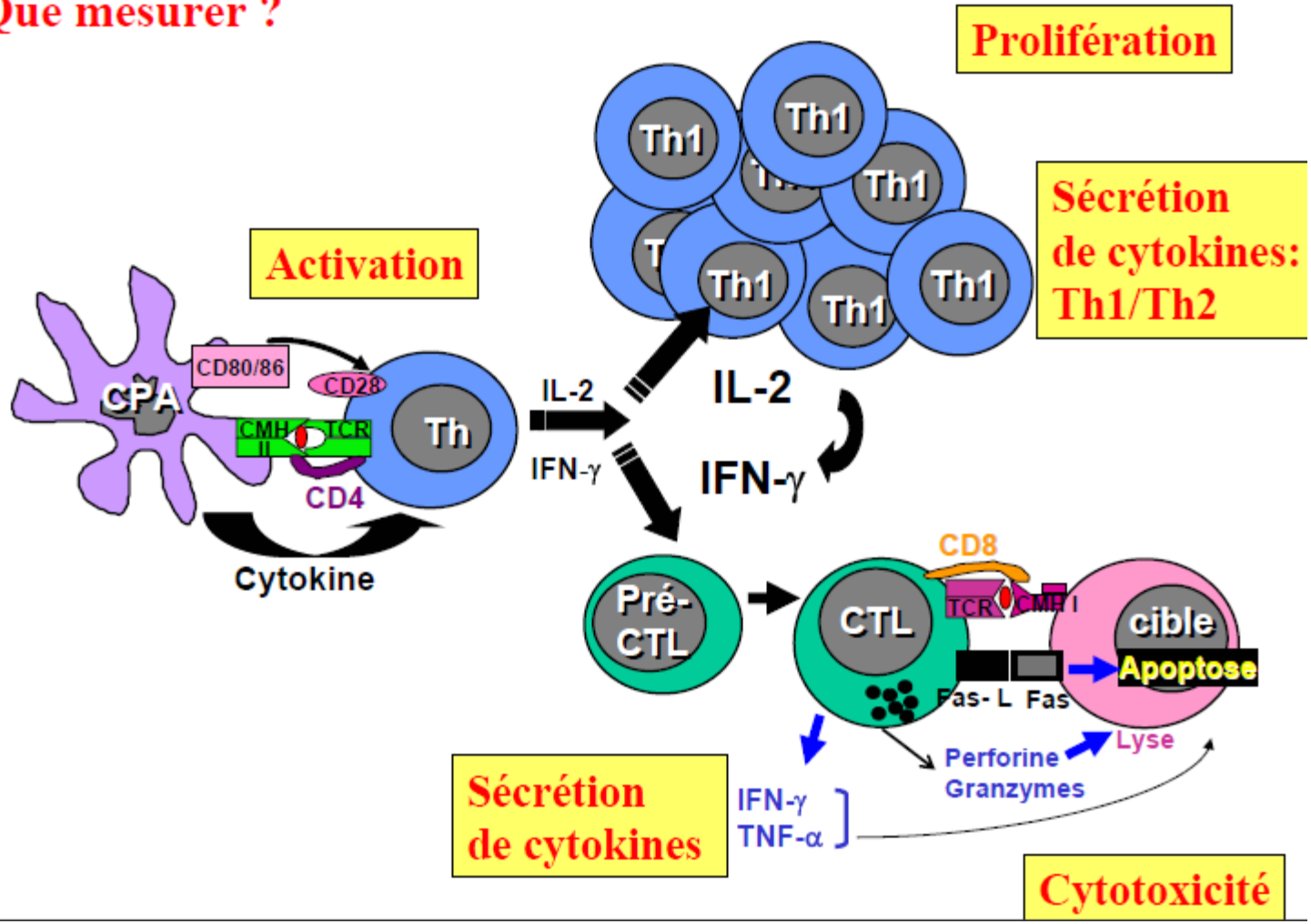
## **II. EXPLORATION DES DEFICITS DES LYMPHOS T:**

### **Déficits immunitaires cellulaires et combinés T-B**



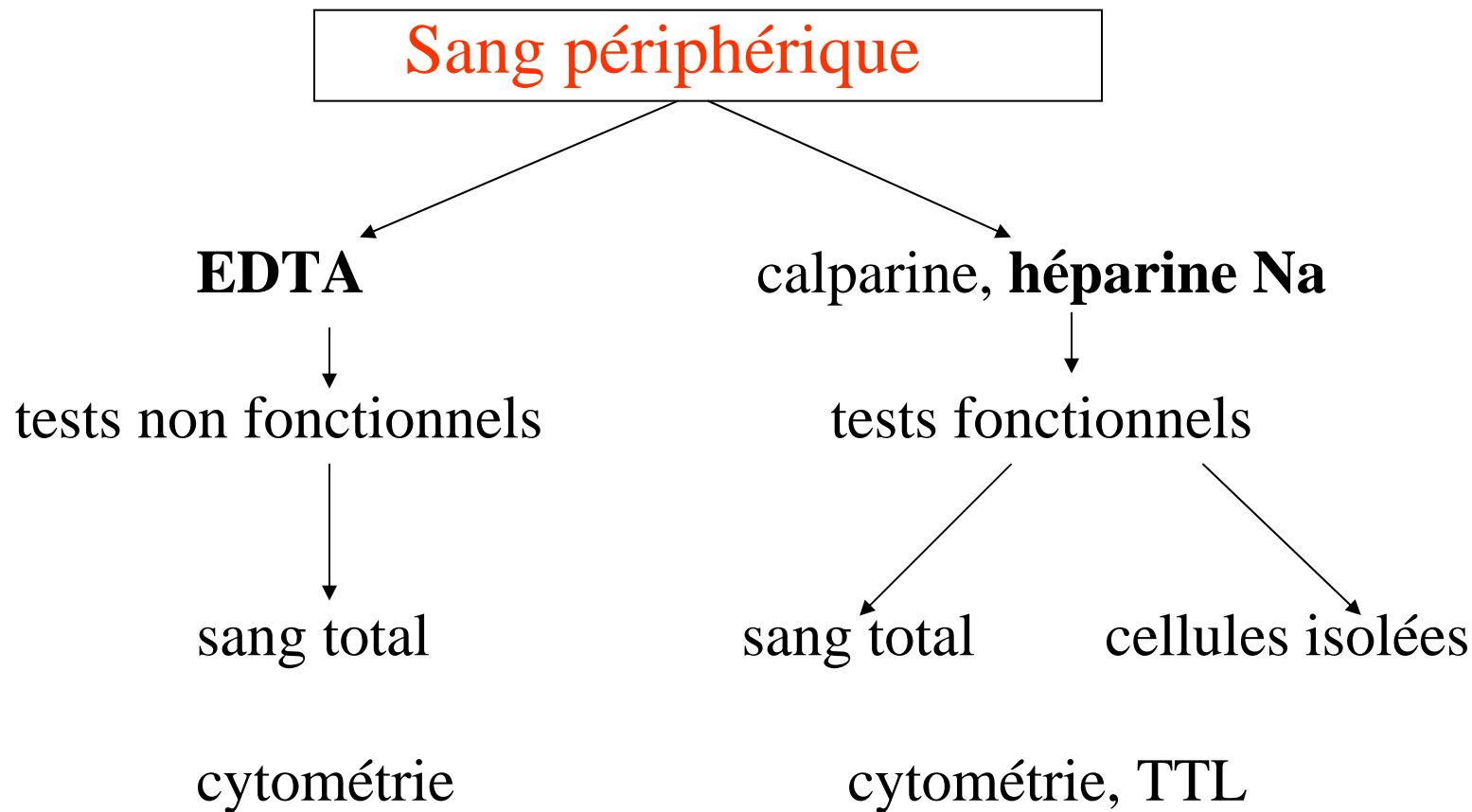
# Réponse immunitaire spécifique

Que mesurer ?



# Types de prélèvements

---

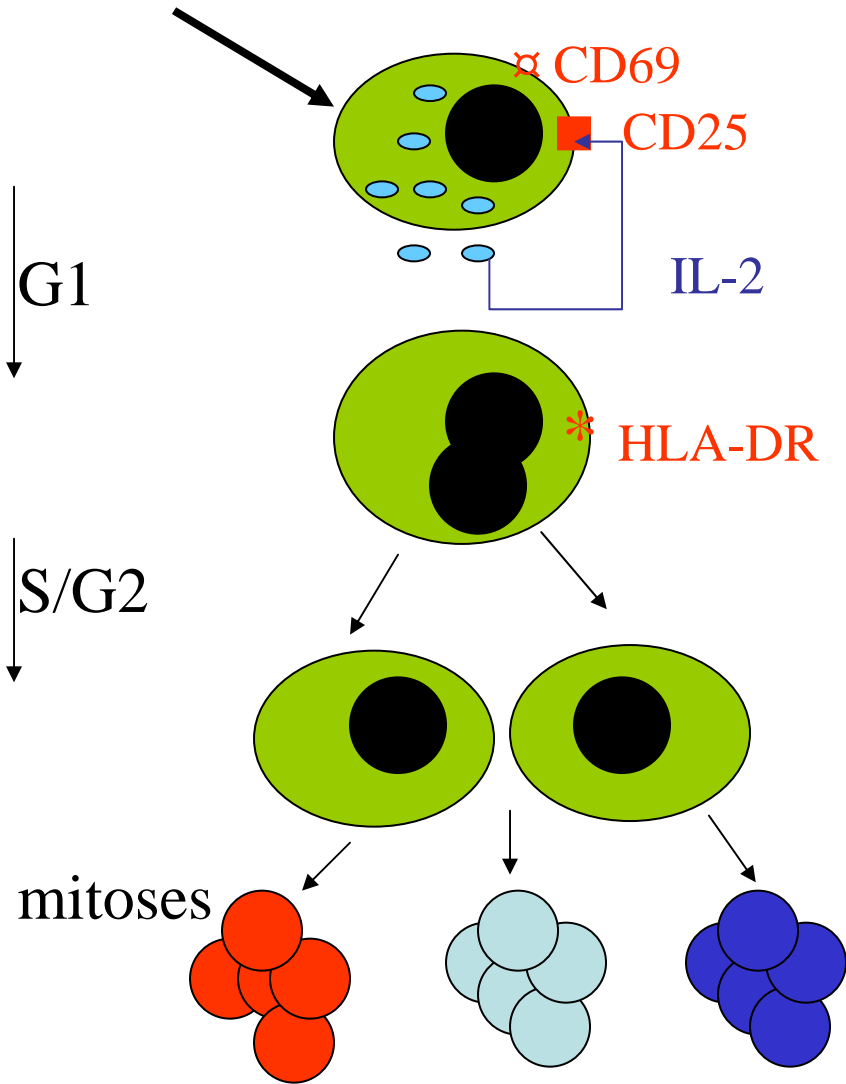


# Activation des lymphocytes T

Marqueurs d'activation précoces  
Production de cytokines

Marqueurs d'activation tardifs  
Synthèse d'ADN

Marqueurs de différenciation



TTL

T régulateurs T mémoires T effecteurs

# Le test de transformation lymphoblastique ou TTL

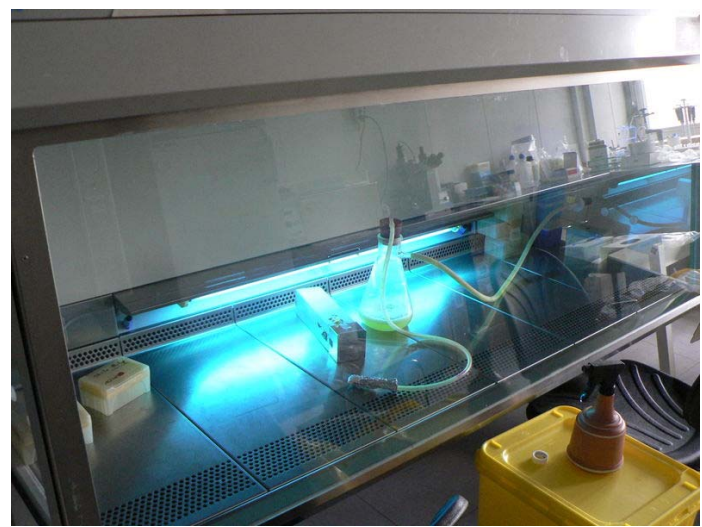
---

*in vitro*: mesure la capacité des lymphocytes (T) à proliférer  
=reflet global de la capacité de réponse, événement tardif

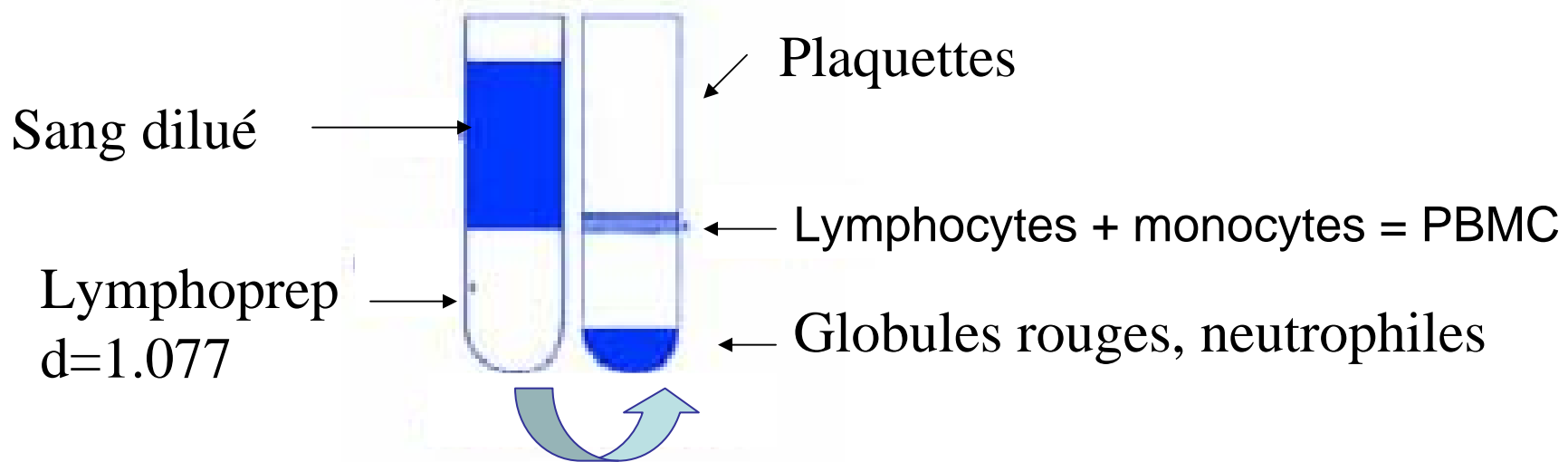
# Le TTL en pratique

---

➤ manipulations en milieu ambiant stérile, avec matériel stérile

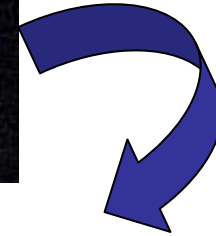


- prélèvement de sang hépariné ou calpariné stérile
- séparation des cellules mononucléées sanguines



Centrifugation 800g, 30 min, 20°C

- lavage des PBMCs en tampon Hank's sans Ca<sup>2+</sup>
- resuspension PBMC à 1 à 2 M/ml en milieu de culture complet RPMI 1640 complet (10 % sérum humain + géomycine + glutamine +.....)
- addition de l'activateur



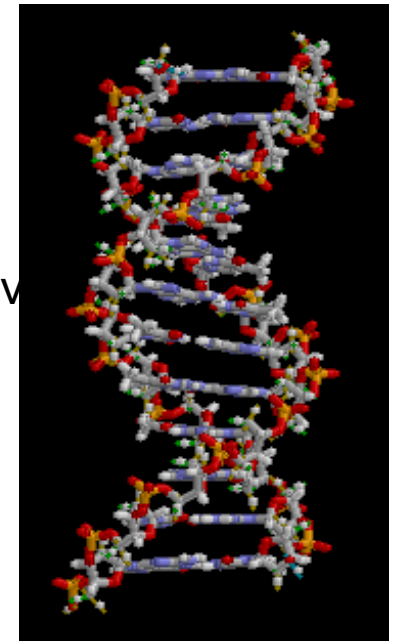
- mise en plaques 96 puits: 200 µl/puits



➤ incubation à 37°C dans une atmosphère humide, 5 % CO<sub>2</sub> pendant 3 (mitogènes) à 6 jours (antigènes)



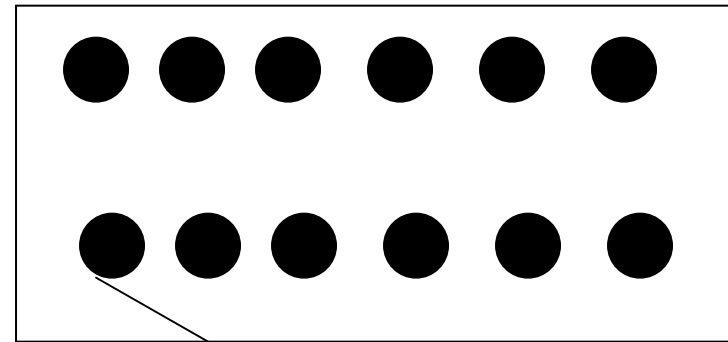
➤ addition au 2<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> jour de thymidine méthyl tritiée - nucléotide radioactif - qui s'incorpore dans l'ADN qui se div



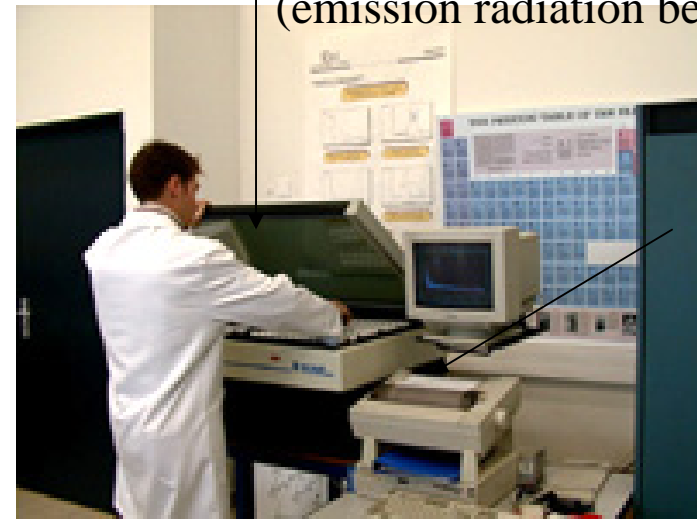
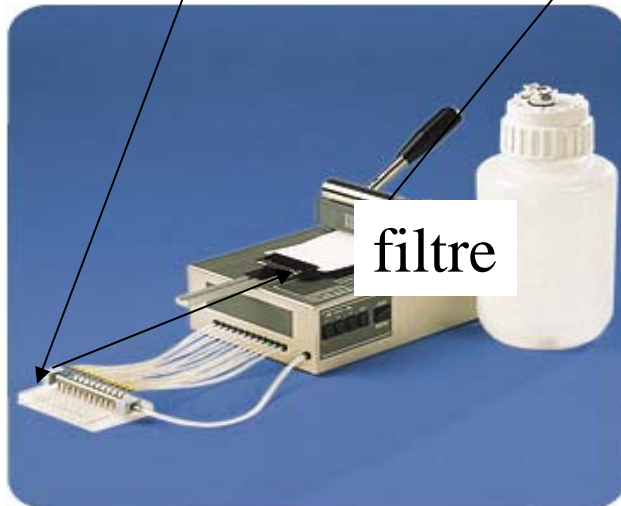


➤ incubation 18-24 heures à 37°C

➤ récolte et comptage



fiolle à scintillation liquide  
(émission radiation beta)



➤ résultats exprimé en cpm (coups par minute)

-proportionnels à la quantité d'ADN nouvellement synthétisée pendant les 18-24 heures d'incubation

-proportionnels à la fréquence des cellules activées en division

-donc cpm supérieurs dans l'activation polyclonale, non spécifique par rapport à l'activation « clonale » spécifique

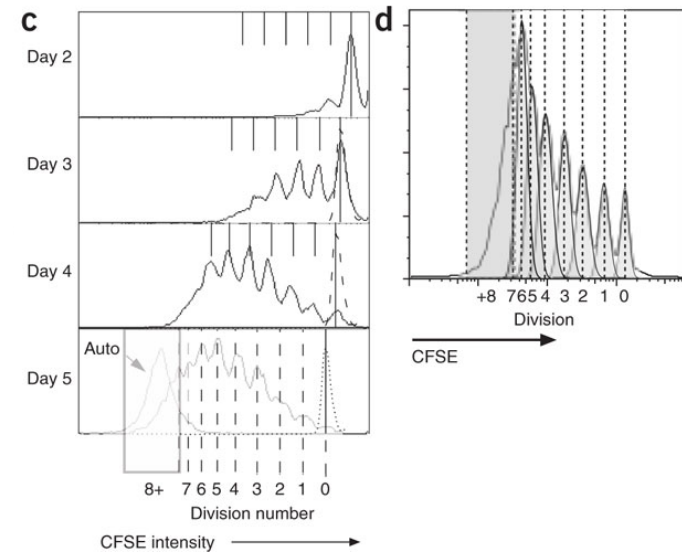
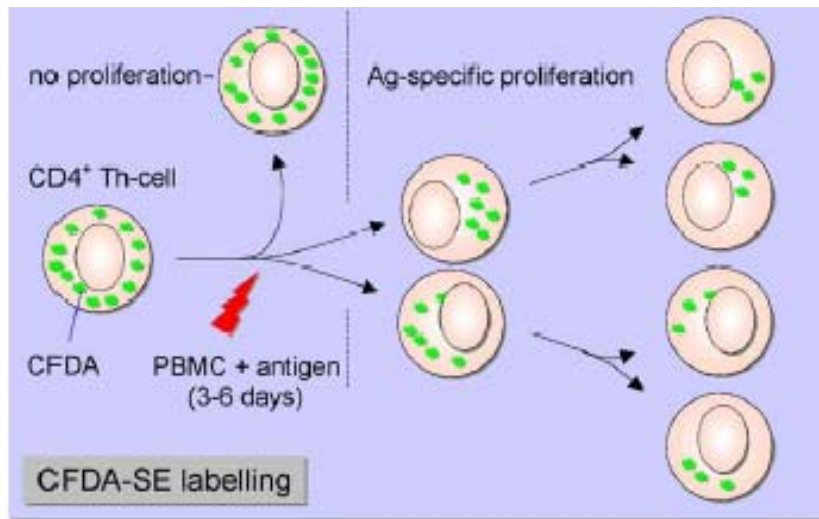
-ne renseigne pas sur le nombres de divisions depuis le début de la culture ni sur le type de lymphocytes T (CD4+ ou CD8+) qui se divisent.

**-utilisation de produits radioactifs**

## ➤ alternatives non radioactives en cytométrie de flux

→ technique bromodeoxyuridine (BrdU)

→ technique carboxy-fluoresceine diacetate, succinimidyl ester **CFSE**  
*nombre de divisions cellulaires*  
*type de lymphocytes en division + (profil cytokine..)*



→ technique de mesure d'induction de marqueurs d'activation

# Activateurs polyclonaux, non spécifiques

## Mitogènes:

**Lectines:** glycoprotéines multimériques d'origine végétale se liant aux oligosaccharides situés à la surface des lymphocytes

Phytohémagglutinine: PHA (lymphocytes T)

Concanavaline A: ConA (lymphocytes T)

Mitogène du pokeweed: PWM (lymphocytes T et B)

**Anticorps anti-lymphocytes T:** spécifiques d'épitopes de molécules transmembranaires des lymphocytes T

Globulines anti-lymphocytaires: GAL

Anti-CD2/2R

Anti-CD3 souvent utilisés ensemble

Anti-CD28

## Agents inducteurs de signaux intracellulaires

Ionophore calcique (A23187 ou ionomycine) et phorbol ester acetate (PMA)

# Activateurs clonaux, immunisation préalable ( $<1\%$ des lymphocytes T)

---

## Antigènes de rappel (« recall »):

Tuberculine (PPD, purified protein derivative  $<M.tuberculosis$ )  
(équivalent *in vitro* du test à la tuberculine)

Anatoxine tétanique (TT, toxine détoxifiée  $<Clostridium tetani$ )

Candidine ( $<Candida albicans$ )

Toxine pertussique (PTX,  $<Bordetella Pertussis$ )....;.

## Indications du TTL en biologie clinique

### Mitogènes et antigènes de rappel

- diagnostic et monitoring des immunodéficiences primaires et secondaires
- monitoring des thérapies immunomodulatrices ex anti-CD3
- suivi de reconstitution immune post-transplantation de moelle ou de cellules souches
- suivi de reconstitution immune post thérapie anti-rétrovirale:  
ex HAART chez patients VIH



# Cytométrie de flux

## immunophénotypage des lymphocytes

### Applications en biologie clinique: multiples

- cellules < sang, moelle, autres liquides biologiques, tissus « digérés »
  - molécules membranaires, intracellulaires, ADN, ARN...
  - en immunologie:
    - immunophénotypage des lymphocytes sanguins et de leurs sous-populations (marqueurs d'activation, différenciation..)
    - mais aussi fonctions lymphocytaires
      - facteurs de transcription (détection, phosphorylations...)
      - production de cytokines (cytokines intra)
      - prolifération cellulaire (CFSE, cycle cellulaire..)
      - activité NK (test de dégranulation CD107a)...
      - flux calcique, PH intracyto, potentiel membranaire..
- Et autres: activation des basophiles, apoptose.....

# SCID

## DEFICITS IMMUNITAIRES COMBINES SEVERES

1/ 50.000 à 1/ 100.000 naissances

Le diagnostic précoce des SCID est CAPITAL

- irradier tous les produits sanguins avant transfusion
- pas de vaccins vivants

GREFFE DE MOËLLE



## Le diagnostic précoce des SCID

### Mise au point biologique

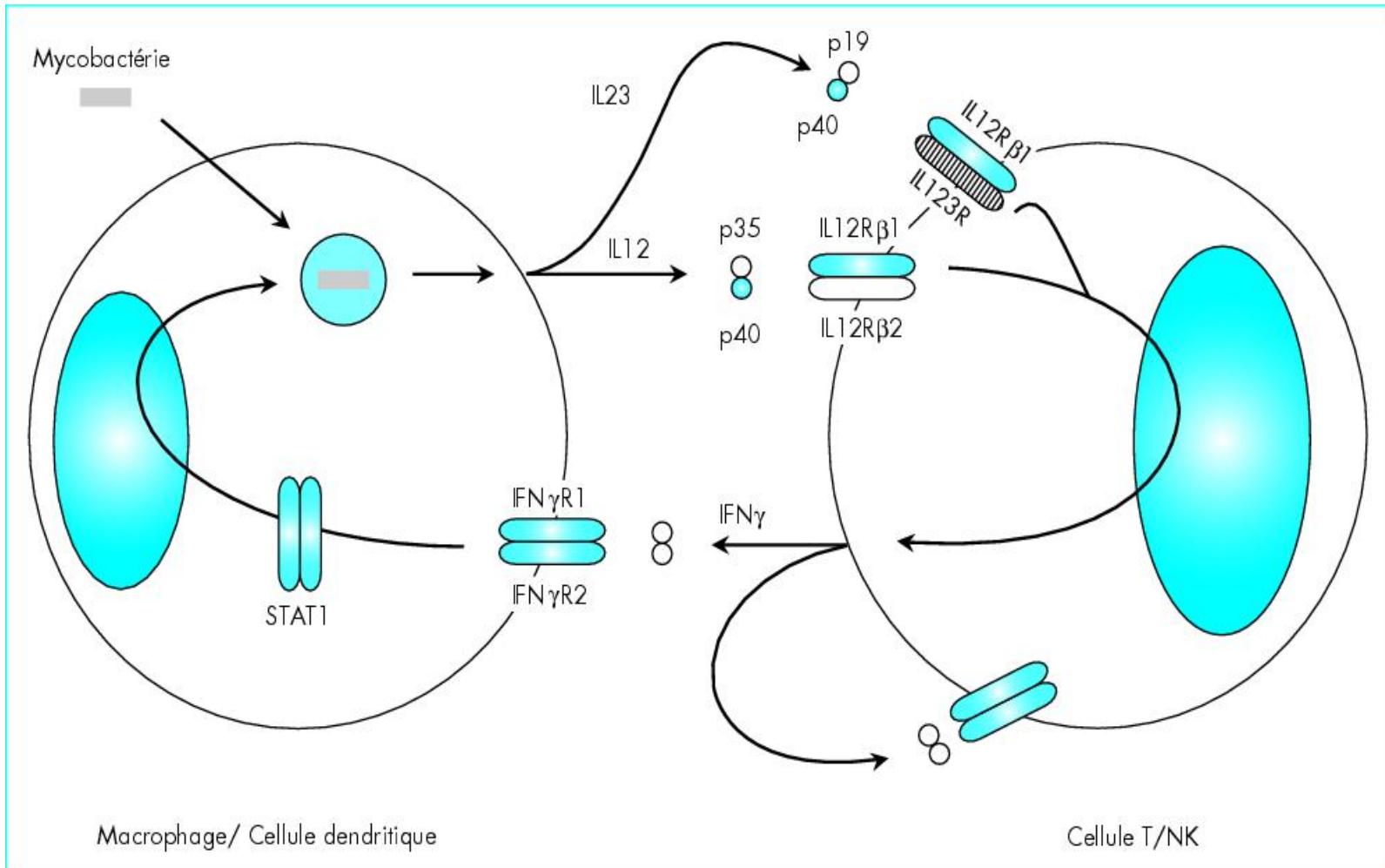
- **lymphopénie** ( $< 1.000$  lympho /  $\text{mm}^3$ )
- phénotypage des lymphocytes T et B (T-B+, T-B-)
- tests de transformation lymphoblastique aux mitogènes
- dosage de l'adénosine déaminase
- Phénotypage spécifique (IL-7R $\alpha$ , common  $\gamma$  chain R IL-2/4/7/9/15/21)

## Suspicion de SCID en bas âge

- **examen hématologique - formule:** lymphopénie
- analyse des **populations lymphocytaires**  
CD3 - CD4 - CD8 effondrement des CD3  
CD19
- **évaluation fonctionnelle de la fonction lymphocytaire:**  
**test de transformation lymphoblastique:**
  - mitogènes
  - antigènes (si > 6 mois)

# Déficits héréditaires de l'axe **IL-12 / IL-23 / IFN- $\gamma$** et

Susceptibilité aux infections invasives par les pathogènes intra-cellulaires :  
**Les mycobactéries**  
**Les Salmonella**



**Déficits héréditaires de l'axe IL-12 / IL-23 / IFN- $\gamma$**   
**et**  
**Susceptibilité aux infections invasives par les pathogènes intra-cellulaires :**  
**Les mycobactéries**  
**Les Salmonella**

Déficit de la chaîne  $\alpha$  du récepteur IFN- $\gamma$

- Susceptibilité sélective aux mycobactéries faiblement pathogènes:
  - qq mois: BCG
  - 1-3 ans: mycobacteries  $\neq$  *Mycobacterium complex*

Déficit d'IL-12

Déficit du récepteur à l'IL-12

- Infections par des mycobactéries faiblement pathogènes
- ET *Salmonella* non typhi: infections sévères et extra-intestinales

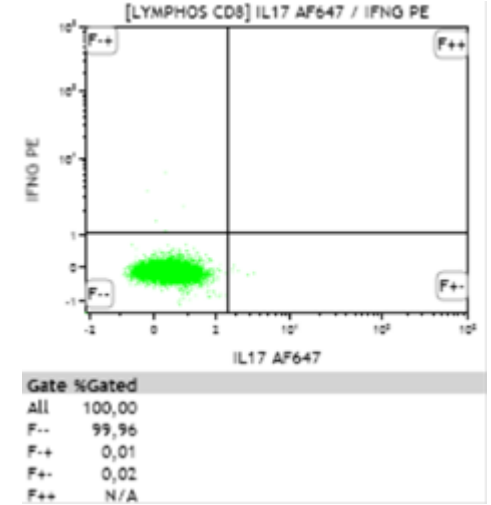
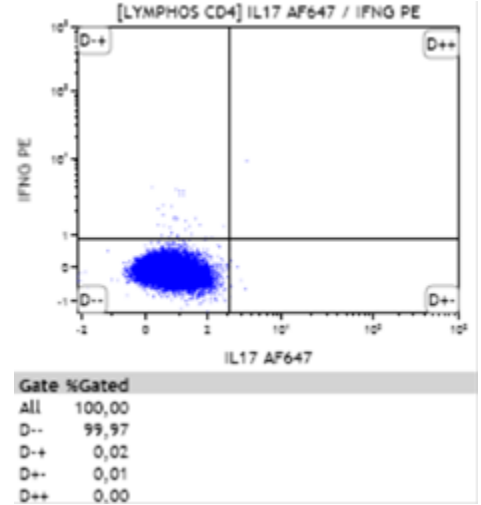
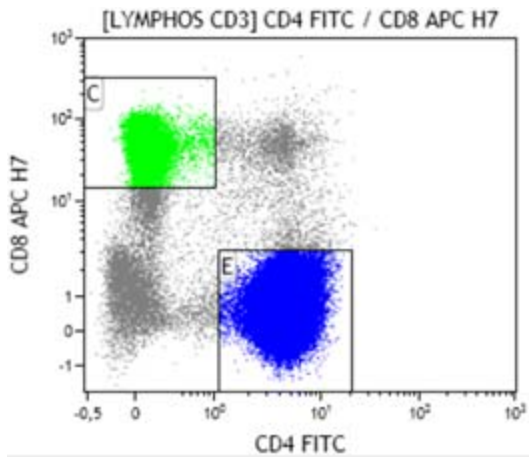
	Salmonella	mycobactéries
Déficit IL-12/ IL-23	44 %	77 %
Déficit IFN-g	7 %	94 %

# Exploration cellulaire

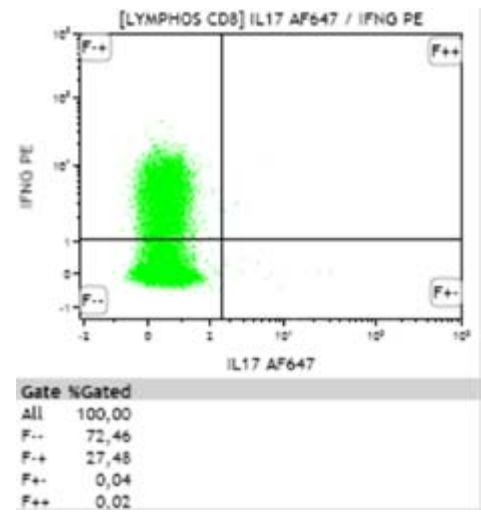
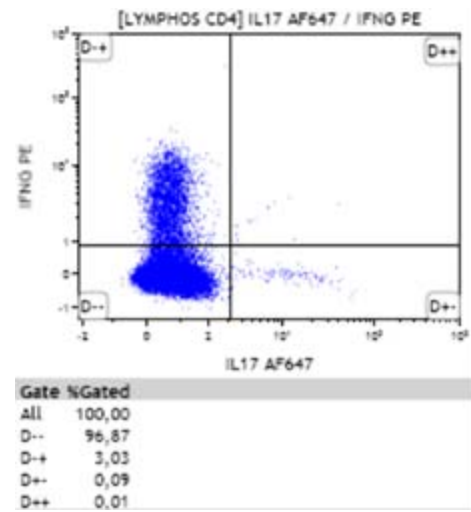
- **L'expression de ces récepteurs à la surface des lymphocytes peut être recherchée par cytométrie de flux:**
  - récepteur IFN-g
  - récepteur IL-12
- **En cas de déficit, des tests fonctionnels complémentaires sont réalisés**

# Lymphocytes isolés patient suspect **déficit Th17**

-pas de stimulation



-stimulation PMA+A23187



# Conclusions

Un **diagnostic et un traitement précoces** des immunodéficiences primaires sauve des vies, diminue la morbidité et améliore la qualité de vie des patients

Dépend notamment d'une bonne collaboration clinicien-biologiste pour

- Orienter la mise au point
- Nature des prélèvements
- Jours de prélèvements

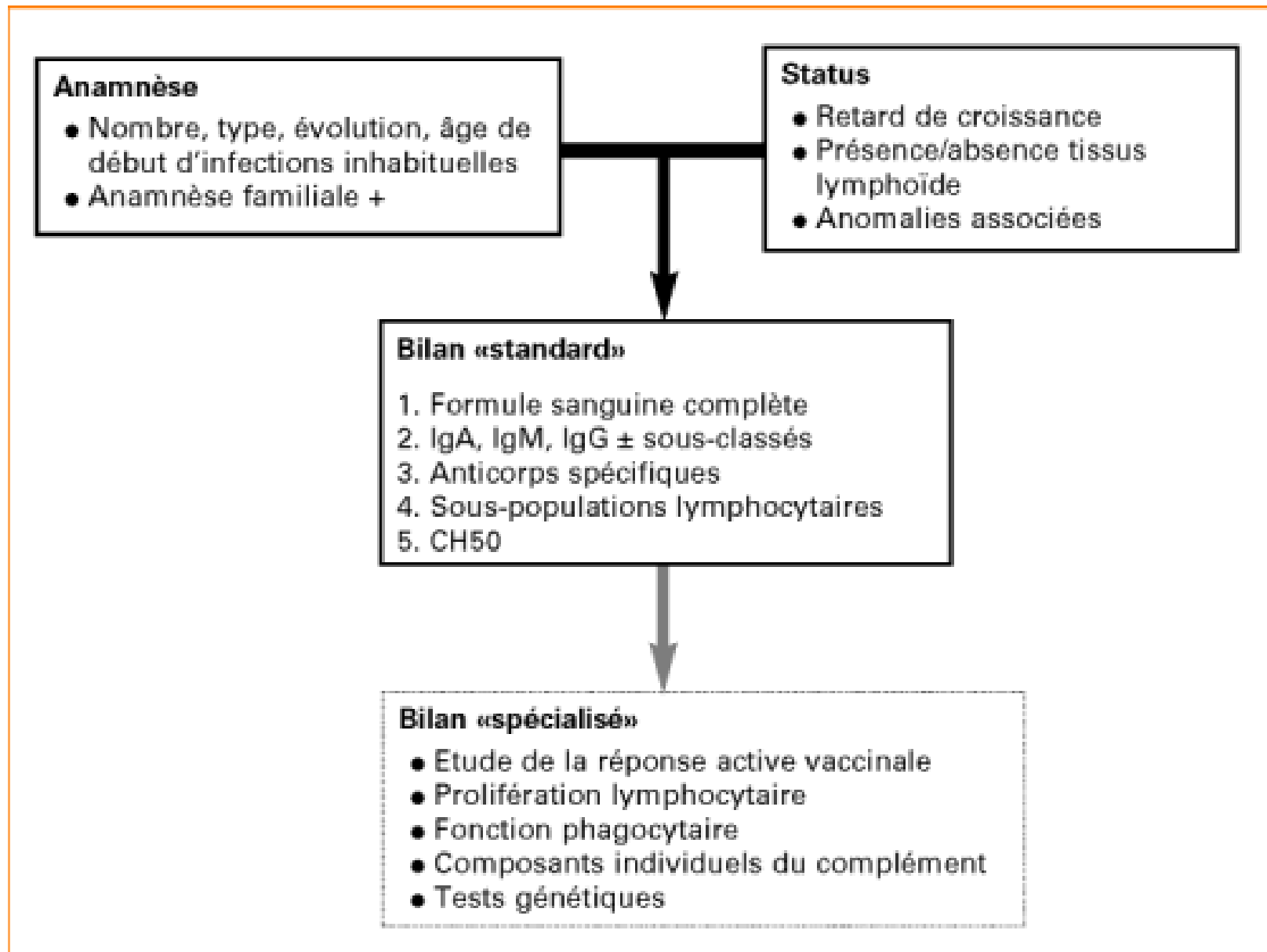


Fig. 2. Evaluation en cas de suspicion de déficit immunitaire primaire.



# 10 Warning Signs of Primary Immunodeficiency

Primary Immunodeficiency (PI) causes children and adults to have infections that come back frequently or are unusually hard to cure. 1:500 persons are affected by one of the known Primary Immunodeficiencies. **If you or someone you know is affected by two or more of the following Warning Signs, speak to a physician about the possible presence of an underlying Primary Immunodeficiency.**

- 1** Four or more new ear infections within 1 year.
- 2** Two or more serious sinus infections within 1 year.
- 3** Two or more months on antibiotics with little effect.
- 4** Two or more pneumonias within 1 year.
- 5** Failure of an infant to gain weight or grow normally.
- 6** Recurrent, deep skin or organ abscesses.
- 7** Persistent thrush in mouth or fungal infection on skin.
- 8** Need for intravenous antibiotics to clear infections.
- 9** Two or more deep-seated infections including septicemia.
- 10** A family history of PI.



# Analyses réalisées au laboratoire d'Immunobiologie de l'Hôpital Erasme:

## Innate Immunity: Complement

	ANALYSIS	<i>internal use</i>	INAMI/RIZIV code or paid by the patient	Blood sample
○	Classical pathway (CH 50)	<i>ICH50</i>	556150	5 ml dry tube
○	Alternative pathway (AP 50)	<i>IVA</i>	15 €	
○	Factor H concentration	<i>IBFHC</i>	30 €	
○	Factor H function	<i>IBFHA</i>	15 €	
○	Factor I concentration	<i>IBFIC</i>	30 €	
○	Mannose binding lectin (MBL)	<i>IBMBP</i>	16 €	
○	C1q	<i>IC1Q</i>	15 €	5 ml EDTA whole blood
○	C2	<i>IC2</i>	556194 (*)	
○	C3	<i>IC3</i>	541133	
○	C3d	<i>IC3D</i>	541170	
○	C4	<i>IC4</i>	541155	
○	C5	<i>IC5</i>	30 €	
○	C6	<i>IC6</i>	30 €	
○	C7	<i>IC7</i>	30 €	
○	C8	<i>IC8</i>	30 €	
○	C9	<i>IC9</i>	30 €	
○	Factor B	<i>IFB</i>	30 €	
○	C1 esterase inhibitor, concentration	<i>IC1ESQ</i>	16 €	
○	C1 esterase inhibitor, function	<i>IC1ESA</i>	556172	

(\*) only if CH50 is lower than 20 %, otherwise 30 €  
 ⇒ **Samples have to be delivered within 4 hours after the blood uptake, OR sent frozen in three aliquots of serum and/or plasma, on dry ice.**

## INNATE IMMUNITY : LYMPHOCYTE AND PMN SURFACE EXPRESSION OF ADHESION MOLECULES

Samples have to be delivered at room temperature within 24 hours after the blood uptake

○	CD11a expression †	<i>HSIC</i>	555730/556474	3-5 ml EDTA whole blood
	CD11b expression †	<i>HSIC</i>	555730/556474	
	CD18 expression †	<i>HSIC</i>	555730/556474	

## INNATE IMMUNITY: NK CELLS

Samples have to be delivered within 6 hours after the blood uptake, at room temperature, before 2 pm

○	Phenotype CD16, CD56, TCR Va24-Ja18, CD94*†	<i>HSIC</i>	555730/556474	3-5 ml EDTA whole blood
	Intracellular perforin expression †	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	NK cell activity : CD107a expression by NK†	<i>HSIC</i>	555730/556474	5-10 ml Na Heparin
	CD107a expression by CD8†	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	Soluble CD25 (hemophagocytic syndrome)	<i>HSIC</i>	15 €	5 ml dry tube

† These specific phenotypes will always be performed with a classical T/B phenotype (INAMI/RIZIV code 555693) to allow correct interpretation of the results

## INNATE IMMUNITY : IL 12/IL23- IFN gamma axis

(by appointment only : L. Schandené 02/555 37 37 )

Samples have to be delivered within 6 hours after the blood uptake, at room temperature, before 2 pm and not on Friday.

○	IL 12/IL23- IFN gamma axis † (phenotype)	<i>HSIC</i>	555730/556474	3-5 ml EDTA whole blood
○	IL 12/IL23- IFN gamma axis function † (IFN-g production)		20 €	20 ml Na Heparin

## T-CELL FUNCTION: PHENOTYPE : 3-5 ml EDTA at room T°

○	Acquired immunodeficiency	<i>HSIA</i>	555730/556474	3-5 ml EDTA whole blood
○	Congenital immunodeficiency	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	HES hypereosinophilic syndrome †	<i>HSIEO</i>	555730/556474	
○	Treg phenotype	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	Treg phenotype+Foxp3 expression	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	TCR diversity †	<i>HSIC</i>	556474 x12 OR 150 € **	

\*\* Only if asked without any other specific analysis. Otherwise 150 € will be factured

† These specific phenotypes will always be performed with a classical T/B phenotype (INAMI/RIZIV code 555693) to allow correct interpretation of the results.

**NB: for functional assays: ONLY heparin Na (not Li, citrate, beads.....)**

## T CELL FUNCTION: LYMPHOCYTE PROLIFERATION

Samples have to be delivered within 24 hours after the blood uptake at room temperature

○	In response to mitogens ( PHA, PWM )	<i>IMIT</i>	555774/555796	5-10 ml Na Heparin + 5 ml dry tube
○	In response to antigens (Tetanos, candidin)	<i>IAG</i>	555774/555796	
○	other: <b>by appointment</b> (L Schandené 02 555 37 37)	<i>IMIT</i>	555774/555796	

Samples have to be delivered within 6 hours after the blood uptake, at room temperature, before 2 pm and not on Friday.

## T CELL FUNCTION :

**BY APPOINTMENT 02/555 3737 L. Schandené**

○	Th1, Th2, Th17 profile by flow cytometry †		on request	10-20 ml Na Heparin
○	Th1, Th2, TH17 profile by ELISA			
○	CD40 Ligand expression (see CD40) †	<i>HSIC</i>	555730/556474	
	ICOS expression †	<i>HSIC</i>	555730/556474	

## APOPTOSIS

Samples have to be delivered within 24 hours after the blood uptake at room temperature

■T-CELL FUNCTION: PHENOTYPE : 3-5 ml EDTA at room T°

Samples have to be delivered within 24 hours after the blood uptake at room temperature

○	Acquired immunodeficiency	<i>HSIA</i>	555730/556474	
○	Congenital immunodeficiency	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	HES hypereosinophilic syndrome †	<i>HSIEO</i>	555730/556474	3-5 ml EDTA whole blood
○	Treg phenotype	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	Treg phenotype+Foxp3 expression	<i>HSIC</i>	555730/556474	
○	TCR diversity †	<i>HSIC</i>	556474 x12 OR 150 € **	

\*\* Only if asked without any other specific analysis. Otherwise 150 € will be factured

† These specific phenotypes will always be performed with a classical T/B phenotype (INAMI/RIZIV code 555693) to allow correct interpretation of the results.

**NB: for functional assays: ONLY heparin Na (not Li, citrate, beads...)**

■T CELL FUNCTION: LYMPHOCYTE PROLIFERATION

## T CELL FUNCTION: LYMPHOCYTE PROLIFERATION

Samples have to be delivered within 24 hours after the blood uptake at room temperature

○	In response to mitogens ( PHA, PWM )	<i>IMIT</i>	555774/555796	5-10 ml Na Heparin + 5 ml dry tube
○	In response to antigens (Tetanos, candidin)	<i>IAG</i>	555774/555796	
○	other: <b>by appointment</b> (L Schandené 02 555 37 37)	<i>IMIT</i>	555774/555796	

## T CELL FUNCTION : BY APPOINTMENT 02/555 3737 L. Schandené

Samples have to be delivered within 6 hours after the blood uptake, at room temperature, before 2 pm and not on Friday.

○	Th1, Th2, Th17 profile by flow cytometry †		on request	10-20 ml Na Heparin
○	Th1, Th2, TH17 profile by ELISA			
○	CD40 Ligand expression (see CD40) †	<i>HSIC</i>	555730/556474	
	ICOS expression †	<i>HSIC</i>	555730/556474	

† These specific phenotypes will always be performed with a classical T/B phenotype (INAMI/RIZIV code 555693) to allow correct interpretation of the results.

**NB: for functional assays: ONLY heparin Na (not Li, citrate, beads....)**



## APOPTOSIS

Samples have to be delivered within 24 hours after the blood uptake at room temperature

○	ALPS: phenotype	<i>HSIC</i>	555730/5 56474	3 ml EDTA
○	FAS mediated apoptosis (see ALPS phenotype)		20€	3 ml EDTA +10 ml Na Heparin
○	IL-10 and sFasL		30€	5 ml dry tube

## B CELL FUNCTION: PHENOTYPE – EUROclass

Samples have to be delivered within 24 hours after the blood uptake at room temperature

○	CD40† (see CD40L)	<i>HSIC</i>	555730/556747	3 ml EDTA
○	CD81†	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	BAFF-R†	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	TACI†	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Btk (under investigation) †	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○				
○	<b>Subsets of CD19<sup>+</sup> B cells †</b>	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Surface Immunoglobulins IgM, D	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Naïve and memory B cells	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Marginal zone B cells	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Switched memory B cells	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Activated CD21 <sup>low</sup> CD38 <sup>low</sup> B cells	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Transitional B cells	<i>HSIC</i>	555730/556747	
○	Plasmablasts	<i>HSIC</i>	555730/556747	

† These specific phenotypes will always be performed with a classical T/B phenotype (INAMI/RIZIV code 555693) to allow correct interpretation of the results.

## B CELL FUNCTION : TOTAL IMMUNOGLOBULINS:

○	<b>IgG</b>	<i>CIGG</i>	541214	2 to 5 ml dry tube
○	<b>IgG1</b>	<i>IGG1</i>	27 €	
○	<b>IgG2</b>	<i>IGG2</i>	541273	
○	<b>IgG3</b>	<i>IGG3</i>	541295	
○	<b>IgG4 between 2 and 16 years old</b>	<i>IGG4</i>	541332	
○	<b>IgG4 &lt; 2 years old and &gt; 16 years old</b>	<i>IGG4</i>	27 €	
○	<b>IgM</b>	<i>CIGM</i>	541251	
○	<b>IgA</b>	<i>CIGA</i>	541236	
○	<b>IgE</b>	<i>DIGE</i>	438093	
○	<b>IgD</b>	<i>IGD</i>	13 €	

## B CELL FUNCTION: SPECIFIC ANTIBODIES

○	anti Tetanos anatoxin IgG	<i>ITET</i>	6,00 €	1 ml dry tube
○	anti Staph enterotoxin A/B IgE	<i>IRAM80/81</i>	556275	
○	anti IgA	<i>IAIGA</i>	4,00 €	
○	isohemagglutinin titration	<i>TAHE</i>	555170	2 ml EDTA

### Pneumococcal Antibodies :

○	<b>No vaccination</b> : Total : 23V ❖	<i>IPNEUSERX</i>	18,66 €	2 ml dry tube
	specific serotypes: 14,19, 23F,1,7F❖		37,32 €	
○	after vaccination <b>Pneumo 23</b> Total : 23V ❖	<i>IPNEUSERX</i>	556614	2 ml dry tube
	specific serotypes: 14,19,23F,1,7F ❖		556614 x 2	

in case of low total response, the specific serotypes will automatically be done

○	after vaccination <b>Prevenar</b> specific serotypes: 14, 19, 23F, 1, 7F	<i>IPNEUSERX</i>	556614 x 3	2 ml dry tube
---	---	------------------	---------------	---------------

ADA activity (CADA, 541973) / PNP activity (CPNP, 541973):

2 ml EDTA **ON ICE WITHIN 12h** ( please contact the lab before sending:

B. Gulbis 02/555 38 76) –

N.B. Erythrocyte hexokinase activity is always measured as an internal control of the red blood cell population and also to appreciate the influence of the transit time of the sample between sampling and arrival in our laboratory.