

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX—XXXX

代替 YY/T 0606.15-2014

组织工程医疗产品 评价基质及支架免疫反应的试验方法： 淋巴细胞增殖试验

Tissue engineered medical products——
Standard practice for evaluation of immune responses of
substrate and scaffolds products: Lymphocyte proliferation tests

(建议标准发布 6 个月后实施)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2021-7-30)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家药品监督管理局 发 布

目 次

前言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 缩略语..... 1

5 淋巴细胞增殖试验..... 2

 5.1 原理..... 2

 5.2 材料和检测标本..... 2

 5.3 实验设计分组..... 2

 5.4 推荐操作步骤..... 2

6 数据分析..... 3

 6.1 体外抗原刺激..... 3

 6.2 体内抗原刺激..... 3

附录 A（资料性） CFSE 淋巴细胞增殖试验..... 4

参考文献..... 8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替YY/T 0606.15-2014《组织工程医疗产品 第15部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验》，与YY/T 0606.15-2014相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——删除前言中“YY/T 0606《组织工程医疗产品》已经或计划发布以下部分”至“本部分为YY/T 0606的第15部分”的所有段（见PII, 2014版PI）；

——修改前言中归口单位名称为：全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）（见PII, 2014版PI）；

——修改“范围”的第三段内容为注2（见P1, 2014版P1）；

——删除“范围”的第四段，并将其编辑性修改后增加至5.2中（见P1、P2, 2014版P1）；

——删除规范性引用文件中的ISO/TS 10993.20、YY/T 0606.3、YY/T 0606.5，这些文件未在本文中引用（见P1, 2014版P1）；

——修改了支架的定义（见P1, 2014版P1）；

——增加了缩略语（见P1, 2014版P2）；

——5.3.2增加了体内抗原刺激方式的注2（见P2, 2014版P2）；

——5.4.2修改为每个标本3个平行管（见P2, 2014版P3）；

——5.4.5增加CCK-8、CFSE作为淋巴细胞增殖检测方式（见P3, 2014版P3）；

——将5.4.5后的悬置段修改为5.4.6、5.4.7，将5.4.6修改为每个标本3个平行孔（见P3, 2014版P3）；

——条款6 增加淋巴细胞增殖试验分析指标（见P3, 2014版P3）；

——增加附录A，CFSE淋巴细胞增殖试验（资料性）（见P4）。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、北京市医疗器械检验所

本文件主要起草人：

组织工程医疗产品 评价基质及支架免疫反应的试验方法： 淋巴细胞增殖试验

1 范围

本文件规定了评价组织工程医疗产品基质或支架所致哺乳动物细胞免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验。本文件适用于组织工程医疗产品基质或支架的生物学评价。

注1：本部分所述试验虽然也可以用于人体标本的检测或用于研究目的，并可为临床追踪提供数据，但并非对人体状况的诊断性检测。

注2：除本文件所选方法外，可采纳其他等效方法。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分：植入后局部反应试验

GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与皮肤致敏试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基质 substrate

组织工程医疗产品中作为细胞或生物分子生长、支持或输送载体的原材料。

3.2

支架 scaffold

由合成和/或天然来源的材料组成的支持物、结构部件、释放载体或基体，用于调节生物学功能（包括但不限于粘附、迁移、增殖、分化），或外源性和/或内源性细胞的转运，和/或生物活性因子的结合与输送。

[来源：ISO/TS 21560:2020，定义3.14]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Alamar Blue：阿尔玛蓝（Alamar Blue Kit）

BSA：牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin）

CCK-8：一种细胞计数试剂（Cell Counting Kit-8）

CFSE：羧基荧光素二乙酸酯琥珀酰亚胺酯（Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester）

ConA：刀豆球蛋白A（Concanavalin A）

DMSO：二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide）

FBS：胎牛血清（Fetal Bovine Serum）

HSA：人血清白蛋白（Human Serum Albumin）

MTT：噻唑蓝（Thiazolyl blue）

PBS: 磷酸盐缓冲盐水 (Phosphate Buffered Saline)

PHA: 植物凝集素 (Phytohaemagglutinin)

RPMI 1640: 一种专用生长培养基 (Roswell Park Memorial Institute-1640)

5 淋巴细胞增殖试验

5.1 原理

抗原刺激淋巴细胞产生各种细胞因子或白介素，这些细胞因子/白介素将激活并刺激淋巴细胞等分化，从而使增殖反应放大。

5.2 材料和检测标本

在实施本文件推荐的试验前，应按GB/T16886.1的要求考虑本文件中方法的适用性，并非所有的材料和产品均需要按照本文件进行试验。

基质/支架（以下统称为材料）或其中的已知成分，以及依据GB/T 16886.12制备的材料浸提液均可作为免疫学实验材料。

注：当采用材料浸提液作为免疫学实验材料时宜对浸提条件的有效性进行论证。

检测标本可以来自于按GB/T 16886.6和GB/T 16886.10要求进行的植入试验或刺激及致敏试验的动物血液、器官和组织或活检标本，也可采用相应的临床追踪的患者血液和活检标本；还可以用各种抗原免疫动物（兔或小鼠）获得标本。实验需使用活细胞，可取自外周血、腹腔渗出液、肺泡灌洗液、撕碎或研碎的淋巴器官。

5.3 实验设计分组

5.3.1 体外抗原刺激方式

当采用体外抗原刺激方式时可考虑分为以下四组，建议每组3个平行管：

- a) 细胞对照组；
- b) 细胞加有丝分裂原 (PHA/ConA)；
- c) 细胞加浓度 1 抗原（材料或浸提液）；
- d) 细胞加浓度 2 抗原（材料或浸提液）；

注：推荐多克隆T细胞刺激原（有丝分裂原）（例如PHA或ConA）作为体外抗原刺激的阳性对照。

5.3.2 体内抗原刺激方式

当采用体内抗原刺激方式时，可将实验动物分为：

- a) 阴性对照组（溶剂空白或手术空白）；
- b) 阳性对照组（已知特异性阳性抗原）；
- c) 试验材料组。

注1：推荐采用已知特异性阳性抗原作为体内抗原（刺激）的阳性对照。

注2：对于可降解组织工程支架材料，宜考虑在不同降解时间点获取动物标本进行淋巴细胞增殖试验。对于表现出影响淋巴细胞增殖的试验材料，宜考虑其效应的剂量关系，例如获取试验材料多剂量组动物标本进行淋巴细胞增殖试验。

5.4 推荐操作步骤

5.4.1 采用适当的方法分离淋巴细胞（如使用淋巴细胞分离液、红细胞裂解液），并将其悬浮在生长培养基中(RPMI 1640, 含 10 % FBS 和 1 %浓度为 30 mg/mL 的谷氨酰胺溶液)，调整细胞浓度至 10^6 个细胞/毫升。

注：试验应在无菌环境下操作。除青霉素/链霉素或庆大霉素外，不建议在培养液中使用其他的抗生素，因为它们的作用模式可能会影响到细胞的反应。

5.4.2 将淋巴细胞悬液分配到试管中，每个标本 3 个平行管，每管 1 mL。

5.4.3 将上述试管置于 37 °C 培养 7 天，有丝分裂原的反应峰值出现在第 4 天，抗原的反应峰值出现

在第 7 天。

5.4.4 培养 7 天后，向培养基中加入 ^3H -胸腺嘧啶核苷或 ^{125}I -胸腺嘧啶核苷继续培养 4~6 小时。

5.4.5 收集细胞（通常采用过滤清洗的方法），检测同位素的掺入量。MTT 作为一种简便的细胞增殖染色标记，其应用越来越多，也可以用 Alamar Blue、CCK-8、CFSE 等检测淋巴细胞增殖。参照附录 A 进行 CFSE 淋巴细胞增殖试验。

5.4.6 上述试验也可采用微孔培养板进行。每个标本 3 个平行孔。建议进行预试验确定培养时间。

5.4.7 抗原与有丝分裂原联合使用可用于检测免疫抑制。

6 数据分析

6.1 体外抗原刺激

将抗原存在下的同位素掺入量（采用 MTT、CCK-8 法时为光密度值，采用 Alamar Blue 时为还原率，采用 CFSE 时为细胞分裂比率、细胞增殖比率、细胞增殖指数和细胞分裂指数）与细胞对照组比较。有丝分裂原用于确认检测系统运行是否正常。允许将抗原与有丝分裂原引起的反应进行比较。

6.2 体内抗原刺激

将试验材料组的同位素掺入量（采用 MTT、CCK-8 法时为光密度值，采用 Alamar Blue 时为还原率，采用 CFSE 时为细胞分裂比率、细胞增殖比率、细胞增殖指数和细胞分裂指数）与阴性对照组比较。已知特异性阳性抗原用于确认检测系统运行是否正常。

附录 A (资料性) CFSE 淋巴细胞增殖试验

A.1 概述

羧基荧光素二乙酸酯琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)通过与赖氨酸侧链和其他可用胺基反应,能不可逆地偶联到细胞内和细胞表面蛋白质。当细胞分裂时,CFSE标记平均分布在子细胞之间,子细胞的荧光强度是上代细胞的二分之一。因此,增殖细胞群的连续代次间存在细胞荧光强度减半这一标志特征,因而可以用流式细胞术检测。可追踪的细胞分裂代次(通常为8次分裂)仅受未标记细胞的自体荧光水平和标记细胞群的一致性水平的限制。与氘化胸腺嘧啶核苷或MTT评估细胞增殖不同,CFSE增殖试验中可以获取活细胞,将其分类并用于其他功能检测。

A.2 试验材料和试剂

- a) 实验动物或人外周血来源的淋巴细胞,或培养淋巴细胞;
- b) 磷酸盐缓冲盐水(PBS), pH值7.4;
- c) 胎牛血清(FBS);
- d) 牛血清白蛋白(BSA);
- e) 人血清白蛋白(HSA);
- f) RPMI 1640培养基;
- g) 有丝分裂原:ConA, PHA;
- h) CFSE;
- i) 二甲基亚砜(DMSO);
- j) 其他:移除小鼠淋巴器官,制备单核细胞悬浮液,以及分离人外周血单个核细胞所需的试剂和设备的制备。细胞表面染色流式抗体等。

A.3 试验方法

A.3.1 试验分组

- a) CFSE 标记细胞对照组;
- b) CFSE 标记阳性对照组(有丝分裂原 ConA、PHA,或特异性阳性抗原);
- c) CFSE 标记试验材料组(材料或浸提液);
- d) 无 CFSE 标记对照组:细胞对照组、阳性对照组、试验材料组。

A.3.2 CFSE标记细胞

- a) 在 0.1% BSA 的 PBS 中重悬细胞并计数,并调整细胞悬液为 $(1\sim 50)\times 10^6/\text{mL}$ 。

注1:用CFSE标记人外周血单个核细胞时建议使用含0.1% HSA的PBS。在 $(1\sim 10)\times 10^6/\text{mL}$ 的低细胞浓度时,宜使用含0.1% BSA或 0.1% HSA的PBS悬浮细胞,也可使用含5% FBS的PBS,但使用FBS可导致CFSE标记强度降低。在 $(10\sim 50)\times 10^6/\text{mL}$ 的高细胞浓度时,可直接使用PBS悬浮细胞,在CFSE标记时仅用PBS悬浮细胞,可能会降低细胞活力。

- b) 用 PBS 稀释 5 mM CFSE 储备液至 50 μM 工作液,每 960 μL 细胞悬液中加入 40 μL CFSE 工作液(最终浓度为 2 μM),并快速混合,室温避光染色 5-15 min。

注2:避光操作下制备CFSE储备液,在25 mg的CFSE瓶中加入10 mL无菌DMSO,获得5 mM的CFSE储备溶液,以10 μL -50 μL 分装加入无菌微型离心管中。在-20℃下避光可保存1年。

注3:不同批次CFSE的毒性可能不同,每批CFSE均需确定能维持细胞活性的浓度。建议使用新开瓶的DMSO来溶解CFSE,因为开瓶后超过6个月的DMSO会降低细胞的增殖能力。

注4:避免反复冻融CFSE。宜在使用前稀释CFSE,并避光操作。CFSE工作液浓度至关重要。低浓度的CFSE会限制可检测细胞分裂代次,高浓度的CFSE可能对细胞有毒性并影响增殖。适宜的最终浓度通常在0.25 μM ~5 μM 之间。

注5：孵育时间至关重要的，较长的孵育时间会对实验结果产生负面影响。

注6：也可用PBS配制4 μ M的CFSE工作液，然后与细胞悬液等体积混合。

c) 孵育后，加入等体积的FBS或5倍体积的含有10%FBS的预冷培养基，并混匀以终止CFSE标记，在300 \times g下离心5 min，弃去上清液，再次加入含10% FBS的培养基悬浮洗涤细胞，重复洗涤2次。

A. 3.3 体外抗原刺激淋巴细胞增殖试验

a) 用含10% FBS的RPMI1640完全培养基重悬CFSE标记细胞、无CFSE标记细胞并计数，调节细胞悬液浓度均为 2×10^6 /mL。

b) 在96孔板中，无CFSE标记对照组（细胞对照组、阳性材料组、试验材料组）加入100 μ L未经CFSE标记的细胞，其余每组加入100 μ L CFSE标记细胞（ 2×10^5 个细胞/孔），每组3复孔。

注1：也可使用24孔平底板，每孔接种1 mL细胞悬液（ 2×10^6 /mL），每组2复孔。

注2：通常情况下使用 2×10^6 /mL或 2×10^5 个细胞/孔的细胞浓度。在初始实验中比较2、4、 8×10^5 个细胞/孔是有用的。

注3：在进行抗原特异性淋巴细胞增殖试验时，每次培养接种的细胞数量宜比预期的效应细胞频率多10倍，才能可靠地监测淋巴细胞反应。因此，如果要在未经刺激的人体中检测抗原特异性反应，至少需要接种100万个淋巴细胞，因为许多抗原特异性原始T细胞的频率约为1/ 10^5 。相比之下，如果已经暴露于给定的抗原，则 2×10^5 个细胞可能足以检测到反应，因为抗原特异性记忆T细胞的频率明显更高。

c) 然后细胞对照组（CFSE标记和无CFSE标记）中加入100 μ L细胞培养液，阳性对照组（CFSE标记和无CFSE标记）加入含ConA或PHA（ConA浓度为5 μ g/mL，PHA浓度为10 μ g/mL）的细胞培养液100 μ L，试验样品组（CFSE标记和无CFSE标记）中加入试验样品或浸提液100 μ L。

A. 3.4 体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验

a) 用含10% FBS的RPMI1640完全培养基重悬CFSE标记细胞、无CFSE标记细胞并计数，调节细胞悬液浓度均为 1×10^6 个细胞/mL。

b) 在96孔板中，无CFSE标记对照组（阴性对照组、阳性材料组、试验材料组）加入200 μ L未经CFSE标记的细胞，其余每组加入200 μ L相应组别的CFSE标记细胞（ 2×10^5 个细胞/孔），每组3复孔。

注：也可使用24孔平底板，每孔接种2mL细胞悬液（ 1×10^6 个细胞/mL），每组2复孔。

A. 3.5 获取流式细胞术样本

a) 根据试验材料或刺激物的不同，在37 $^{\circ}$ C的5%二氧化碳中孵育3至10天。

注1：有丝分裂原刺激需要培养3到6天，因为它们可以交叉结合大多数细胞上的受体。抗原刺激物需要孵育7-10天以克隆扩增。

b) 避光操作。将细胞收集在流式管中，300 \times g下离心5分钟，弃去上清液。加入3 mL PBS后离心清洗。

c) 如果要对CFSE标记细胞进行进一步分析时，加入相应的细胞表面染色流式抗体。在室温避光孵育30 min。

注2：抗体量取决于供应商、抗体种类等。

注3：当结合不同淋巴细胞表面标记（CD45、CD3、CD4、CD8、CD19、CD49b等）对CFSE标记细胞进行进一步分析时，需要对每一表面标记均设置阳性刺激组，以在流式细胞术检测时调整荧光补偿。

d) 加入1 mL洗涤缓冲液，涡旋，以400 \times g离心10 min。弃去上清液，添加250 μ L PBS，添加1 μ M碘化丙二钠（PI）或其他检测细胞活性的染料，并将试管避光4 $^{\circ}$ C保存，直到准备好在FACS上检测。

A. 3.6 流式细胞术检测

a) 当结合不同淋巴细胞表面标记对CFSE标记细胞进行进一步流式细胞术分析时，应采集足够多的细胞，例如四色流式细胞术宜分析50000个细胞。

b) 在流式细胞仪上开启流式细胞仪专用分析软件，创建以前向散射角（FSC）为X轴，侧向散射角（SSC）为Y轴的散点图。在淋巴细胞群周围设置门（R1），并调整以包括更大、更多颗粒的增殖淋巴母

细胞。同时创建第二个门（R2）来排除死亡细胞。

注1：通过使用适当的附加门排除死细胞，对增殖细胞的分析可以得到更精确的数据。

b) 在 R1×R2 门基础上，绘制各组细胞 CFSE 荧光强度为 X 轴，细胞数量为 Y 轴的直方图。

注2：对于结合不同淋巴细胞表面标记分析的试验，分别开启含有目的抗体检测通道的散点图，并限定其获取的细胞为相应淋巴细胞表面标记阳性的淋巴细胞群。然后绘制各淋巴细胞表面标记阳性细胞群 CFSE 荧光强度为 X 轴，细胞数量为 Y 轴的直方图。

A. 3. 7 数据分析

A. 3. 7. 1 概述

直方图中单个 CFSE 峰单元的比例可以手动确定，也可以通过商用应用软件对峰值进行反卷积来确定。

注：人工手动计算方法如下举例所示：计算获得 CFSE 染色和 CFSE 未染色的细胞对照组和阳性对照组的几何平均荧光强度。例如 CFSE 染色细胞对照组的几何平均荧光强度为 600，而未染色的阳性刺激组的几何平均自发荧光强度为 2（未染色阳性刺激组细胞分裂增殖后的自发荧光强度一般高于未分裂增殖的细胞对照组）。用 CFSE 染色细胞对照组的几何平均荧光强度减去未染色的阳性刺激组的几何平均自发荧光强度，就可获得 CFSE 染色阳性刺激组的初始未分裂细胞（M0）几何平均荧光强度为 598，将此值转换为以 10 为底的对数为 2.777。然后基于细胞分裂 CFSE 荧光强度倍增的特性，分裂的子代细胞的几何平均荧光强度会是未分裂细胞的 1/2、1/4、1/8 等，即对数值依次减去 0.3 log₁₀ 单位，因此分裂增殖后细胞的 CFSE 几何平均荧光强度峰值分别是 2.477（M1）、2.177（M2）、1.877（M3）、1.577（M4）、1.277（M5）、0.977（M6）和 0.677（M7），而峰边界位于连续峰值之间的中间，也就是峰值每侧 0.15 log₁₀ 单位处。那么每个峰荧光强度左边界的峰值对数为 2.627（M0）、2.327（M1）、2.027（M2）、1.727（M3）、1.427（M4）、1.127（M5）、0.827（M6）和 0.527（M7），计算反对数得到的峰边界荧光强度分别为 424、212、106、53、26.7、13.4、6.7、3.4，再加上几何平均自发荧光强度 2 即得到 426、214、108、55、28.7、15.4、8.7 和 5.4。在流式细胞术获得的细胞荧光强度数据中应用这些峰边界荧光强度就可以计算每一代细胞分裂增殖峰的细胞百分比；再将该细胞百分比除以相应的细胞分裂倍增数（如分裂 1 次为 2，分裂 2 代为 4 等），就可以获得每一代细胞分裂增殖峰所对应的亲代（未分裂）细胞百分比。

A. 3. 7. 2 细胞分裂比率（Division percent, D）

细胞分裂比率指分裂增殖产生的细胞（荧光强度降低）在最终的细胞群体中所占的比率，数值单位为%，数值范围为 0-100%。每一代细胞分裂增殖峰的细胞百分比总和即为细胞分裂比率（D）。

A. 3. 7. 3 细胞增殖比率（precursor frequency, PF）

细胞增殖比率指至少发生了一次分裂增殖的亲代细胞在初始的亲代细胞中所占的比率，数值单位为%，数值范围为 0-100%。将每一代细胞分裂增殖峰的细胞百分比除以相应的细胞分裂倍增数（如分裂 1 次为 2，分裂 2 代为 4 等），就可以获得每一代细胞分裂增殖峰所对应的亲代（未分裂）细胞百分比，其总和即为细胞增殖比率（PF）。

A. 3. 7. 4 细胞增殖指数（Proliferation index, PI）

细胞增殖指数指分裂增殖后的细胞总数量，与初始（亲代）细胞数量相比的倍增程度，数值范围为 1-128。按公式 A. 1 计算。

$$PI = \frac{1-PF}{1-D} \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中：

PI——细胞增殖指数；

PF——细胞增殖比率，%；

D——细胞分裂比率，%。

注：该指标被认为与采用人工计数、MTT、CCK-8 等进行检测的淋巴细胞增殖试验结果基本等同。

A. 3. 7. 5 细胞分裂指数（Division index, DI）

细胞分裂指数指分裂增殖产生的细胞数量，与至少发生了一次分裂增殖的亲代细胞数量相比的倍增程度，数值范围为1-128。按公式A. 2计算。

$$DI = \frac{PI \times D}{PF} \dots\dots\dots (A. 2)$$

式中：

DI——细胞分裂指数；

PI——细胞增殖指数；

PF——细胞增殖比率，%；

D ——细胞分裂比率，%。

注：该指标被认为与采用氘化胸腺嘧啶核苷（³H-T）的淋巴细胞增殖试验结果密切相关。

A. 3. 8 试验结果

计算各组上述指标，根据数据分布情况选择适宜的统计学方法，结合数据生物学意义进行试验结果判定。已知阳性对照组结果用于确认测试系统运行是否正常。

参 考 文 献

- [1] ASTM F1905-98(2003) Standard Practice for Selecting Tests for Determining the Propensity of Materials to Cause Immunotoxicity.
- [2] ASTM F1906-98(2003) Standard Practice for Evaluation of Immune Responses In Biocompatibility Testing Using ELISA Tests, Lymphocyte, Proliferation, and Cell Migration.
- [3] Kruisbeek AM, Shevach E, Thornton AM. Proliferative Assays for T Cell Function. Curr Protoc Immunol,2004;Chapter 3:Unit3.12.
- [4] Parish CR, Glidden MH, Quah, BJ, et al. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. Curr Protoc Immunol,2009;Chapter 4:Unit4.9.
- [5] Muul LM, Heine G, Silvin C, et al. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. Curr Protoc Immunol,2011;Chapter 7:Unit7.10.
- [6] Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. Cytometry A,2011;79(2):95-101.
- [7] Anja TB, Natalia MT, Mansilla MJ, et al. Monitoring T-Cell Responses in Translational Studies: Optimization of Dye-Based Proliferation Assay for Evaluation of Antigen-Specific Responses. Frontiers in Immunology,2017, 8:1870.
-