

CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Lymfocyten Proliferatie Test (Beryllium)

Author: apr. S. Pauwels
Supervisor: Prof. dr. X. Bossuyt
Search/methodology verified by: dr. P. Vermeersch
Date: 6-1-2009

CLINICAL BOTTOM LINE

De LTT voor beryllium (BeLPT) op bloed of BAL-vocht, gebruik makend van [3H] thymidine incorporatie, blijft ondanks zijn gebreken nog steeds de standaard methode voor het aantonen van beryllium sensitisatie. Bij de differentieel diagnose van klinisch duidelijke granulomateuze longziekten heeft de test zeker zijn nut (sarcoidose-longberylliose). Voor het diagnosticeren van subklinische chronische beryllium ziekte (CBD) en BeS (beryllium sensitisatie) bij screening van een risicopopulatie zijn de testkarakteristieken niet te berekenen door het ontbreken van een gouden standaard methode voor BeS en een test afhankelijke definitie van CBD. Studies wijzen echter op een grote inter- en intra-laboratoriumvariabiliteit en de aanwezigheid van vals positieven en vals negatieven. Ook de prevalentie van CBD en BeS is niet geweten. Eveneens onzeker zijn de risico's op progressie van subklinische CBD naar klinische CBD en van BeS naar subklinische CBD. Ook over de impact van therapie (corticosteroiden) en het mijden van beryllium op het verloop van de ziekte zijn geen goede rapporten. Ondanks deze grote hoeveelheid onzekerheden zijn recent een aantal standaardisaties wat methode en interpretatie van de BeLPT met [3H] thymidine betreft gebeurt door de DOE (Departement of Energy). Het protocol gebruikt in UZ Leuven verschilt op een aantal punten (opzet en interpretatiemethode) met het gestandaardiseerd DOE-protocol.

Een aantal niet-radioactieve alternatieve methoden zijn beschreven. Sommige zijn expliciet voor beryllium uitgewerkt (gebruik makende van flow cytometrie (anti-BrdU/CFSE). Deze methoden blijven voorlopig in een experimenteel stadium.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het basisprincipe van de LPT is de transformatie (cfr. oudere naam: lymfocyten transformatie test (LTT)) van gesensitiseerde lymfocyten ("memory cells") naar het blastenstadium en de daaropvolgende proliferatie als respons op hernieuwd contact met het antigeen. Deze transformatie kan op verschillende manieren worden gemeten (metabole/biochemische veranderingen, RNA/DNA synthese). De LPT die de DNA-replicatie meet wordt echter het meest gebruikt en werd voorgesteld door de International Union of Immunological Societies (IUIS) [1]. In UZ Leuven wordt DNA-replicatie gemeten door middel van inbouw van radio-actief gelabeld [3H] thymidine in de prolifererende lymfocyten.

De interpretatie gebeurt dan op basis van een Stimulatie Index (SI) = (geïncorporeerde radio-activiteit in cultuur met antigeen)/(geïncorporeerde radio-activiteit in cultuur zonder antigeen (spontane proliferatie)).

[Attachment 1: procedure Leuven] Heden ten dage wordt deze methode onder andere gebruikt om

de lymfocytenwerking te evalueren (vb. in het kader van primaire immuundeficiënties), specifieke sensitisatie van patiënten tegenover exogene antigenen (infectieuze agentia, allergenen) of auto-antigenen (in het kader van auto-immuunziekten) op te sporen [2,7].

Gezien vele mensen, hetzij beroepsmatig, hetzij in de omgeving, in contact komen met allerlei metalen is de diagnose van een metaalallergie geen triviale aangelegenheid. De in vitro Lymfocyten proliferatie test (LPT) heeft als grote voordeel ten opzichte van huidtesten dat de proefpersonen niet in contact komen met het te testen allergeen en dus geen risico lopen op iatrogene metaalsensitisatie of exacerbatie van een eventueel reeds aanwezige allergie. Voor de meeste metalen (nikkel (Ni), goudzouten (Au), palladium (Pd), amalgamen (Hg)) is de LPT volgens meerdere rapporten van weinig nut om klinische reacties te voorspellen [2-5]. Voor de beryllium (Be) LPT (BeLPT) ligt dit enigszins anders. Deze test wordt in de ACCP (American College of Chest Physicians) guidelines genoemd als methode om chronische longberylliose (CBD) te differentiëren van pulmonale sarcoïdose [6]. Deze ziekten vertonen een fenoot-identisch beeld (klinisch, longbiopten, radiografisch); positieve BeLPT's op bloed of BAL-vochten, dewelke sensitisatie door Be aantonen, worden gebruikt in het licht van een bewezen (beroepsmatige) berylliumblootstelling om de differentieel diagnose te staven. Deze blootstelling kan makkelijk over het hoofd gezien worden door onderzoekers en patiënten daar Be heden ten dage in velerlei nieuwe industrieën (electronica, computer, telecom) opduikt naast de klassieke nucleaire en berylliumverwerkende sectoren en een minimale berylliumblootstelling, zelfs onder de industriële blootstellingslimieten (toelaatbare werkplaats lucht concentraties: $2\mu\text{g}/\text{m}^3$ (OSHA 2005), $0,2\mu\text{g}/\text{m}^3$ (DOE 1999), $0,02\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ACGIH 2005) [20-23]), kan leiden tot sensitisatie. Daarenboven is er geen verband tussen dosis/tijd van Be blootstelling en risico op ziekte/sensitisatie bewezen. Mogelijks spelen genetische risicofactoren, type van blootstelling en vorm van Be partikels een rol. Ook de tijdsspanne tussen blootstelling en ziekte kan sterk variëren. Minimale blootstelling kan jaren later voor ziekte zorgen. Over het nut van het stoppen van Be blootstelling om progressie tegen te gaan zijn er slechts weinig rapporten, toch wordt aangenomen dat dit nuttig is. Langdurig gebruik van corticosteroïden wordt aangeraden bij patiënten met ernstige klinische symptomen of fysiologische ontregelingen, meestal met initiële goede respons. Het nut ervan is echter gecontesteerd. Soms is er zuurstof therapie nodig en een aantal patiënten evolueren naar eind stadium longfibrose. Best wordt er met CBD rekening gehouden bij alle niet-kaashaardende granulomateuze longziekten. CBD zou een slechtere prognose hebben dan sarcoïdose, met een mortaliteit die kan oplopen tot 25%. Recente cijfers hierover zijn echter niet beschikbaar. [10-18]. Volgens sommige auteurs kan de BeLPT zelfs als screeningsmethode voor aan Be blootgestelde mensen dienen om alzo subklinische CBD of sensitisatie die kan leiden tot CBD te detecteren. Clinici in UZ Leuven geven te kennen dat ze inzake CBD een onderdiagnose verdenken. Daarom is het nuttig in deze CAT de in UZ Leuven gangbare definitie van een positieve BeLPT (en het bekomen ervan) te toetsen aan de in de literatuur beproefde definities (SI vanaf 5 wordt in UZ Leuven als (zwak) positief beschouwd). Ook eventuele alternatieve methodes voor de radio-actief gelabelde [^3H] thymidine LPT procedure worden onderzocht.

QUESTION(S)

1) *Wat is de performantie van de BeLPT?*

- 2) *Is het protocol gebruikt in UZ Leuven up to date?*
- 3) *Welke zijn de klinische toepassingen van de BeLPT (ook als screening voor "at risk" populaties?)?*
- 4) *Zijn er alternatieve methodes beschreven voor de BeLPT?*

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Metal AND Lymphocyte transformation"; "Metal AND Lymphocyte Proliferation"; "Metal AND sensitization"; "Metal AND Allergy"; "Nickel AND sensitization"; "Metal AND hypersensitivity AND diagnosis"; "Beryllium AND sensitization"; "Beryllium AND Diagnosis" "Beryllium"; "Beryllium AND Lymphocyte Transformation"; "Beryllium AND Lymphocyte Proliferation"; "Beryllium AND Flow cytometry"; "Beryllium AND Sarcoidosis"; "3HTdr AND non-radioactive"; "non-radioactive AND Lymphocyte"; "BrdU"*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters*
- 3) *UpToDate Online version*
- 4) *Google websearch*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*
 1. Report of the Committee on Clinical Immunology of the IUIS. Eur. J. Immunol. **6**, 231–234 (1976)
 6. Susan M. Tarlo. Cough: Occupational and Environmental Considerations: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest 2006;129; 186-196 (2006)
 20. American Conference of Governmental and Industrial Hygienists. 2005. Annual Reports of the Committees on TLVs and BEI for Year 2004. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental and Industrial Hygienists
 21. DOE (Department of Energy). 1999. Chronic beryllium disease prevention program: final rule. Fed Reg 64:68853–68914
 22. OSHA. 2005. Toxic and Hazardous Substances. 29CFR1910.1000, Table Z-1. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration.
- 2) *Reviews*
 2. R. Klein, M. Schwenk, R. Heinrich-Ramm and D.M. Templeton. Diagnostic Relevance of the Lymphocyte Transformation Test for Sensitization to Beryllium and other Metals. Pure Appl. Chem. Vol. 76, No. 6, pp. 1269-1281 (2004)
 12. Newman LS, Lloyd J, Daniloff E. The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease. Environ Health Perspect 1996; 104S: 937–943.
 14. BP Barna, D Culver, B Yen-Lieberman, R Dweik, MJ Thomassen. Clinical application of beryllium lymphocyte proliferation testing. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Nov;10(6):990-4
 29. Borak, Jonathan MD, DABT; Woolf, Steven H. MD, MPH; Fields, Cheryl A. MPH. Use of Beryllium Lymphocyte Proliferation Testing for Screening of Asymptomatic Individuals: An Evidence-Based Assessment Volume 48(9), September 2006, pp 937-947
- 3) *Original Articles*

4. K. Cederbrant, L. Gunnarsson, J. Marcusson. Mercury Intolerance and Lymphocyte Transformation Test with Nickel Sulfate, Palladium Chloride, Mercuric Chloride, and Gold Sodium Thiosulfate. *Environ. Res. Section A84*, 140-144 (2000)
5. K. Cederbrant. The Primary Lymphocyte Culture in the Diagnosis of Drug-and Metal-induced Allergy. Linköping University Medical Dissertations No. 635 (2000)
9. M. Mroz, K. Kreiss, D. Lezotte, P. Campbelle, L. Newman. Reexamination of the blood lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic beryllium disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 Jul;88(1):54-60.
10. J. Müller-Quernheim, K.I. Gaede, E. Fireman and G. Zissel. Diagnoses of chronic beryllium disease within cohorts of sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 2006; 27: 1190–1195
11. Paustenbach DJ, Madl AK, Greene JF. Identifying an appropriate occupational exposure limit (OEL) for beryllium: data gaps and current research initiatives. *Appl Occup Environ Hyg* 2001; 16: 527–538.
12. Infante PF, Newman LS. Beryllium exposure and chronic beryllium disease. *Lancet* 2004; 363: 415–416
13. Rossman MD, Kern JA, Elias JA, et al. Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium: a test for chronic beryllium disease. *Ann Intern Med* 1988;108: 687–693.
15. Newman LS, Kreiss K. Nonoccupational beryllium disease masquerading as sarcoidosis: identification by Blood lymphocyte proliferative response to beryllium. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1212–1214.
16. Fireman E, Haimsky E, Noiderfer M, Priel I, Lerman Y. Misdiagnosis of sarcoidosis in patients with chronic beryllium disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2003;20: 144–148.
17. Sprince NL, Kanarek DJ, Weber AL, Chamberlin RI, Kazemi H. Reversible respiratory disease in beryllium workers. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 1011–1017.
18. Sood A, Beckett WS, Cullen MR. Variable response to longterm corticosteroid therapy in chronic beryllium disease. *Chest* 2004; 126: 2000–2007
19. Stange AW, Furman FJ, Hilmas DE The beryllium lymphocyte proliferation test: Relevant issues in beryllium health surveillance. *Am J Ind Med.* 2004 Nov;46(5):453-62
23. Rosenman K, Hertzberg V, Rice C, Reilly MJ, Aronchick J, Parker JE, Regovich J, Rossman M Chronic beryllium disease and sensitization at a beryllium processing facility. *Environ Health Perspect.* 2005 Oct;113(10):1366-72.
24. Stange A, Furman J, Hilmas D. Rocky flats beryllium health surveillance. *Environ Health Perspect Vol 104 Supp 5* 1996: 981-986
25. Newman L, Mroz M, Maier L, Daniloff E, Balkissoon R. Efficacy of serial medical surveillance for chronic beryllium disease in a beryllium machining plant *J Occup Environ Med* 2001;43:231-237
26. Welch L, Ringen K, Bingham E, Dement J, Takaro T, McGowan W, Chen A, Quinn P. Screening for beryllium disease among construction trade workers at department of energy nuclear sites *Am J Ind Med* 46:207-218 (2004)
27. Bobka CA, Stewart LA, Engelken GJ, Golitz LE, Newman LS. Comparison of in vivo and in vitro measures of beryllium sensitization. *J Occup Environ Med.* 1997;39:540–547.
28. Newman LS, Mroz MM, Balkissoon R, Maier LA. Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:54–60.

30. Kreiss K, Wasserman S, Mroz MM, Newman LS. Beryllium disease screening in the ceramics industry: blood lymphocyte test performance and exposure-disease relations. *J Occup Med.* 1993;35:267–274.
 31. Deubner DC, Goodman M, Iannuzzi J. Variability, predictive value, and uses of the beryllium blood lymphocyte proliferation test (BLPT): preliminary analysis of the ongoing workforce survey. *Appl Occup Environ Hyg.* 2001;16:521–526.
 32. Yoshida T, Shima S, Nagaoka K, et al. A study on the beryllium lymphocyte transformation test and the beryllium levels in working environment. *Ind Health.* 1997;35:374–379.
 33. Schuler CR, Kent MS, Deubner D, et al. Process-related risk of beryllium sensitization and disease in a copper-beryllium alloy facility. *Am J Ind Med.* 2005;47:195–205.
 34. Frome EL, Newman LS, Cragle DL, Colyer SP, Wambach PF. Identification of an abnormal beryllium lymphocyte proliferation test. *Toxicology.* 2003;183:39–56.
 35. Frome EL, Smith MH, Littlefield LG, Neubert RL, Colyer SP. Statistical methods for the blood beryllium lymphocyte proliferation test. *Environ Health Perspect.* 1996 Oct;104 Suppl 5:957-68.
 36. Markham TN. Screening for chronic beryllium disease using beryllium specific lymphocyte proliferation testing. *Int Arch Occup Environ Health.* 1996;68:405–407.
 37. Henneberger PK, Cumro D, Deubner DD, Kent MS, McCawley M, Kreiss K. Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant. *Int Arch Occup Environ Health.* 2001;74:167–176.
- 4) Reference Works, Handbooks and Databases
7. M. Fletcher, R. Urban, D. Asthana, J. Walling, A. Friedlander, J.B. Page. Lymphocyte Proliferation in Immune Cell assays. *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Noel R. Rose (Editor), Everly Conway De MacArio (Editor), James D. Folds (Editor), H. Clifford Lane (Editor), Robert M. Nakamura (Editor)) Fifth Edition 1997
 8. Wambach in Department of Energy Specification (DOE-SPEC-1142-2001 April 2001): Beryllium Lymphocyte Proliferation Testing (BeLPT)
- 5) Posters, “grey literature”, presentations
3. Diagnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstestes in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheits-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 2002-45:745-749 (2002)

APPRAISAL

Pre-analytisch

Drie 10 mL buizen met veneus gehepariniseerd (groene dop, Na of Li-Heparine) **bloed** worden op kamertemperatuur opgestuurd en binnen de 24- 30 uren na afname verwerkt. Er dient voldoende isolerend materiaal gebruikt te worden om de temperatuur adequaat te controleren en extreme temperatuursvariaties tegen te gaan om de leefbaarheid van de cellen gedurende transport te waarborgen. [8,9]

Voor de **BAL** BeLPT wordt een zout lavage, verkregen tijdens bronchoscopie, gebruikt. Aangeraden wordt de stalen te nemen in de wiggepositie in de lingula of de rechter middenlob. De lavage dient voor het biopt te gebeuren om contaminatie met bloed te voorkomen. Minstens 480 mL zout water dient in twee keer 240 mL te worden ingebracht. Zachte aspiratie dient te gebeuren na instillatie van elk aliquot. De opbrengst varieert van 50-70%. Onmiddellijk transport naar het laboratorium is noodzakelijk. De temperatuur dient tussen de 15 en 25°C gehouden te worden. Stalen die niet de dag zelf kunnen getest worden moeten in RPMI-1640 medium met antibiotica gesuspendeerd worden en binnen de 36 u verwerkt worden. De test vereist een minimum van 2.5×10^6 cellen en 20×10^6 wordt aangeraden. [8]

Tot op vandaag is er geen goed opgezette studie die BAL en bloed BeLPT vergelijkt. Een kleine, oude studie met gezonde Be werkers, sarcoïdose patiënten en biopsie bevestigde CBD patiënten toonde hogere responsen in BAL dan in bloed en eveneens een hogere sensitiviteit en specificiteit (SI positief vanaf 5, 100%, 100%) [13]. De gebruikelijke praktijk is het gebruik van de BAL BeLPT, na een positieve bloedtest of klinische CBD verdenking, ter confirmatie samen met biopt [14]. Deze strategie is begrijpelijk gezien het invasievere karakter van de test.

Diagnostische Performantie van BeLPT

De **sensitiviteit en specificiteit** van de BeLPT strictu sensu zijn in geen enkele studie berekend en zullen ook in de toekomst moeilijk te berekenen zijn. Vooreerst wordt de noemer (het totaal aantal mensen in de gescreende populatie met en zonder ziekte) niet bepaald in de meeste gerapporteerde **CBD** studies. Dit zou inhouden dat de gehele populatie dient gescreend te worden met een definitieve “referentie test” voor CBD, dewelke (naar huidige inzichten) zeker bronchoscopie zou inhouden. Begrijpelijk werd enkel biopsie, bronchoscopie en BAL aangeboden aan mensen met een abnormale bloed BeLPT bij de meeste screening studies. Bronchoscopie wordt soms geweigerd door patiënten. Daarenboven is er geen consensus referentie standaard om CBD te diagnosticeren. De diagnose wordt meestal gemaakt op basis van een blootstellingsgeschiedenis (dewelke niet altijd even makkelijk na te gaan is (zie hoger)) en een positieve bloed/BAL BeLPT samen met overeenkomstige longbiopsie bevindingen. **Voor klinisch duidelijke gevallen maakt de positieve bloed of BAL BeLPT het verschil tussen sarcoïdose en klinische CBD.** Opgemerkt dient dat specifieke criteria wisselden in verschillende studies (Tabel 1). In tabel 1 staan 10 verschillende criteria samengevat die in 19 studies werden gebruikt. In de belangrijkste studie aangaande diagnostische performantie, dewelke meer dan 12,000 werkers van het DOE includeerde, werd CBD gediagnosticeerd op basis van 4 verschillende definities [19]. Meer verwarring wordt veroorzaakt door de definitie van “waarschijnlijke CBD” en “mogelijks CBD”, gebaseerd op andere klinische data en anders gedefinieerd door de betrokken

research groepen onderling. [23-25]. Geen enkele studie heeft tot op vandaag de opbrengst van deze criteria vergeleken.

Diagnostische criteria	Referentie
Abnormale BeLPT in bloed <i>of</i> BAL + granuloma' s op longbiopt	Barna et al [14] Kreis et al [30] Markham [36] Rosenman et al [23]
Abnormale BeLPT in bloed <i>of</i> BAL + granuloma' s <i>of</i> mononucleaire celinfiltraten op longbiopt	Bobka et al [27] Newman et al [25]
Abnormale BeLPT in bloed <i>of</i> BAL + granuloma' s <i>of</i> "andere pathologische abnormaliteiten consistent met de ziekte"	Schuler et al [33]
Abnormale BeLPT in bloed <i>en</i> BAL + granuloma' s op longbiopt	Stange et al [34]
Abnormale BeLPT in bloed <i>of</i> BAL + granuloma' s <i>of</i> mononucleaire celinfiltraten op longbiopt	Stange et al [19]
Abnormale BeLPT in BAL + granuloma' s <i>of</i> mononucleaire celinfiltraten op longbiopt	Mroz et al [9]
Abnormale BeLPT in bloed + granuloma' s <i>of</i> mononucleaire celinfiltraten op longbiopt <i>of</i> CT bewijs van granuloma' s	Stange et al [19]
"Borderline <i>of</i> abnormale" BeLPT op BAL <i>en/of</i> granuloma' s op longbiopt	Henneberger et al [37]
Abnormale BeLPT in bloed <i>of</i> BAL + "sterk bewijs van pulmonale ziekte"	Stange et al [19]
Abnormale BeLPT in bloed <i>en</i> BAL	Stange et al [19]

Tabel 1: Verschillende diagnostische criteria voor CBD doorheen studies

De **sensitiviteit en specificiteit** van de BeLPT voor BeS (**Beryllium sensitisatie**) is ook onzeker, hoewel deze methode overall wordt toegepast als zijnde de enige praktische manier om beryllium sensitisatie te bepalen (dus geen referentiemethode). Hieruit volgt dat kwasi al de studies slechts een "level of evidence" van 4 hebben volgens het Oxford Centre for Evidence-based Medicine. Uit een aantal test-hertest protocols kunnen echter een aantal bedenkingen worden geformuleerd. In een studie aangaande 3842 Be werklui, werd slechts 62% van de initiële abnormale tests bevestigd bij hertest [26]. Een andere studie aangaande 4268 werklui toonde aan dat test-hertest overeenkomst omgekeerd evenredig was met de waarde van de SI van de initiële positieve BeLPT (figuur 1). Voor een SI van 3.0-4.9 was 83,9% van de hertesten negatief. Dit duidt op een aanzienlijk aantal **vals positieven** [24]. Hierbij moet wel gezegd dat de meeste protocols 2 positieve stalen (repeated positive) vereisen eer men van sensitisatie spreekt. Hier is er echter weer variatie in interpretatie (de eerstvolgende of een

volgende?). Grote studies hieromtrent zijn nog niet opgezet daar de bloed/BAL BeLPT als standaard methode voor sensitiviteit wordt gebruikt.

Een recente studie, waarin een vergelijk met de patch test methode wordt gebruikt bij 11 biopsie (en BAL) bewezen CBD patiënten met negatieve/borderline bloed BeLPT, toont aan dat de patch test deze personen wel eruit kan lichten [27]. In deze studie wordt de definitie van CBD opengetrokken tot een blootstellingshistoriek + biopsie typische letsels + positieve bloed/BAL BeLPT of patch test. Andere studies tonen aan dat de BeLPT kan variëren in de tijd, zelfs in patiënten met biopsie bewezen CBD [25,28]. Deze studies geven aan dat er een aantal **vals negatieve** resultaten niet uit te sluiten is. Vals positieve en negatieve resultaten zijn inherent aan deze methode volgens sommige publicaties [2].

TABLE 2

Results of Confirmational Retesting for Positive Beryllium Lymphocyte Proliferation Tests (BeLPTs) in 4268 Workers*

Positive BeLPT: Range of Stimulation Index Values	No. Positive: Initial BeLPT	No. Negative: First Retest BeLPT	Percent Reversion
1.6–2.9	61	54	88.5
3.0–4.9	62	52	83.9
5.0–9.9	40	21	52.5
10.0–19.9	26	9	34.6
20.0–49.9	17	5	29.4
>50	16	0	0.0

*Adapted from Stange AW, Furman FJ, Hilmas DE. Rocky flats beryllium health surveillance. *Environ Health Perspect.* 1996;104(suppl 5):981–986.

Figuur 1: Resultaten van niet bevestigde initiële positieve tests uit:

Borak: J Occup Environ Med, Volume 48(9).September 2006.937-94

Ook methodologisch is er een en ander loos. Ondanks de publicatie van een aantal gestandaardiseerde methodes [9,21] blijft er inter-laboratorium variatie over de protocols. Zelfs binnen hetzelfde laboratorium werd het protocol meermaals aangepast [29]. Vooral het aantal dagen incubatie alvorens te oogsten, het gebruikte serum, medium, platte of ronde bodem wells, ... varieerden. In sommige studies werden verschillende laboratoria gebruikt elk met hun eigen protocol.

Ook over de interpretatie is er discussie. Sommige publicaties gebruiken de term 'abnormale BeLPT' voor SI-waarden die de gemiddelde piek-SI +/- 2SD van een niet-blootgestelde referentie populatie overschrijden [9,30]. Deze benadering leidde tot SI cut-off waarden van 1.9 tot 3.5 [29]. In 1995 werd door de Beryllium Industry Scientific Advisory Committee (BISAC) een consensus cut-off van ≥ 3.0 voor de SI geformuleerd [31]. In enkele studies werd dit criterium gehanteerd [29,31]. Sommige studies rapporteerden noch hun criteria, noch hun werkwijze [23]. Recent werd een alternatieve statistische methode gepubliceerd, die tot nog andere resultaten leidde. De UZ Leuven methode voor de berekening van SI verschilt op enkele punten (concentraties Be en berekening positieven) van de DOE specificaties [8] **[Attachment 2: voorstel nieuwe procedure (LAV methode voor SI berekening)]**. [34, 35] In het licht van differentieel diagnose bij granulomateuze longaandoeningen dient hier rekening mee gehouden te worden.

Deze methodologische verschillen maken het moeilijk studies te vergelijken. Ook meta-analyse wordt hierdoor quasi onmogelijk (opschalen van de meestal kleine hoeveelheid data in de studies (meestal 5-17 cases)).

Gelijkaardige problemen duiken op bij het beschrijven van de **PPV** (positive predictive value), dewelke notie van de prevalentie van CBD en BeS vraagt. Bij blootgestelde werklui wordt van 1 tot 16% positieve BeLPT' s gerapporteerd, van dewelke een fractie (meestal minder dan 50%) een subklinische CBD heeft en een veel kleinere fractie klinische CBD. In vele rapporten wordt er geen woord gerept over klinische dan wel subklinische ziekte. Waar het wel aan de orde komt, blijkt dat de mensen met CBD meestal geen klinische symptomen hebben [29, 25, 26]. Meestal gaat het zoals hierboven gesteld over een klein aantal patiënten gediagnosticeerd met CBD en dan nog eens volgens verschillende criteria/protocols. Voor BeS wordt ongeveer eenzelfde range gerapporteerd. Zo' n grote ranges maakt het onmogelijk een cijfer te plakken op de ware graad van prevalentie in Be blootgestelde arbeiders [29]. Nog meer onduidelijkheid is er over de prevalentie bij mensen die niet beroepsmatig blootgesteld zijn aan Be. Verschillende artikels beschrijven ongeveer 1% [29,32]. Dit is echter nooit systematisch bestudeerd. Hieruit volgt dat het niet verwonderlijk is dat **PPV voor CBD** van 11 tot 100% [26,30,31] worden gerapporteerd. Ook voor de al dan niet meerwaarde van een bevestigd positief resultaat zijn er meerdere opvattingen. Een recente studie toont een verschil van slecht 6% (39 vs 45%) voor een "single" abnormale test versus een "confirmed" abnormale test. Voor BeS zijn er geen rapporten over de PPV van de BeLPT. Dit weerspiegelt het gebrek aan een referentiemethode voor BeS.

Over de **intra- en interlaboratoriumvariabiliteit** (reproduceerbaarheid/repeteerbaarheid) valt ook weinig goed nieuws te brengen. Omdat vele studies de "split sample" procedure gebruiken (een staal verdeeld over 2 labo' s) zijn er vele interlaboratorium vergelijkingen mogelijk. In een studie met 627 mensen zou het sturen van stalen te analyse naar 1 van de 2 labo's slechts 46.5-48.8% van de BeS gevallen aan het licht hebben gebracht. In de studie met meer dan 12.000 DOE werknemers werd 1 staal telkens verdeeld over 2 (gekozen uit 4 verschillende) laboratoria. Interlaboratorium overeenkomst ("agreement") voor abnormale tests ging van 26.2 tot 61.8%. Een hogere waarde werd gerapporteerd voor de intra-laboratorium overeenkomst. Een vroegere studie, die 4268 arbeiders omvatte, rapporteerde een interlaboratorium overeenkomst van slechts 21 tot 38% voor abnormale testen. Een studie die de kappa statistiek gebruikte rapporteerde een overeenkomst van 0.2 (poor) tot 0.6 (moderate) voor de interlaboratorium overeenkomst en een kappa van 0.3 tot 0.6 voor de intralaboratorium overeenkomst van resultaten. In een recente NIOSH studie aangaande 153 arbeiders werd een interlaboratorium overeenkomst van kappa 0.2 (poor) gevonden. Het ene labo rapporteerde 8 stalen als abnormaal, waar het andere labo er 17 als abnormaal rapporteerde. Bovendien rapporteerde het tweede labo 5 keer meer "borderline" of "niet-interpretbaar". [29]

Buiten deze onvolkomenheden, zijn er in vele BeLPT studies nog andere methodologische hiaten. Een korte greep: onvolledige deelname van uitgekozen blootgestelde werknemers, slechte documentatie van de sampling schema's, geen data over de al dan niet geblindeerde beoordeling van de bronchoscopieën en biopsieën.

Conclusies

Uit bovenstaande uiteenzetting kan geconcludeerd worden dat het gebruik van de BeLPT zijn nut heeft in de differentieel diagnose van granulomateuze longziekten. Heden ten dage worden er echter niet zoveel gevallen van klinische CBD gezien. **Daar een positieve BeLPT een deel vormt van het diagnostische luik bij CBD, is de berekening van de performantiekarakteristieken kwasi ondoenbaar.** Het al dan niet aanwezig zijn van een positieve BeLPT maakt het onderscheid hier tussen sarcoidose en klinische CBD. CBD kan ook idiopatische longfibrose, hypersensitiviteitspneumonitis en

astma maskeren. Hier kan natuurlijk wel gewezen worden op de mogelijkheid van een initieel vals negatieve bloed/BAL-test en de noodzaak om eventueel op te volgen en te hertesten indien (historische) beryllium blootstelling gekend is.

Er wordt echter veel belang besteed aan de termen **BeS en (nog) subklinische CBD**. Hieromtrent valt te zeggen dat over de conversie van BeS naar subklinische CBD en van subklinische CBD naar klinische CBD weinig concrete getallen bestaan. Slechts een longitudinale studie met 55 cases is gerapporteerd over de progressie van BeS naar subklinische CBD (5.8 tot 8.1%/jaar). Dat subklinische CBD kan overgaan in klinische CBD is zeker. Hierover zijn echter weinig studies. Aangenomen wordt dat een groot deel van de mensen gediagnosticeerd met subklinische CBD of BeS hun leven lang zullen doorkomen zonder voelbare gezondheidslast te wijten aan CBD. Hoeveel mensen uiteindelijk behandeling zullen nodig hebben voor hun "ziekte" is ook niet geweten. Gebaseerd op recente klinische observaties en het beperkte bewijs lijkt het correct te stellen dat het klinisch verloop van CBD variabel is, dat patiënten met CBD klinisch jaren stabiel kunnen blijven en dat, ondanks de mogelijkheid tot progressie, de prognose van CBD slecht gekend is. Over de prognose van klinische CBD zijn enkel cijfers uit de beginperiode beschikbaar, toen de diagnose pas in een laat stadium gebeurde. Uit deze studies neemt men aan dat ongeveer 1/3 van de onbehandelde patiënten sterft. De relevantie van zulke historische data is echter in vraag te stellen. Het beneficieel effect van behandelen van subklinische CBD of BeS is controversieel. Corticosteroïden worden enkel aangeraden als 1^e lijntherapie bij klinisch duidelijke patiënten. Hieromtrent bestaat echter ook geen enkele gerandomiseerde control trial en er is geen standaard regime voor het behandelen van CBD patiënten. Goede klinische resultaten zijn historisch gerapporteerd met corticosteroïden, weerom valt de vraag over de representabiliteit van deze oude data. Het effect van corticosteroïden op het verloop van BeS en subklinische CBD is niet gekend. In een kleine studie werd geen verandering van BeLPT gezien door het gebruik van corticosteroïden. Ook over het mijden van berylliumblootstelling bij BeS en subklinische CBD is er onenigheid. Geen enkele goed opgezette studie bestaat over het veranderen van de clinical outcome via deze maatregel, doch wordt deze in enkele cases als nuttig beschreven en als etisch aanzien.

Buiten de slecht gekende prognose, nut van therapie komt nog eens de risico's aangaande de follow-up (BAL/bronchoscopieën/biopsies/nevenwerkingen eventuele therapie).

BeLPT dient met veel zorgvuldigheid geïnterpreteerd te worden, zeker in gevallen met weinig evidente klinische symptomen. De beperkingen van de test: vals negatieven mogelijk (serieel testen) en de strategie van "repeated" positieven (variabiliteit inter/intralaboratoria), al dan niet in een ander labo via "split sample" dienen in het achterhoofd worden gehouden, tesamen met de huidige onwetenschap over prognose/conversie en therapie.

Het opzet dat in UZ Leuven gebruikt wordt verschilt op een aantal punten van deze beschreven in de DOE specificaties [8] (tabel 2). Voor UZ Leuven werd een query uitgevoerd van de BeLPT 's vanaf 2005 tot heden. Indien de consensus cut-off van 3.0 zou worden gebruikt, dienen 3 patiënten alsnog positief te worden gescoord. De berekeningen via de LAV (Least Absolute Value) methode konden niet gemaakt worden wegens gebrek aan de nodige ruwe data. Een voorstel tot nieuwe procedure werd in **[Attachment 2]** samengevat.

Ondanks alles blijft in de gepubliceerde studies de BeLPT met [3H] Thymidine voorop staan. Deze methode is het meest beproefd en gestandaardiseerd. Enkele alternatieve methodes zijn beschreven, sommige zelfs specifiek voor beryllium. **[Attachment 3]**. Deze vinden echter nog weinig ingang in de meerderheid van de studies en blijven voorlopig voor een groot stuk experimenteel.

	DOE-SPEC-1142-2001	UZ Leuven
Afname	<ul style="list-style-type: none"> - 3 X 10 mL Li of NaHeparine - Bewaarbaar op KT gedurende 24 uur - Verwerpen van stalen meer dan 30 uur na afname 	- Enkel Li of NaHeparine, zonder verdere specificatie
Groei medium	- Gebruik van 10% AB+ serum	- 5% autoloog plasma
Range antigeen	<ul style="list-style-type: none"> - 1 μM, 10 μM, 100 μM Be SO₄ - 2 X 4 cupjes van 200 μL voor elke concentratie 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 nM tot 100 μM Be SO₄ - 1 X 4 cupjes van 200 μL voor elke concentratie
Cellen in cupje	- 2.5X10 ⁵ cellen/ cup	- +/- 1.8X10 ⁵ cellen/ cup
Proliferatietijd	- 2 keer oogsten tussen 4 ^{de} en 7 ^{de} dag	- 1 keer oogsten op 6 ^{de} /7 ^{de} dag
Positieve controle	-Phytohaemagglutinine/ Concanavalin A/ Candida albicans allergenisch extract of herhalingsantigeen	- Pokeweed mitogeen
Berekening SI	<ul style="list-style-type: none"> - Least absolute value methode - statistische cut-off (2 van de 6 dienen positief te zijn) - biologische cut-off op basis van een niet blootgestelde vrijwilligers (maximum SI test > maximum refentie populatie) 	<ul style="list-style-type: none"> - "eenvoudige" berekening SI - Cut-off van SI \geq 10 (5-10 zwak positief)
Interpretatie	<ul style="list-style-type: none"> -niet acceptabel (vragen voor herhaling) (achtergrond teller acceptabel, controle telling > 2 X achtergrond teller, interne variabiliteit (SD) van de \squareells, duidelijke respons op mitogeen, geen bewijs van extreme celdoding) - abnormaal (of grens): 2 herhalingen, waarvan liefst 1 in ander labo (enkel herhaalbare positieven) - normaal (CBD niet uit te sluiten) 	- positief vanaf 1 afwijkende SI

Tabel 2: Vergelijk protocol UZ-leuven/DOE-specificaties

COMMENTS**TO DO/ACTIONS**

- 1) Herzien protocol voor Beryllium LPT (zeker de cut-off en interpretatie), zo mogelijk aanpassen naar DOE specificaties (Voorstel aangepaste procedure in Attachment 2)
- 2) Bespreken noodzaak van referentiewaarden voor biologische positiviteit met clinici bespreken (Attachment 2)
- 3) Overwegen andere methode?

ATTACHMENTSAttachment I: Procedure UZ Leuven**LTT: Afzonderen lymfocyten (in steriele omstandigheden!)**

1. 1 of 2 bloedstalen 10 min. centrifugeren aan **500** g (zie bijlage 7)
 2. FALCON-tube 2070 vullen met 10 ml lymphoprep (1 tube per 10 ml bloed)
 3.
 - merk het volumepeil van het staal
 - breng (met een SARSTEDT TF pipet) plasma over in een FALCON-tube 2054
 - plasma 10 min. centrifugeren aan **500** g (zie bijlage 7)
 4.
 - vervang het plasma in het bloedstaal door eenzelfde volume HANK'S-mét-heparine
 - bloedstalen opmengen en overgieten in een FALCON-tube 2070
 - bloedstalen ½ verdunnen met HANK'S 1/10; goed opmengen
 5. pipetteer voorzichtig 15 tot 20 ml verdund bloedstaal over in elke tube met lymphoprep
 6. 30 min. centrifugeren aan **400** g (zie bijlage 7)
 7. supernatans plasma 1/20 verdunnen in RPMI-milieu (= autoloog plasma 5%)
- The diagram shows a vertical test tube with several distinct layers. At the very top is a thin layer labeled 'FAT'. Below it is a larger, clear layer labeled 'SERUM/MEDIA' with a circled '1' to its right. Underneath that is a thin, dark band labeled 'LIGHT DENSITY WHITE CELLS' with a circled '2' to its right. Below this band is a thick, dark, conical layer labeled 'FICOLL-HYPAQUE'. At the bottom of the tube are two layers: 'REMAINING WHITE CELLS' and 'RED CELLS'.
8.
 - met een SARSTEDT TF pipet de bovenste vloeistoflaag (1) wegpipetteren
 - het laagje mononucleairen (2) afzuigen en overbrengen in 2 (per 10 ml bloed) 15 ml conical Sarstedt tubes
 - tubes aanvullen met HANK'S 1/10
 9. 10 min. centrifugeren aan **400** g (zie bijlage 7); afgieten; aanvullen met HANK'S 1/10 (twee tubes samenvoegen tot één)
 10. 10 min. centrifugeren aan **300** g (zie bijlage 7); afgieten; aanvullen met HANK'S 1/10
 11. 10 min. centrifugeren aan **200** g (zie bijlage 7); afgieten; aanvullen met HANK'S 1/10
 12. culot oplossen in autoloog plasma 5 % (\pm 1 ml per 10 ml oorspronkelijk bloed) (eventueel overnacht in de frigo bewaren)
 13.
 - voorzichtig vortexen
 - 20 μ l toevoegen aan 180 μ l RPMI-milieu
 - microscopisch de lymfocyten in 25 grote vierkanten tellen in een Bürkerkamer (obj. 40x) (*lymfocyten die de grenzen van een groot vierkant raken mogen enkel meegeteld worden als ze zich aan de linkerkant of de bovenkant bevinden*)
 - het aantal getelde lymfocyten/10 is het aantal 10^6 lymfocyten per ml
 14. concentratie aanpassen, zodat de finale concentratie = 1×10^6 /ml
 15. lymfocyten vortexen en in elke (het aantal hangt af van wat er aangevraagd is) FALCON-tube 2054 900 μ l (of 1 ml voor PHA of Con A) toevoegen; eventueel overnacht in de frigo bewaren

LTT met metaalzouten (in steriele omstandigheden!) (analysenummer 6722)

1. **afzondering van de lymfocyten** (SOP-096 – Bijlage 1 – Werkvoorschrift: LTT: Afzonderen lymfocyten)
2. Maak een 10^{-2} M oplossing door MW van metaalzout in mg op te lossen in 100 ml demi-water type 1 (metaalvrij glas gebruiken!)
3. zeven seriële 1/10 verdunningen maken door telkens 100 μ l (verdund) metaalzout aan 900 μ l RPMI-milieu toe te voegen (*de hoogste finale concentratie van het metaalzout is dan 10^{-4} mol*); **voor de eerste verdunning werd de metaalzout-oplossing eerst gefiltreerd** (Acrodisc 0,2 μ m) De laagste 6 verdunningen (10^{-4} tot 10^{-9}) worden gebruikt.
4. - bij de afgezonderde lymfocyten voegen we in elke tube 100 μ l verdund metaalzout van een bepaalde concentratie (7 tubes per metaalzout)
- bij de twee controles voegen we 100 μ l RPMI-milieu toe
- als positieve controle wordt PWM (zie SOP-096 – Bijlage 2 – Werkvoorschrift: LTT met antigenen of mitogenen) meegenomen (tenzij PHA, ConA of IL2 & Anti-CD3 werden aangevraagd)
5. elke tube vortexen en per 200 μ l verdelen over 4 holten in een FALCON 3077 microtitratieplaat (ronde bodem); de buitenste holten van de plaat worden hierbij **niet** gebruikt!
6. de holten rond de ingezette holten worden met een SARSTEDT TF pipet opgevuld met resterend autoloog plasma 5% (of RPMI-milieu of PBS)
7. de microtitratieplaten worden gedurende 6 (of, in geval van een feestdag, 7) dagen in een broedstoof (37 °C, 5% CO₂) geplaatst

Zie verder *SOP-096 – Bijlage 5 – Werkvoorschrift: Radioactieve labeling met Thymidine*
 SAF-330 – Bijlage 2 – Behandeling van afvalvloeistoffen met zware metalen

Attachment 2: Voorstel nieuwe aanpak**LTT met beryllium (in steriele omstandigheden!)**

8. **afzondering van de lymfocyten** (SOP-096 – Bijlage 1 – Werkvoorschrift: LTT: Afzonderen lymfocyten)
9. Maak een 10^{-2} M oplossing door MW van metaalzout in mg op te lossen in 100 ml demi-water type 1 (metaalvrij glas gebruiken!)
10. 3 seriële 1/10 verdunningen maken door telkens 100 μ l (verdund) metaalzout aan 900 μ l RPMI-milieu toe te voegen; **voor de eerste verdunning werd de metaalzout-oplossing eerst gefiltreerd** (Acrodisc 0,2 μ m). De concentraties zijn dan respectievelijk 1000 μ M, 100 μ M, 10 μ M. De finale concentraties in de cupjes zijn dan respectievelijk 100 μ M, 10 μ M en 1 μ M.
11. – van elke concentratie beryllium (1, 10 en 100 μ M) wordt 100 μ L aan een tube met 900 μ L afgezonderde lymfocyten toegevoegd. Dit gebeurt in duplo (dus 2 tubes voor elke concentratie beryllium, 6 tubes in totaal)
- bij 6 buizen afgezonderde lymfocyten wordt 100 μ l RPMI-milieu toegevoegd (spontane proliferatie)
- als positieve controle wordt PWM (zie SOP-096 – Bijlage 2 – Werkvoorschrift: LTT met antigenen of mitogenen) meegenomen (tenzij PHA, ConA of IL2 & Anti-CD3 werden aangevraagd)
-in totaal worden dus 6 tubes met beryllium, 6 tubes met controle en 1 tube met mitogeen ingezet
12. elke tube vortexen en per 200 μ l verdelen over 4 holten in een FALCON 3077 microtitratieplaat (ronde bodem); de buitenste holten van de plaat worden hierbij **niet** gebruikt!
13. de holten rond de ingezette holten worden met een SARSTEDT TF pipet opgevuld met resterend autoloog plasma 5% (of RPMI-milieu of PBS)
14. de microtitratieplaten worden in een broedstoof (37 °C, 5% CO₂) geplaatst.
15. Na 4 dagen wordt 1 reeks bestaande uit 3 X 4 cupjes met verschillende beryllium concentraties, 3 X 4 controles en het mitogeen geogst en verder geanalyseerd cfr. *SOP-096-Bijlage 5/SAF-330-Bijlage 2*
16. Na 7 dagen wordt de tweede reeks bestaande uit 3 X 4 cupjes met verschillende beryllium concentraties, 3 X 4 controles geogst en verder geanalyseerd cfr. *SOP-096-Bijlage 5/SAF-330-Bijlage 2*
17. Interpretatie

Berekeningen referentie: Frome EL, Newman LS, Cragle DL, Colyer SP, Wambach PF. Identification of an abnormal beryllium lymphocyte proliferation test. Toxicology. 2003;183:39–56.

1. Beryllium Industry Scientific Advisory Committee (BISAC) consensus

SI= gemiddelde cpm met Be / gemiddelde cpm controle

Er worden 3 SI 's berekend op dag 5 (voor elke concentratie Be) en 3 SI 's op dag 7.

Interpretatie:

Vanaf 2 op 6 SI ≥ 3.0 → abnormaal (positief)
 1 op 6 SI ≥ 3.0 → randnormaal (grensnegatief)
 Alle SI < 3.0 → normaal (negatief)

Nadelen:

- geen rekening gehouden met interne variabiliteit test
- outlier gevoelige methode (gemiddelden)
- niet zelf opgestelde cut-off

2. LAV methode volgens DOE-SPEC-1142-2001

Zowel een biologisch als een statistisch luik. Biologisch luik nog aan te vullen met eigen controles. Zowel biologisch als statistische positiviteit vereist.

Tenminste de helft van de gestandaardiseerde Ln(SI) dienen groter dan -3 te zijn (geen evidentie voor extreme celdodging)

De standaarddeviatie van Ln(cpm) voor controle en Be mogen respectievelijk 0.95 en 1.5 niet overschrijden (geen extreme interne variabiliteit)

Assumpties:

- Ln van de well cpm zijn normaal verdeeld
- standaard deviatie' s van well cpm zijn constant binnen een oogstdag
- er zijn meerdere outliers
- indien gesensitiseerde cellen aanwezig zijn zal er een relatieve toename in proliferatie van de Be wells ten opzichte van de controles plaatsvinden

Statistisch positief

Bereken Ln(cpm) voor alle well's

Neem de mediaan (van de logaritmes van cpm) voor de controle's van dag 5 (MED(Ln(c)))

Neem de mediaan (van de logaritmes van cpm) voor elk van de 3 concentratie's Be (MED(Ln(Be1)), MED(Ln(Be10)), MED(Ln(Be100)))

Bereken de 3 Ln(SI):

Voor 1 μ M Be: MED(Ln(Be1)) - MED(Ln(c)) = Ln(SI, Be1, 5)

Voor 10 μ M Be: MED(Ln(Be10)) - MED(Ln(c)) = Ln(SI, Be10, 5)

Voor 100 μ M Be: MED(Ln(Be100)) - MED(Ln(c)) = Ln(SI, Be100, 5)

Indien geen respons aanwezig, dan SI=1 en Ln(SI)=0

Bereken een schatting de standaarddeviatie van Ln(cpm) via volgende formule:

$$S_m = 1.48 \times \text{MED}(\text{absolute}(\text{residual})) \times \sqrt{(n/(n-p))}$$

met n= 24 (aantal wells) en p=4 (vrijheden)

met absolute(residual) = | Ln(cpm, controle well) – MED(Ln(c)) | voor controle wells

met absolute(residual) = | Ln(cpm, Be well) – MED(Ln(Be1)) | voor Be1 wells

met absolute(residual) = | Ln(cpm, Be well) – MED(Ln(Be10)) | voor Be10 wells

met absolute(residual) = | Ln(cpm, Be well) – MED(Ln(Be100)) | voor Be100 wells

Bereken een schatting van de standard error (SE) van Ln(SI) via onderstaande formule:

$$SE(\text{Ln}(\text{SI})) = S_m * \sqrt{(\pi/2)} * \text{constant}$$

met constante=0.577 voor 12 controle wells en 4 Be wells, constante=0.612 voor 8 controle wells en 4 Be wells

Bereken de gestandaardiseerde Ln(SI) door

$$\text{Ln}(\text{SI}, \text{Be}1, 5) / SE(\text{Ln}(\text{SI}))$$

$$\text{Ln}(\text{SI}, \text{Be}10, 5) / SE(\text{Ln}(\text{SI}))$$

$$\text{Ln}(\text{SI}, \text{Be}100, 5) / SE(\text{Ln}(\text{SI}))$$

Statistisch positief vanaf gestandaardiseerde Ln(SI) ≥ 2.5

Doe hetzelfde voor de controles en stalen op dag 7.

Vanaf 2 gestandaardiseerde Ln(SI) positief (slechts 0.1% kans op type I fout, student t verdeling met 20 vrijheidsgraden)

Biologisch positief

Assumptie:

- de maximum Ln(SI) (MAX(Ln(SI))) voor de "normale" personen is gaussiaans verdeeld

Bereken voor minstens 30 "normale" personen Ln(SI) bij de 3 concentratie's Be op dag 5 en 7

Bepaal de maximum Ln(SI) voor elke persoon

Bepaal MED(MAX(Ln(SI))) = M

Bepaal de absolute deviaties van de MAX(Ln(SI)) voor elke persoon = | MAX(Ln(SI)) - M |

Bereken een schatting van de standaarddeviatie door

$$SD = 1.48 \times MAD \times \sqrt{(n/n-1)} \text{ met } n = \text{minstens } 30 \text{ en } MAD \text{ is } MED | \text{MAX}(\text{Ln}(\text{SI})) - M |$$

Bereken gestandaardiseerde MAX(Ln(SI)) door

$$(\text{MAX}(\text{Ln}(\text{SI})) - M) / SD$$

Positief vanaf 3.1 (student t verdeling met minstens 29 vrijheidsgraden)

Attachment 3: Alternatieve methodes

De **[3H] thymidine** assay is gevoelig, reeds lang in gebruik voor verschillende doeleinden en voor een aantal testen nog steeds de meest gestandaardiseerde en beproefde methode. Desalniettemin geeft deze methode geen informatie over welke subsets cellen [3H] thymidine incorporeren (geheel aantal cpm over alle cellen, levend of dood), maakt ze gebruik van radio-activiteit (met alle bekommernissen van dien) en kan ze aanleiding geven tot inter-en intra-laboratoriumvariabiliteit. Een inherente tekortkoming van alle thymidine-analogen is dat deze niet altijd goed correleert met proliferatie en echte toename van DNA-inhoud (ook incorporatie buiten de proliferatie fasen/onvolledige incorporatie) [1].

Als radioactief alternatief kan **[125I] thymidine** worden vermeld, dit lost eigenlijk geen van de tekortkomingen van de [3H] thymidine assay op.

Sinds de introductie van **anti-bromodeoxyuridine (anti-BrdU)** antistoffen meer dan 25 jaar geleden [2], zijn verschillende assays op deze basis ontwikkeld. Groot voordeel is dat de radioactiviteit door incorporatie van dit thymidine analoog wordt gemeten. Naast bovenvermeld nadeel van alle thymidine analogen [1] werd eveneens in sommige studies een anti-mitogeen effect van BrdU gerapporteerd na incorporatie, de literatuur is hierover echter niet eenduidig [3]. Desalniettemin blijkt de geïncorporeerde hoeveelheid BrdU direct proportioneel met het aantal prolifererende cellen [4] en kan het gekwantificeerd worden gebruik makende van een sandwich **ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [5] op

gedenatureerd cel lysaat of een directe ELISA [6] op gefixeerde cellen. Deze techniek bereikt een vergelijkbare sensitiviteit als de [3H] thymidine assay [5-8]. Ook is de test goedkoper en reproduceerbaar. Deze assays beschrijven **colorimetrische** bepalingen. Absorbantiemetingen hebben echter een beperkte dynamische range. Bovendien geeft deze techniek nog geen verduidelijking welk celttype proliferereert en of het wel zeker incorporatie gedurende proliferatie is. De chemiluminiscentie assay is ontworpen [9] om een bredere dynamische range te verkrijgen. Er zijn meerdere firma's die een kit op de markt hebben gebaseerd op dit principe (Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche), Cyclex®BrdU Cellular ELISA kit (MBL), BrdU Cell Proliferation ELISA (Kamiya Biomedical Company), BrdU Cellular ELISA kit (Abnova)). Ondanks bovengenoemde voordelen wordt deze techniek echter zelden in publicaties aangaande patiëntenstalen (toch zeker wat metaalsensitatie en geneesmiddel-hypersensitiviteit betreft).

Gekoppeld aan fluorescente kleurstof, kan **anti-BrdU** gebruikt worden in een **flow cytometrisch** concept. Hierdoor kan tegelijk een analyse van de reagerende (**proliferende**) subsets cellen gemaakt worden (**oppervlaktemerkers**) en eventueel intracellulaire **cytokines** (indien gepast protocol gevolgd wordt) gedetecteerd worden. Via deze techniek kan men een compleet beeld verkrijgen over de intracellulaire processen [12]. Voor **Beryllium** is op deze basis een immuno-BeLPT uitgewerkt, welke echter nog geen algemene ingang vindt en verder dient gevalideerd te worden [13]. Voor de subset reactie analyse is een goede kennis van de pathogenese, de verantwoordelijke cellen en mediators nodig. Deze is niet bij alle onderzochte pathologiën even goed gekend. De immuno-BeLPT heeft als voordeel dat er metingen op celniveau gebeuren, er informatie over de "viability" van de cellen meekomt, reagerende subsets kunnen worden onderscheiden en radioactiviteit vermeden wordt. De kostprijs en werkkost zou die van de [3H] Thymidine assay benaderen.

Flow cytometrie kan ook ingezet worden om **celcyclus** analyse te doen. Hiervoor worden de cellen na incubatie met mitogeen of antigeen, gepermeabiliseerd en worden fluorochromen ingebracht die het DNA (en RNA (nood aan RNases)) kleuren. Veel gebruikt in deze context zijn propidium iodide (**PI**) en ethidium bromide als intercalerende agentie die DNA en RNA helices binden. Andere fluorochromen zoals Hoechst 33342, Hoechst 33258 of 4'6'-diimidazolin-2-phenylindole (**DAPI**) zijn specifiek voor adenine of thymidine. Elke fase in de celcyclus gaat gepaard met meer of minder DNA inhoud. Op basis van de piek en oppervlakte van het fluorescentiesignaal per cel worden de cellen in een stadium ingedeeld. Een stijging van percentage cellen in de S fase (+ G2/M) fase na incubatie met mitogeen/antigeen correleert met de mate van proliferatie [14]. Gecombineerd met oppervlakte markers kan dit concept een aanduiding geven over welk subtype cellen het meest proliferereert [13]. Voordeel is dat celcyclus in zijn geheel wordt bekeken. De problemen, zoals bij thymidine-analogen, van uptake buiten de proliferatie fase of onvolledige incorporatie zijn hier minder aan de orde. Een rapport toont echter een mindere correlatie met de [3H] thymidine assay [15].

Voor beryllium werd een **combinatie van BrdU inbouw en DNA-inhoud** bepaling gebruikt. Gedurende de ganse incubatie periode wordt BrdU inbouw toegelaten (in tegenstelling met andere assays die spijken met [3H] thymidine, BrdU gedurende de laatste 8-24 uur van incubatie). Door inbouw van BrdU in plaats van thymidine kan Hoechst 33258 minder met DNA binden en wordt de piek-oppervlakte fluorescentie van de cellen (gemeten via een flow cytometer) die BrdU hebben geïncorporeerd kleiner (quenching). Door tegelijk te kleuren met een fluorochroom dat geen hinder ondervindt van BrdU inbouw kan men de positie van elke cel in de celcyclus bepalen. Deze methode is mogelijk gevoeliger dan de klassieke BrdU incorporatie, daar over een langere periode BrdU kan worden ingebouwd. Ook deze methode kan gecombineerd worden met oppervlakte-/cytokinebepalingen. Een extra voordeel

van al deze flow cytometrische assays, is dat ze met ongeveer 1/3 van het aantal cellen nodig voor de klassieke LPT kunnen worden uitgevoerd. Dit impliceert dat kleinere volumes staal kunnen worden aangewend [16].

Als laatste toepassing via flow cytometrische analyse wordt de fluorescente kleurstof carboxyfluoresceïne succinimidyl ester (**CFSE**) vernoemd. CFDA-SE wordt in het begin toegevoegd aan de te incuberen cellen. Dit product is celpermeabel en wordt intracellulair door esterasen omgezet naar CFSE, wat niet celpermeabel is. Bij elke celdeling wordt het fluorescent signaal per cel gehalveerd. De cellen worden ingedeeld volgens overgebleven fluorescentie en er kan een ratio van gedeelde over niet gedeelde cellen worden bepaald. Dit is evenredig met de mate van proliferatie. Voor beryllium en mitogenen is er een methode met CFSE als basis reeds uitgewerkt [17-19]. Deze methodes dienen echter in de toekomst verder hun nut te bewijzen. Ook deze methode kan gecombineerd worden met oppervlakte/intracellulaire merkers voor subset analyse. Deze methode is minder arbeidsintensief, gebruikt geen radio-activiteit en laat subset onderzoek toe.

De meest vernoemde activatiemerkers in de cel cyclus zijn CD69 (piek na 24 uur stimulatie), CD38, CD25, CD71 (piek na een aantal dagen) en nucleair proliferatie antigen (Ki-67). De rapporten hierover zijn tegenstrijdig. Voor beryllium zou bepalen van CD69 upregulatie geen nut bewijzen [18], voor geneesmiddel-allergie zijn er rapporten die de methode (CD69 upregulatie) wel als nuttig beschouwen [20]. Voordeel is dat deze methodes heel eenvoudig uit te voeren zijn en sommige al sneller resultaat kunnen geven (klassiek 3-7 dagen incubatie).

Een andere benadering is de correlatie tussen **metabole activiteit** en proliferatie. Hiervoor worden op het einde van de incubatieperiode **tetrazoliumzouten** toegevoegd (MTT, XTT, MTS). Deze producten worden door mitochondrale reductases gereduceerd tot al dan niet oplosbare formazanen. Deze kunnen (eventueel na oplossen van kristal) colorimetrisch bepaald worden. Deze methode blijkt echter niet zo sensitief als de [3H] thymidine assay en bovendien kan door toevoegen van antigeen/mitogeen ook de mitochondrale activiteit van "bystander" cellen (niet prolifererende) opgedreven worden wat leidt tot vals positieve resultaten. Als laatste nieuwe werd **AlamarBlue®** geïntroduceerd. Volgens hetzelfde principe zouden cellen hiermee gedurende de ganse incubatieperiode consecutief dagelijks gemonitord kunnen worden en achteraf nog verder volledig geanalyseerd worden met vb. flow cytometrische technieken. Deze techniek bleek echter ook minder sensitief dan de [3H] Thymidine techniek [8, 22-24]. Nog andere methodes waar niet dieper wordt op ingegaan zijn het meten van intracellulair ATP, het meten van de turnover van lysosomaal hexosaminidase (NAG), het meten van allerlei cytokines (IFN-gamma precursor, IL-2, IL-5).

Referenties bij Attachment 3

[1] Neckers L M, Funkhouser, W K, Trepel J B, Cossman J, Gratzner H G. Significant non-s-phase DNA synthesis visualized by flow cytometry in activated and in malignant human lymphoid cells. *Exp Cell Res* (1995) 156, 429-438

[2] Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* (1982) 218,474

[3] Morris SM. The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutation Res* (1991) 258, 161

- [4] D Gauthier, D Cartwright, C Densmore, V Blazer, C Ottinger. Measurement of *in vitro* leucoxyte mitogenesis in fish: ELISA based detection of the thymidine analogue 5'-bromo-2'deoxyuridine. *Fish and Shellfish Immunology* (2003) 14; 279-288
- [5] Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5bromo-2deoxyuridine incorporation into DNA: An enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *Journal of Immunol Methods* (1985) 82, 169-179
- [6] J.-P. Magaud, I. Sargent and D. Y. Mason, Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *Journal of Immunological Methods* **106** (1988), pp. 95–100.
- [7] P. L. T. Huong, A. H. J. Kolk, T. A. Eggelte, C. P. H. J. Verstijnen, H. Gilis and J. T. Hendriks, Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. *Journal of Immunological Methods* **140** (1991), pp. 243–248.
- [8] H. Wemme, S. Pfiefer, R. Heck and J. Müller-Quernheim, Measurement of lymphocyte proliferation: Critical analysis of radioactive and photometric methods. *Immunology* **185** (1992), pp. 78–89.
- [9] James R. Hawker Jr. Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis. *Journal of immunol methods* (2003) 274; 77-82
- [10] Andreas Thiel et al. Antigen-specific cytometry – New tools arrived! *Clinical Immunology* (2004) 155-161
- [11] Tsehaynesh Messele et al. Nonradioactive Techniques for Measurement of *in Vitro* T-Cell Proliferation: Alternatives to the [3H] Thymidine Incorporation Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* July 2000, 687-692
- [12] Bela A. Mehta, Vernon C. Maino. Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry. *Journal of immunol methods* 208 (1997) 49-59
- [13] GM Farris et al. Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the Immuno-BelPT. *Toxicology* 143 (200) 125-140
- [14] Kohler et al. Sequential assessment of cell cycle S phase in flow cytometry: a non-isotopic method to measure lymphocyte activation *in vitro*. *Analytical Cellular Pathology* 14(1997) 51-59
- [15] Brohee D, Vanhaeverbeek M, Kennes B, Lefevre A. Comparison of 2 techniques for measuring lymphocyte proliferation: tritiated methyl-thymidine incorporation and propidium iodide fluorometry. *Rev Med Brux.* 1995 Nov;16(5):368-71
- [16] Tim T. Takaro. Alternative Lymphocyte Proliferation Tests: BrdU and Flow Cytometry Based Tests. *International Beryllium Conference, Montreal, Canada March 10, 2005*
- [17] DA Fulcher, SWJ Wong. CFSE-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunology and Cell Biology* (1999) 77, 559-564
- [18] Milanova et al. Flow Cytometric Test for Beryllium Sensitivity. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 60B:23-30 (2004)
- [19] Tatyana N. Milanova. Comparative Analysis Between CFSE Flow Cytometric and Tritiated Thymidine Incorporation Tests for Beryllium Sensitivity. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 72B:265-275 (2007)
- [20] A Beeler, L Zaccaria, T Kawabata, BO Gerber, WJ Pichler. CD69 upregulation on T-cells as an *in vitro* marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2008; 63: 181-188

- [21] Palutke M, Tabaczka PM, Kukuruga DL, Kantor NL. A method for measuring lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte cultures using a nuclear proliferation antigen, Ki-67, and flow cytometry. Am J Clin Pathol. 1989 Apr;91(4):417-21
- [22] de Fries R, Mitsuhashi M Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. J Clin Lab Anal. 1995;9(2):89-95
- [23] Kyubum Kwack, Richard G. Lynch. A new non-radioactive Method for IL-2 Bioassay. Mol. Cells (2000), Vol. 10, 575-578
- [24] Zhi-Jun et al. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis and immunophenotyping studies. Journal of Immunol Methods 210 (1997) 25-39

Versie 060830

Revisie 080325: aanpassing aan nieuwe huisstijl, geen verdere wijziging

Versie 080820: aanpassing sjabloon