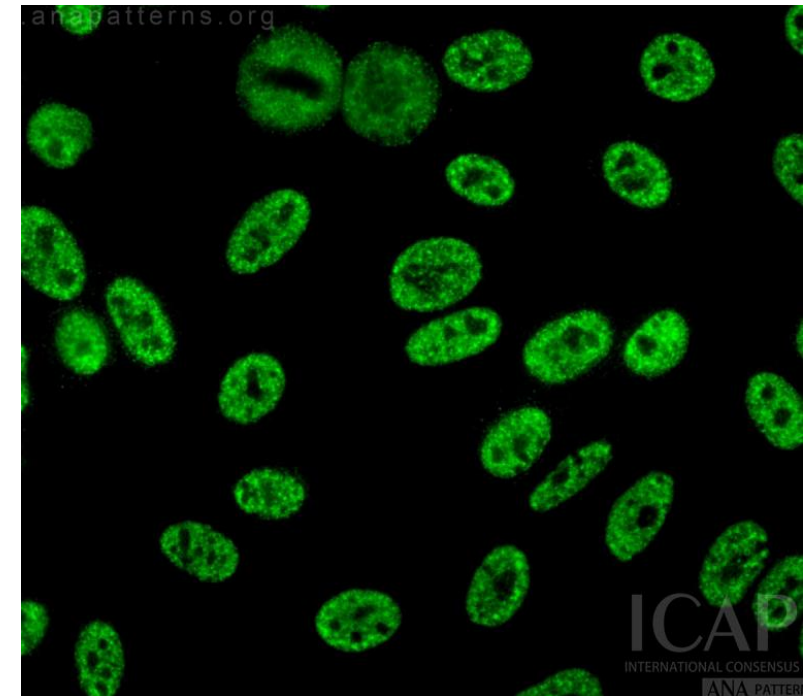




Imunofluorescence

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)
Ústav klinické imunologie a alergologie
FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

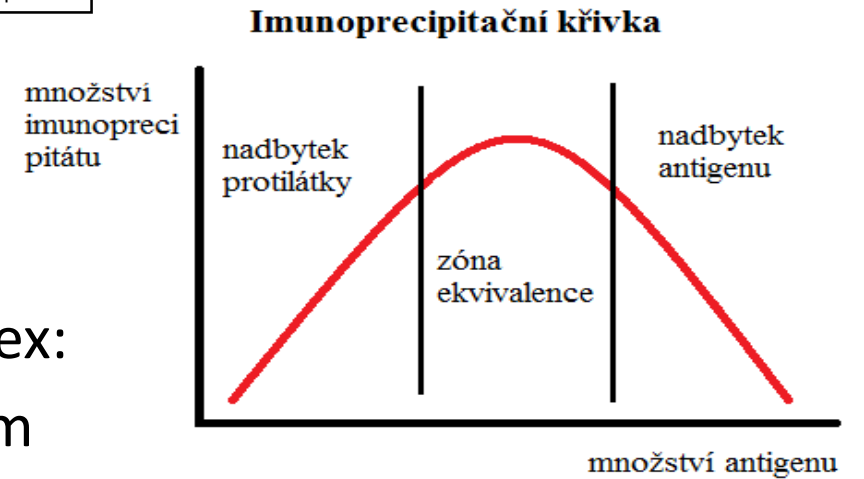


Serologické metody

Reakce antigenu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

- 1. Primární fáze** – rychlá, nepozorovatelná pouhým okem
 - tvorba imunokomplexů Ag + Ab
 - vznik vazby jednotlivých epitopů s vazebnými místy protilátek
- 2. Sekundární fáze** – pomalá, pozorovatelná pouhým okem
 - uplatňuje se multivalence Ag a polyvalence Ab
 - vznik prostorového komplexu

Pokud nedochází k sekundární fázi reakce, je nutné imunokomplexy vzniklé v primární fázi vizualizovat – imunochemické metody



Serologické metody

1. Klasické serologické metody

- Aglutinace (přímá / nepřímá)
- Precipitace (v kapalině, v gelu)

2. **Imunochemické metody s následnou detekcí**

- **Imunofluorescence (přímá / nepřímá)**
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

3. Metody založené na efektorovém účinku protilátek (využívané v klinické mikrobiologii)

- Komplement fixační reakce
- Inhibiční a neutralizační testy

Imunofluorescence

- Luminiscence

Jev, při kterém látka emituje záření po absorpci excitačního záření (Fotoluminiscence) nebo při chemické reakci (Chemiluminiscence)



Zdroj:
www.chemiaasvetlo.sk/teoria/chemiluminiscencia/



Zdroj: www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html

Fotoluminiscence

Fluorescence

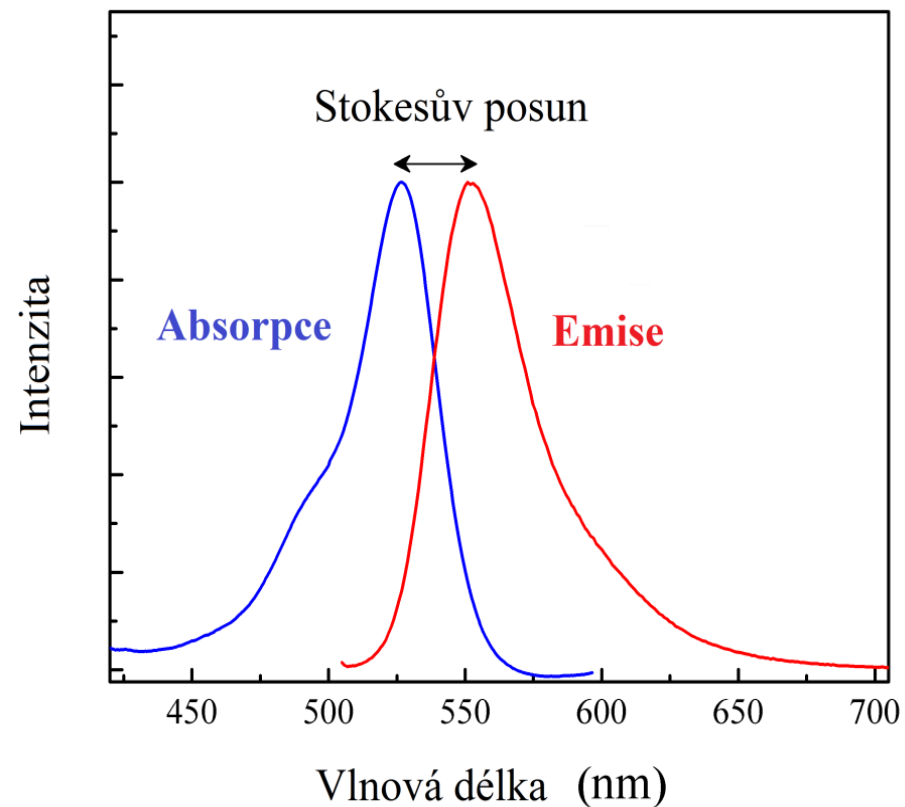
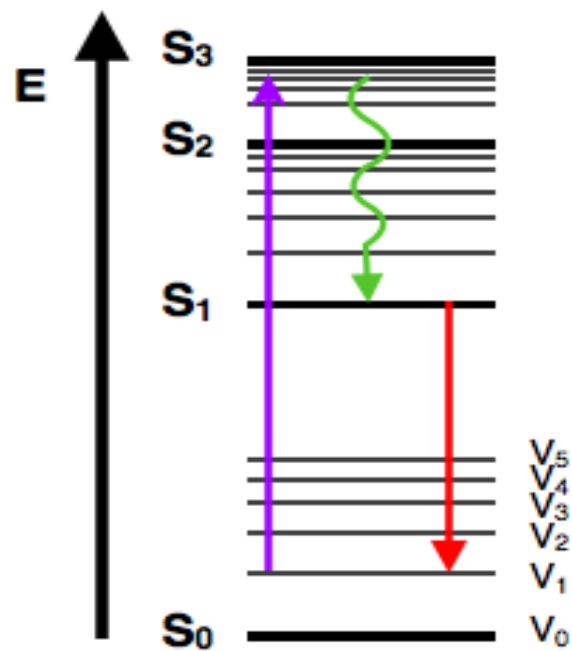
emise záření krátce po excitaci (10^{-8} až 10^{-5} s)

Fosforescence

emise záření trvá delší dobu (10^{-2} s až dni)

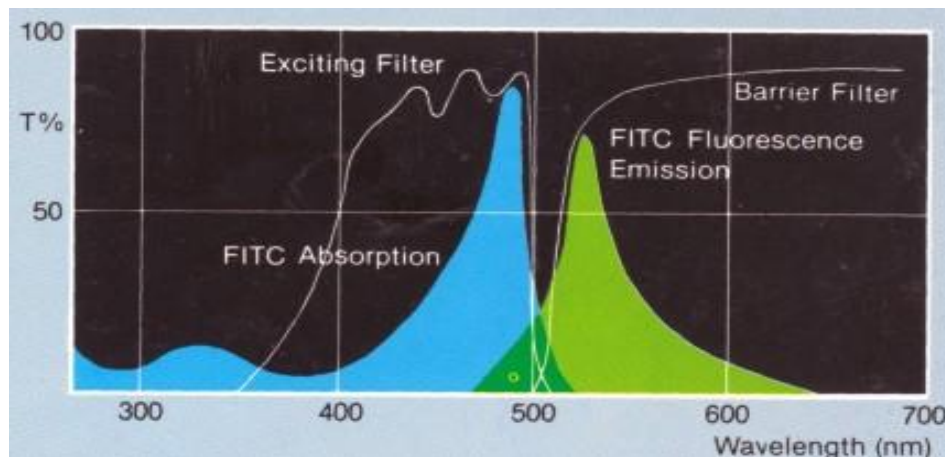
Fluorescence

Látka po absorpci excitačního záření uvolňuje emisní záření o delší vlnové délce (nižší energii) – tento jev se nazývá **Stokesův posun**



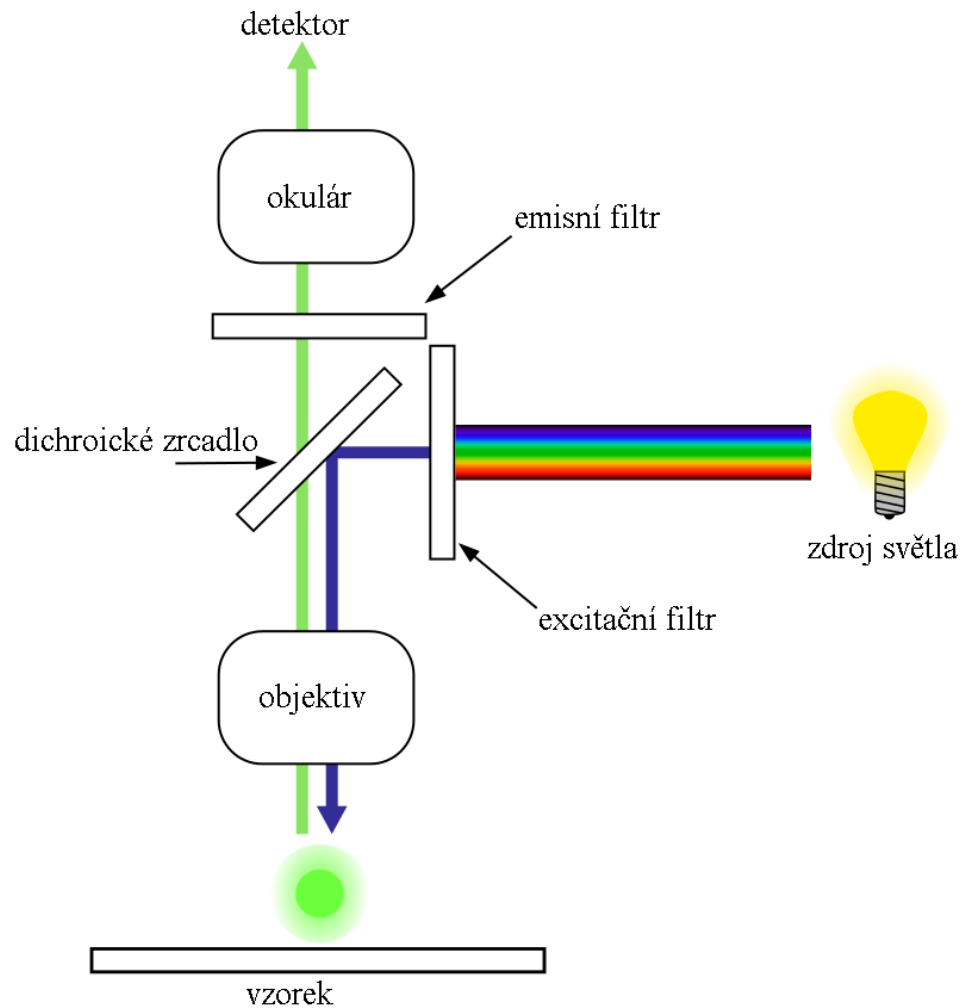
Fluorescenční mikroskop

- Zdroj světla – rtuťová výbojka, **LED dioda**
- Excitační filtr – propouští pouze část spektra potřebného pro excitaci fluorescence a zabraňuje přechodu záření v oblasti emisní vlnové délky, která by vytvářela pozadí
- Emisní (bariérový) filtr – propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního záření

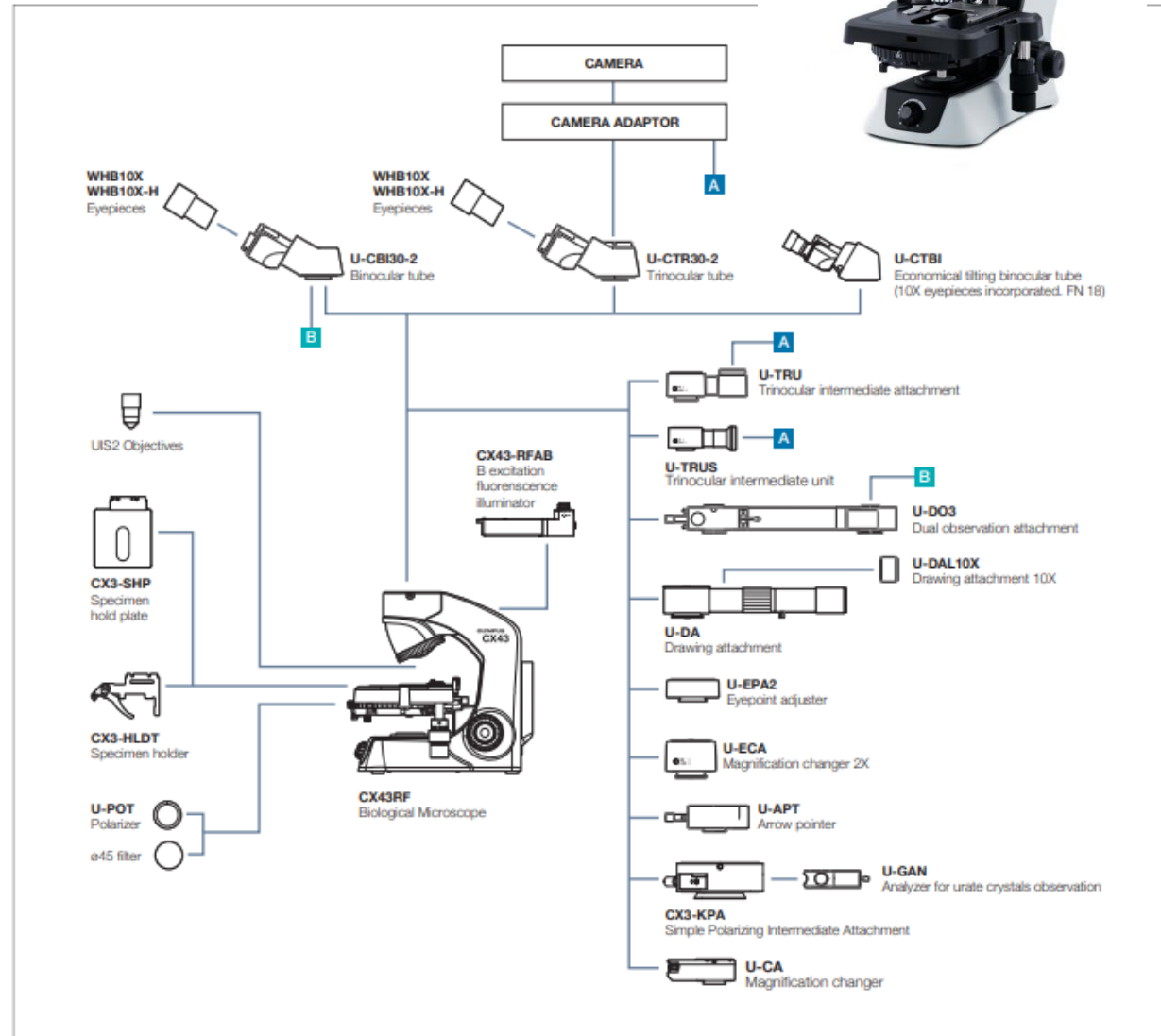


- **Binokulár/trinokulár**
- Jednoduché polarizované světlo
Brightfield, Darkfield, **Fluorescencia**

Schéma fluorescenčního mikroskopu



CX43 System



Imunofluorescence (IF)

➤ Přímá IF

Slouží k detekci antigenů – vazba konjugátu přímo na antigen

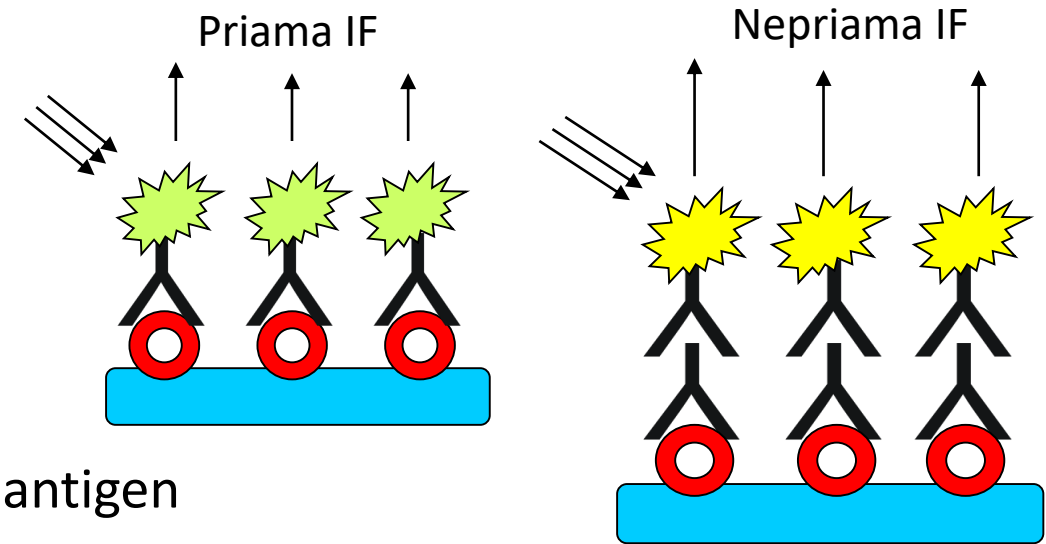
Využití: histologie – prokázání antigenu ve tkáni
mikrobiologie – rychlá detekce patogenů v biologickém materiálu

➤ Nepřímá IF

Používá se k detekci protilátek v séru → vazba protilátek a konjugátu v 2 krocích:

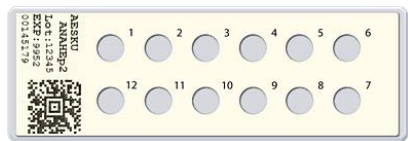
1. Na sklíčko se substrátem se nanese vyšetřovaný materiál (sérum), pokud jsou v něm přítomné hledané protilátky, naváží se na antigenní substrát na sklíčku
2. Nanese se konjugát, který se váže na protilátku příslušné izotypové třídy (IgG/IgA)

Využití: důkaz specifických protilátek, nejčastěji autoprotiátek



Základní princip imunofluorescence (IF)

1. Na sklíčko se substrátem (který obsahuje cílové antigeny) se aplikuje naředěné sérum pacienta (1:80 základní ředění) + vzorky pozitivní a negativní kontroly



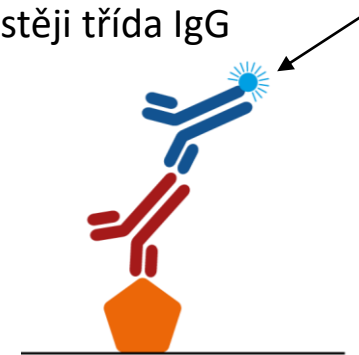
2. Inkubace
30 min v temnu



3. Promytí skel v
PBS+TWEEN – 5 min



4. Aplikace konjugátu – protilátky proti pacientově autoprotilátce, je značená fluorochromem (FITC) – nejčastěji třída IgG



5. Inkubace 30 min
v temnu



6. Promytí skel v
PBS+TWEEN – 5 min

7. Otření hrany skla od přebytečného PBS+TWEEN, na jednotlivé pozice aplikace 1 kapky (cca 10ul) montovacího média - glycerinu

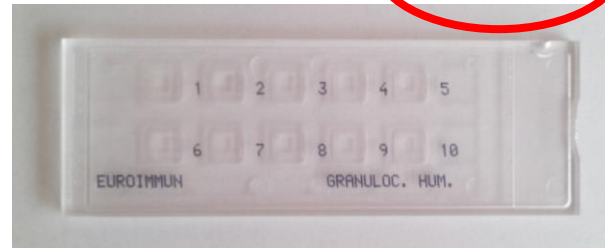
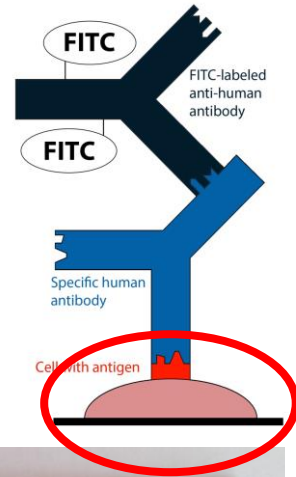
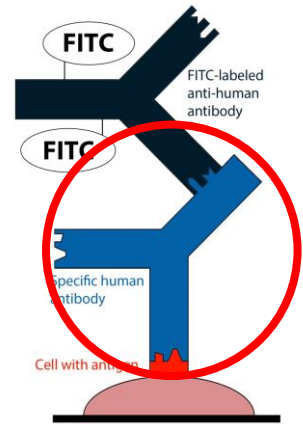


8. Usazení krycího skla, kontrola správného usazení, nutno se vyvarovat bublinám

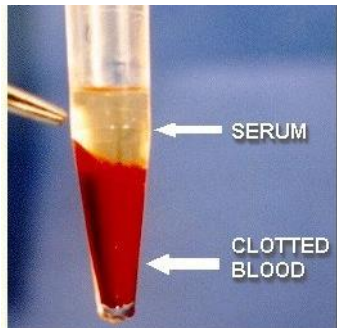
9. Skla jsou připravena k odečtení na mikroskopu



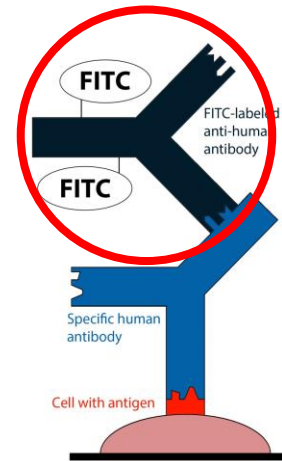
Základní princip



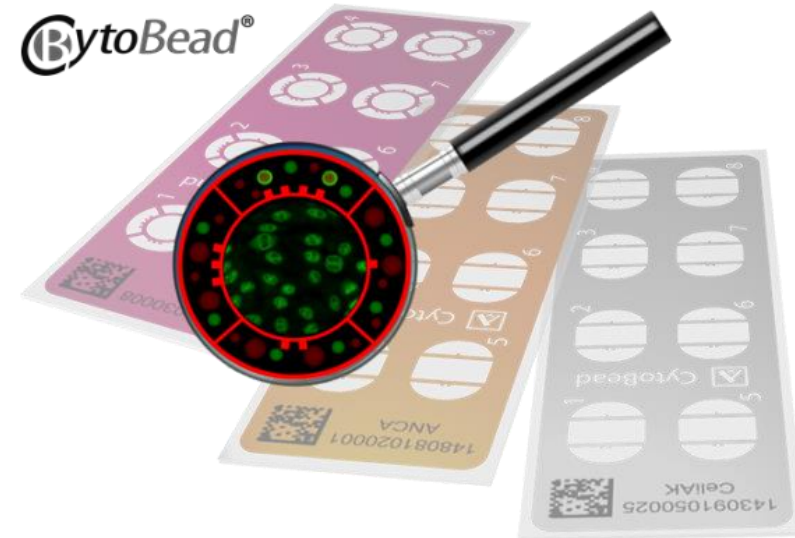
Inkubace →
Promytí →
Krycí sklíčko



Inkubace → promytí



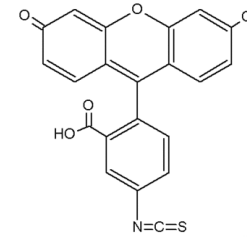
Imunofluorescence



Antigenní substráty používané při nepřímé IF

- **Buňky HEp2** (Human Epithelial) – detekce **ANA**
 - odvozené z linie HeLa (karcinom děložního čípku)
 - rychle se dělící buňky, v mitóze pozorovatelná **chromatinová destička** – důležitý znak pro odlišení jednotlivých typů ANA
- **Neutrofilní granulocyty** – detekce **ANCA**
- **Crithidia luciliae** – prvok, detekce protilátek proti **dsDNA**
- **Opičí jícen** – detekce **EMA**
- **LKS** (liver, kidney, stomach) – detekce **AMA, ASMA, GPC, RET, ...**
 - kombinace 3 krysích tkání

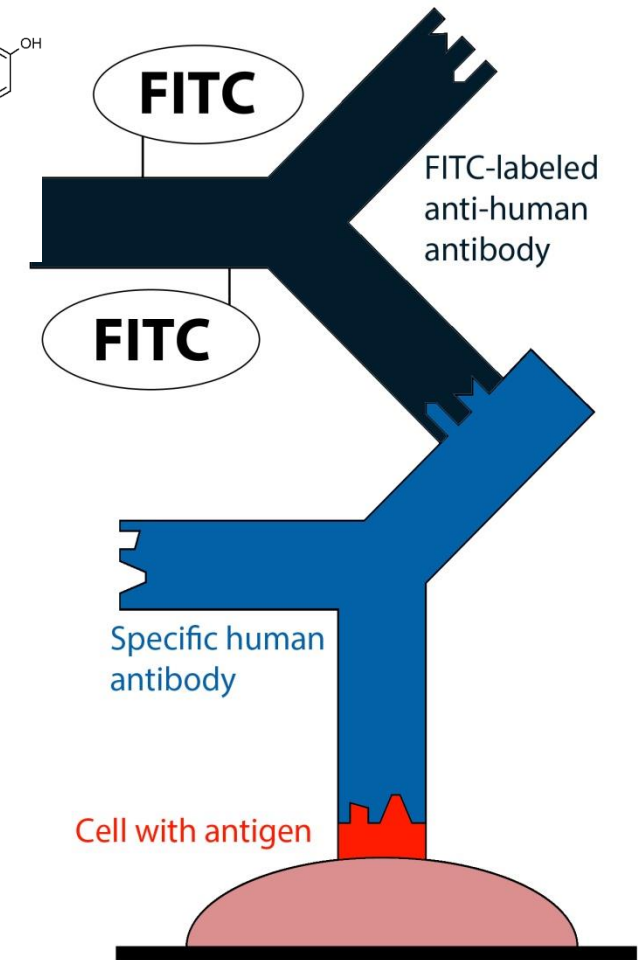
Konjugát



- Protilátka s navázaným fluorescenčním barvivem (fluorochromem)
- Nejčastěji používaný fluorochrom je **FITC** (fluoresceinizothiokyanát)

excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (zelené světlo)

- Konjugát se specificky váže jen na imunoglobuliny určité izotypové třídy (**IgG/IgA**) – výběrem konjugátu stanovíme protilátky jen této třídy
- Pro některé autoimunitní onemocnění má klinický význam výskyt autoprotilátek v určité izotypové třídě (např. celiakie – IgA)




Laboratorní postup při podezření na autoimunitní onemocnění

- Celý proces začíná v ordinaci lékaře
 - Ordinuje vyšetření na autoprotilátky – na základě kliniky+anamnézy (může určit, zda vyšetření požaduje imunofluorescenčně nebo ELISOU/imunoblotem)
- Do laboratoře přichází krev pacienta se žádankou
- Příjem – příprava séra centrifugací srážlivé krve
- Zamražení sér
- V okamžiku, kdy laboratoř nasbírá dostatečný počet vzorků od pacientů pro konkrétní vyšetření → následuje zahájení vlastního vyšetření

Pozn. Proč čekáme na dostatečný počet vzorků? Napravo je ukázka klasického sklíčka s připraveným substrátem od výrobce – zde na 8 vzorků. Sklo je nutné zpracovat plně obsazené, jinak by vyšetření bylo značně finančně nevýhodné. Při zpracování skla pouze s jednou využitou jamkou bychom o zbylých 7 přišli.



Imunologické vyšetření		
 Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 BRNO tel.: 543 183 130, fax: 543 183 143, www.fnusa.cz		
Autoprotilátky proti: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> B2-GP1 <input type="checkbox"/> centromera <input type="checkbox"/> citrulinované proteiny (CCP) <input type="checkbox"/> ds-DNA <input type="checkbox"/> endomysium (EMA) <input type="checkbox"/> ENA (screening) <input type="checkbox"/> SS-A(Ro) <input type="checkbox"/> SS-B(La) <input type="checkbox"/> Scl-70 <input type="checkbox"/> Sm/RNP <input type="checkbox"/> Jo-1 <input type="checkbox"/> fosfolipidy (AFL IgG, IgM) <input type="checkbox"/> GAD, IA-2 <input type="checkbox"/> GBM <input type="checkbox"/> GPC <input type="checkbox"/> histony <input type="checkbox"/> kardiolipin (ACLA IgG, IgM) <input type="checkbox"/> kardiolipin (ACLA IgA) <input type="checkbox"/> LC-1 <input type="checkbox"/> LKM-1 <input type="checkbox"/> mitochondrie (AMA) <input type="checkbox"/> mutovaný citrulinovaný vimentin (MCV) <input type="checkbox"/> PLA2 receptor (APLAR) <input type="checkbox"/> nukleosomy <input type="checkbox"/> retikulín (IgG, IgA) <input type="checkbox"/> SLA <input type="checkbox"/> štítná žláza (TG, TPO) <input type="checkbox"/> tkáňová transglutamináza (TTG) <input type="checkbox"/> U1 RNP <input type="checkbox"/> protilátky proti IgA 	Autoprotilátky: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> ANA (IF) <input type="checkbox"/> ANA (BLOT) <input type="checkbox"/> ANCA <input type="checkbox"/> ASMA <input type="checkbox"/> RF <input type="checkbox"/> RF (IgG, IgA, IgM) Buněčné testy <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> základní buněčné vyšetření (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+) <input type="checkbox"/> CD14+ HLADR+ <input type="checkbox"/> další CD znaky <input type="checkbox"/> HLA B27 <input type="checkbox"/> proliferační testy <input type="checkbox"/> bronchoalveolární laváž-BAL CD3+ CD4+ CD8+ Fagocytární testy <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> burst test <input type="checkbox"/> stanovení přítomnosti myeloperoxidázy Cirkul. imunokomplexy <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> CIK PEG <input type="checkbox"/> CIK C1q Imunoglobuliny <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgA <input type="checkbox"/> IgM <input type="checkbox"/> IgE 	Imunoglobuliny <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> IgD <input type="checkbox"/> podtřídy IgA (IgA1-IgA2) <input type="checkbox"/> podtřídy IgG (IgG1-IgG4) <input type="checkbox"/> kryoglobulin Komplementový systém <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> klasická cesta aktivace <input type="checkbox"/> alternativní cesta aktivace <input type="checkbox"/> C1 inhibitor kvantitativně <input type="checkbox"/> C1 inhibitor funkční test <input type="checkbox"/> C1q <input type="checkbox"/> C2 <input type="checkbox"/> C3 <input type="checkbox"/> C4 <input type="checkbox"/> C5 <input type="checkbox"/> MBL Proteiny akutní fáze <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> CRP <input type="checkbox"/> alfa-1-antitrypsin <input type="checkbox"/> alfa-2-makroglobulin <input type="checkbox"/> ceruloplasmin <input type="checkbox"/> orosomukoid <input type="checkbox"/> prealbumin <input type="checkbox"/> transferin

Vlastní zpracování vzorku na IF – 2 různé přístupy

Princip zpracování – viz. Slide č. 9

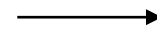
1. Zpracování manuálně

- Manuální zpracování provádí zdravotní laborantka
- Výhody:
 - Rychlejší zpracování v porovnání s automatickou metodou
- Nevýhody:
 - Možnost vzniku lidských chyb, např. záměna vzorku, vznik artefaktů nedodržením návodu



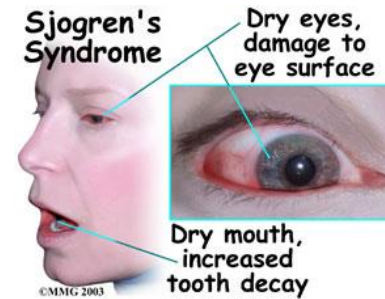
2. Zpracování automaticky – přístroj HELMED

- V současné době se vzhledem k narůstajícímu množství vzorků a snaze eliminovat lidskou chybu upřednostňuje automatické zpracování IF
- Výhody:
 - Eliminace lidských chyb
 - Redukce manuální práce
- Nevýhody:
 - Delší zpracování v porovnání s manuální metodou
 - Přístroj je náročnější na údržbu a zacházení



ANA (Anti Nuclear Antibodies)

- Velká skupina protilátek
- Váží se na různé antigeny v jádře (DNA, RNA, centromery, ...)
- Výskyt při různých autoimunitních onemocněních (systémový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, ...)



Fluorescenční obraz v mikroskopu může vypadat stejně nebo podobně u různých protilátek – pokud vidíme určitý obraz, **nevíme ještě, o jakou autoprotlátku se jedná** (na jaký antigen se váže), k jejímu bližšímu určení mohou pomoci jiné metody (ELISA, ImunoBlot)

ANA protilátky

- Jedná se o obsáhlou skupinu autoprotilátek, které jsou zaměřeny vůči různým jaderným strukturám (např. centromera, mitotický aparát, DNA, histony..)
- Výskyt u systémových autoimunitních onemocnění
- Jedná o nejčastěji stanovované protilátky pomocí IF → odečítá se 5-10 skel/den
- Substrátem pro stanovení ANA protilátek jsou Hep-2 buňky

- Podskupinou ANA jsou ENA protilátky – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (jedná se o takové antigeny jádra buněk, které mají vyšší Mr a lze je extrahovat → např. SSA, SSB, Jo-1, Scl-70...)
- ENA protilátky – stanovují se ELISOU/ImunoBlotem

ANA protilátky – ředění vzorků

- Stanovení ANA protilátek – sérum pacienta se vždy ředí v základu 1:80



První čtení - odečtení IF při ředění 1:80



Pokud je vzorek pozitivní, odečítající VŠ indikuje vyšetření opakovat druhý den s vyšším ředěním (1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) – ředění záleží na intenzitě fluorescence daného vzorku a vyžaduje zkušenosti odečítajícího



Po zpracování skel s vyšším ředěním následuje druhé čtení. Pokud je vzorek pozitivní i při ředění 1:1280 → výsledek se vydává jako „vyšší než 1280“

Výsledkový list- ANA

hlavička listu

Strana 1 z 2

Název pracoviště
06.04.2020 12:17:05

Název metody → Pracovní list **I_ANA**

Datum, kdy bylo vyšetření provedeno → Datum provedení: *7. 4. 2020*

Zpracoval: Jméno laborantky podpis

Vyhodnotil: Razítko VŠ + podpis

Údaje o použitých sklech ANA protilátky substrát Hep2 buňky

EUROIMMUN SLIDE HEP-2 1 x 10
CE LOT F191104AB +24+8°C IVD 2021-05-03

Sarže: _____
Exp: _____
Datum dodávky: *19. 2. 2020*

KONJUGÁT IgG
Rabbit Anti-Hu.IgG/FITC, F0202
č.s.20069312
Exp.31/05/2025

Jednotky: _____

Údaje o použitém konjugátu

Poloha kontrol/vzorků na skle

4019 S_ANA	4020 S_ANAT	4344 S_ANATYP	4087 S_CENTR	4343 S_ANAV
<i>HH</i> ✓				

1 Kontrola pozitivní

Vzorky pacientů + kontroly

Výsledky prvního odečítání skel

Výsledek titrace ANA

Typ fluorescence u pozitivních vzorků

Je přítomna fluorescence centromer?

Konečný výsledek po provedení dalších titrací vzorku

Výsledkový list- ANA - pokračování

	4019 S_ANA	4020 S_ANAT	4344 S_ANATYP	4087 S_CENTR	4343 S_ANAV
1	Kontrola pozitivní	+ H ✓			
2	Kontrola negativní	mg.			
3	Pacient 1	JG	[---] 3) 160 [---] 4) 320		(+ JG 1280)
4	Pacient 2	[---] _____	mg.		
5	Pacient 3	[01.03.19 negativní] _____			(+ JG 80)
6	Pacient 4	[---] _____	} mg.	[---] mg.	
7	Pacient 5	[30.12.19 negativní] _____			
8	Pacient 6	[---] _____			
9	Pacient 7	[---] _____	T 320 - 640	+ JGCHOT	
10	Pacient 8	[---] _____	mg.		
11	Pacient 9	[14.04.16 negativní] _____	T 160 - 320	+ JG	
12	Pacient 10	[---] _____	} mg.	[---] mg.	
13	Pacient 11	[07.11.19 negativní] _____			
14	Pacient 12	[18.10.12 negativní] _____			[18.10.12 negativní] mg.
15	Pacient 13	[---] _____			
16	Pacient 14	[13.09.18 160] _____			(+ JG 160)

Nejprve se odečítá pozitivní a negativní kontrola – zde kontroly vyšly v pořádku, proto lze pokračovat v odečítání pacientů

Pacient 1: První čtení pozitivní výsledek – jemně granulární fluorescence (JG) – provedeno ředění až do 1:1280 – stále pozitivní jemně granulární fluorescence

Pacient 2,4,5,6... výsledky jsou negativní

Pacient 7: Je pozitivní, provedeno ředění ANA 1:320 a 1:640, fluorescence smíšená (JGCHOT) = jemně granulární, zvýrazněný chromatin + ojedinělé tečky

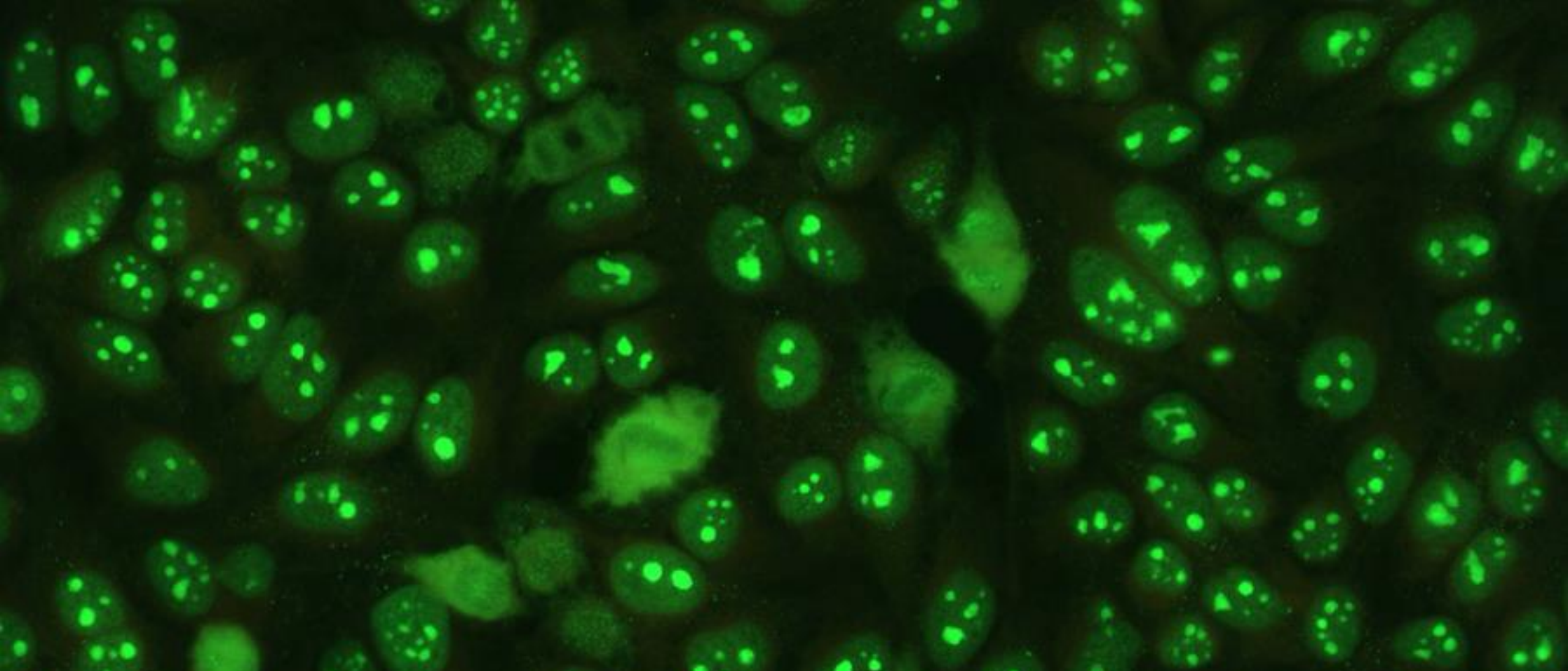
Typy fluorescence se popisují zkratkami, např:

- JG = jemně granulární fluorescence
- JGCHOT = smíšená fluorescence – jemně granulární, zvýrazněný chromatin + ojedinělé tečky
- H = homogenní fluorescence

Razítko + podpis odečítajícího VS



ANA – typ granulární, zrnitý (nemá Ch.d.,ENA)

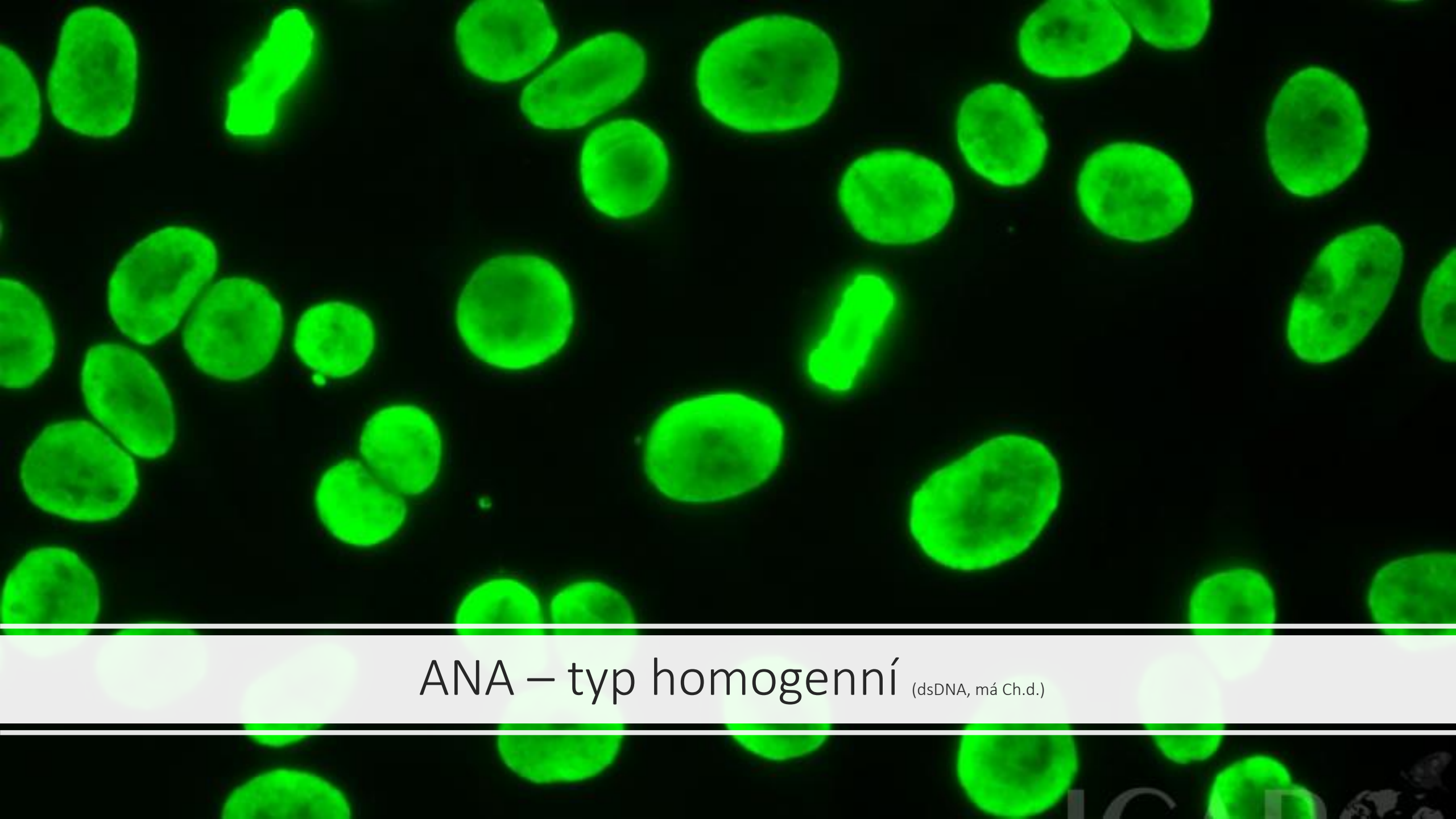


ANA – typ nukleolární (jadéřkový)





ANA – typ centromerický (CREST syndrom)

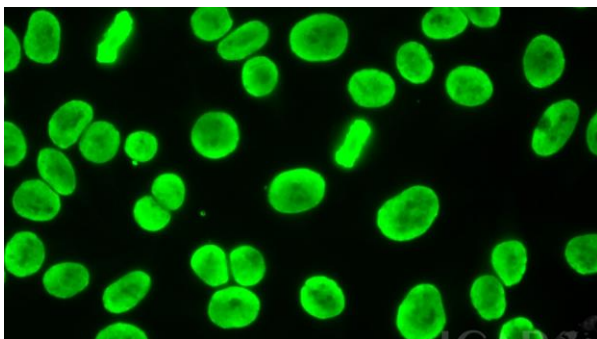
A fluorescence microscopy image showing numerous cells with bright green fluorescence against a black background. The cells are of various shapes, including circular and elongated forms. A white horizontal bar is overlaid at the bottom of the image, containing text.

ANA – typ homogenní (dsDNA, má Ch.d.)

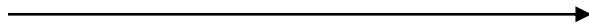
ANA – homogenní typ fluorescence

- U homogenního typu fluorescence svítí celé jádro Hep-2 buněk
- Nelze rozlišit, zda jsou přítomné autoprotiátky namířeny vůči dsDNA nebo proteinům asociovaným s DNA (histony apod.)
- Proto si laboratoř může v některých případech sama doordinovat další vyšetření → znovu provede IF takto pozitivních vzorků, ale s jiným substrátem – prvok *Crithidia luciliae*
- Pokud v prvokovi svítí pouze kinetoplast a jádro → jedná se o autoprotiátky proti dsDNA → typické pro **SLE** (systémový lupus erythematosus)

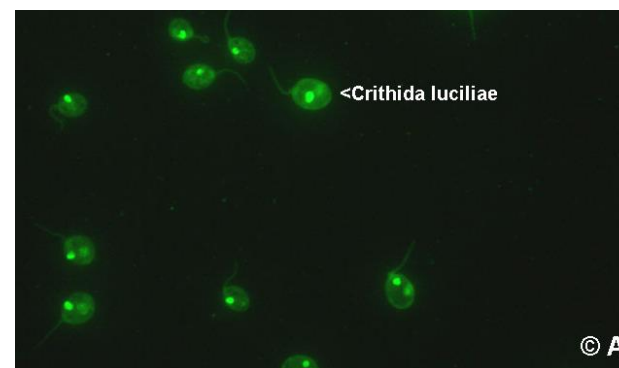
1. ANA protiátky – homogenní typ fluorescence




2. Sérum pacienta aplikováno na substrát *Crithidium luciliae*



3. Pokud je pozitivní kinetoplast a jádro → jedná se o protiátky proti dsDNA



A fluorescence microscopy image showing several Crithidia luciliae cells. The cells are stained with a green fluorescent dye, which highlights the dsDNA in the kinetoplast. The cells are scattered across the field of view, with some showing a clear, bright green spot in the center, indicating a positive result for dsDNA staining. The background is dark, making the green-stained cells stand out.

<dsDNA in the kinetoplast
positively stained

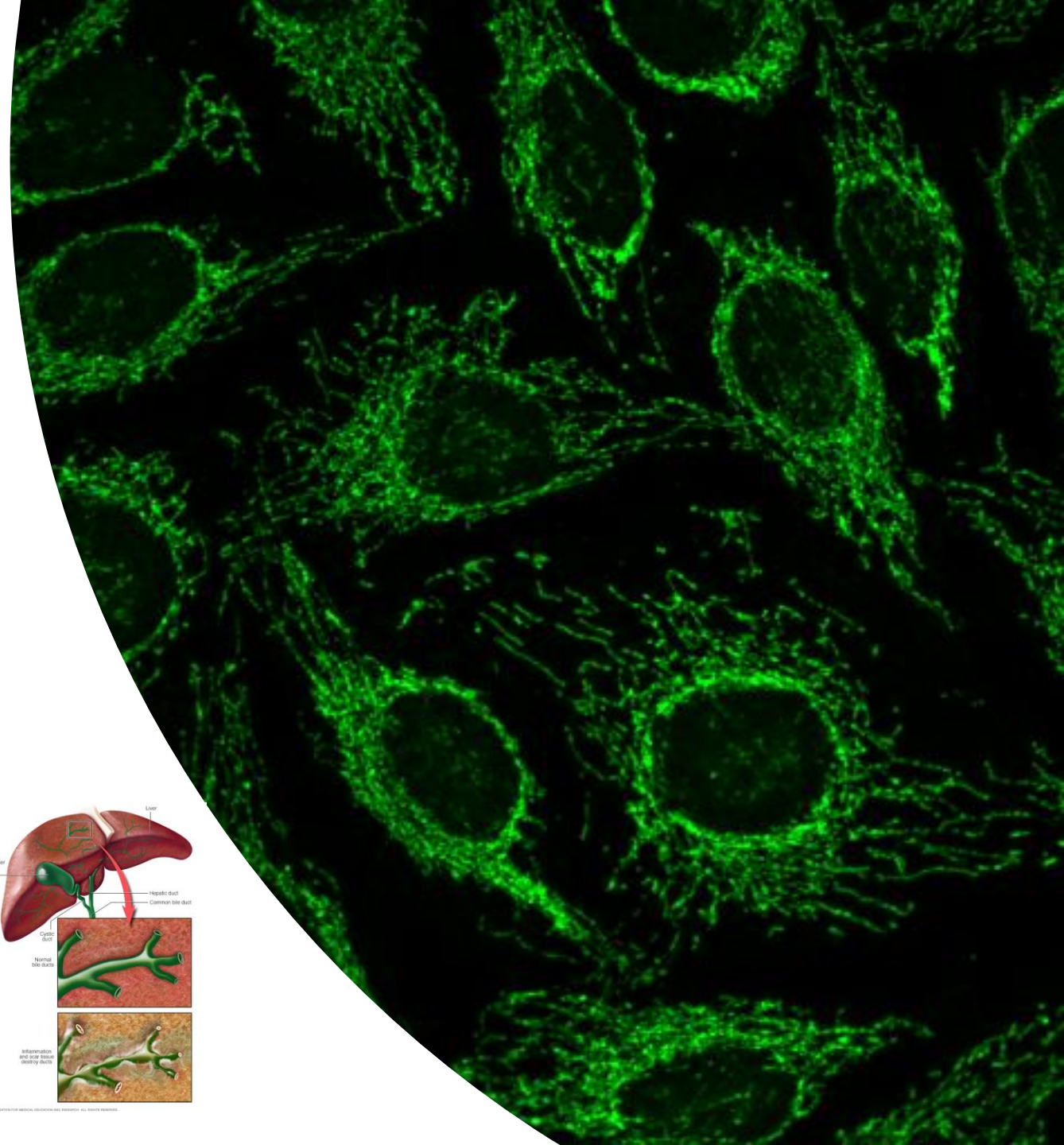
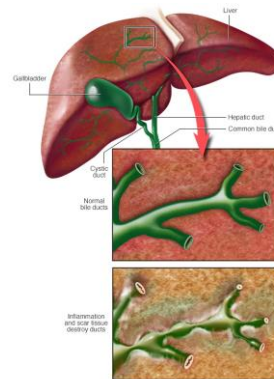
<Crithida luciliae

Prvok Crithidia luciliae – dsDNA neg/poz (↑specificita, ↓senzitivita)

Hep-2 buňky - kromě fluorescence
v jádře lze sledovat i fluorescenci
v cytoplasmě

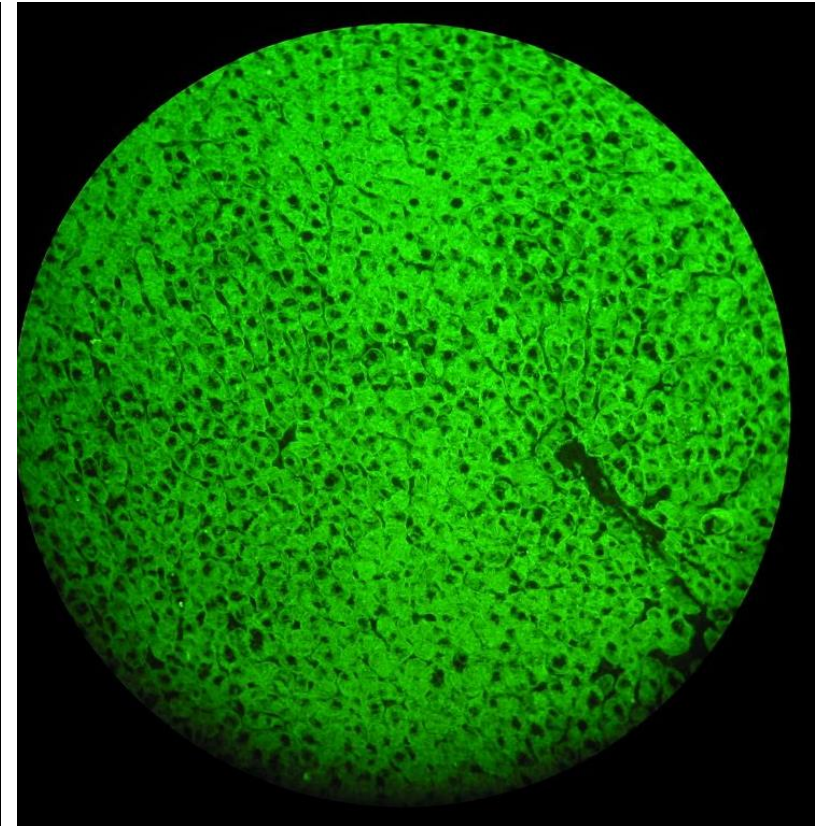
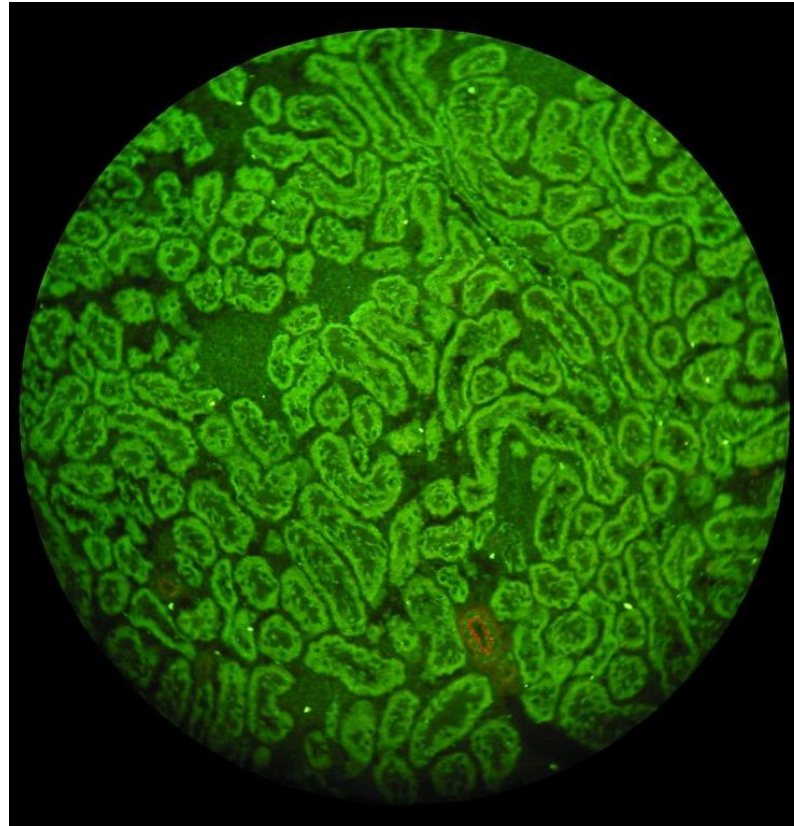
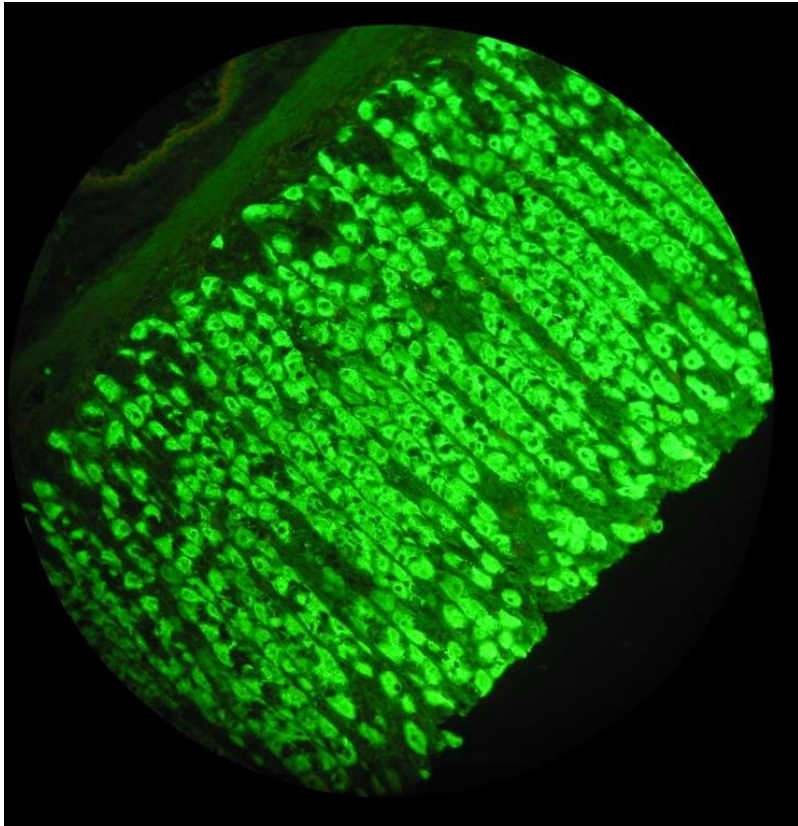
V cytoplasmě HEp2 buněk je možné
pozorovat i další typy fluorescence –
napr. **mitochondriální – AMA** (anti-
mitochondrial antibodies) – výskyt u
onemocnění **primární biliární cirhóza**

Ale hlavním substrátem pro
diagnostiku primární biliární cirhózy je
LKS (liver, kidney, stomach)!



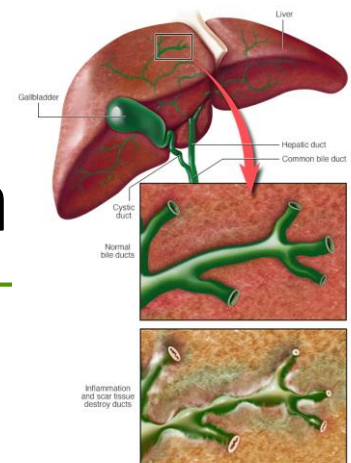
Substrát LKS

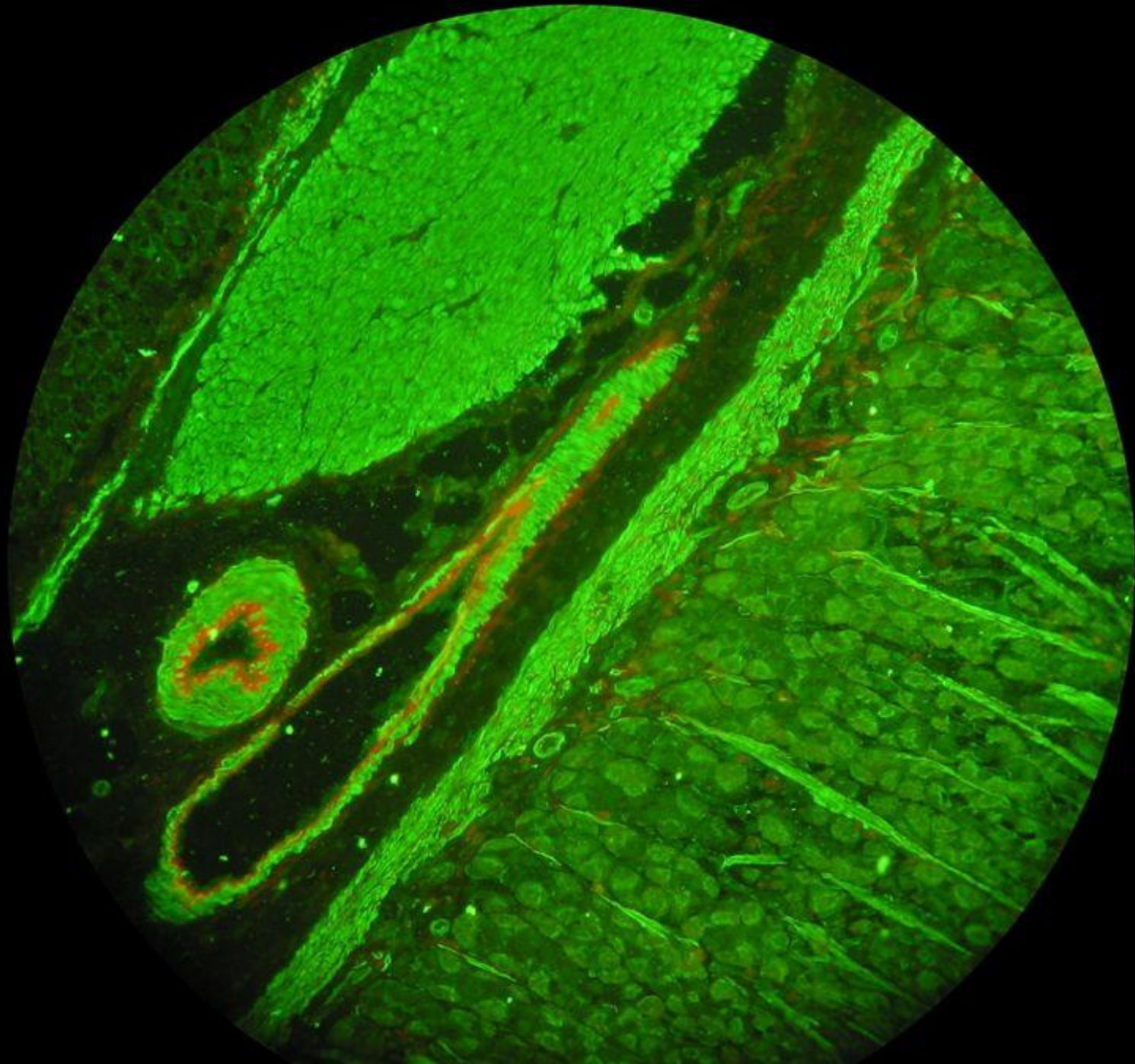
- Kombinace 3 krysích tkání
 - játra (Liver)
 - ledviny (Kidney)
 - žaludek (Stomach)
- Pozorujeme protilátky:
 - AMA (antimitochondriální) – primární biliární cirhóza
 - ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitní hepatitidy
 - GPC (proti parietálním buňkám žaludku) – prim. perniciózní anémie
 - RET (proti retikulinu) – celiakie (kontrola dodržování diety), mohou být pozitivní i u Crohnovy choroby



AMA (antimitochondriální Ab) – křysí žaludek, ledviny, játra

Mitochondrie jsou orgány obsažené v buňkách všech tkání – proto při přítomnosti AMA protilátek bude viditelná pozitivita ve všech třech typech tkáně.





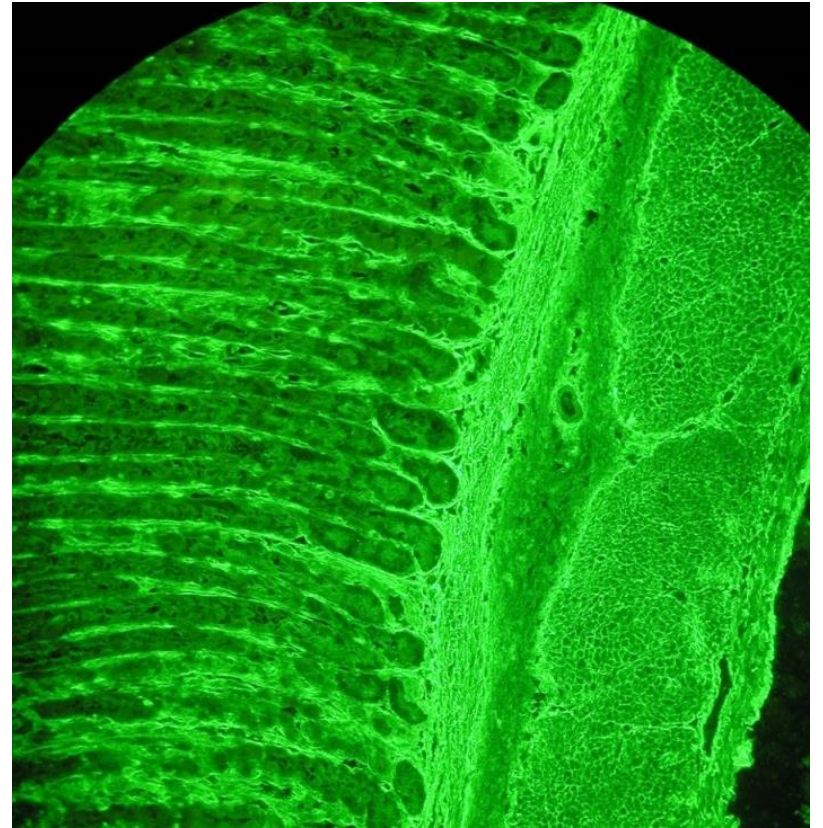
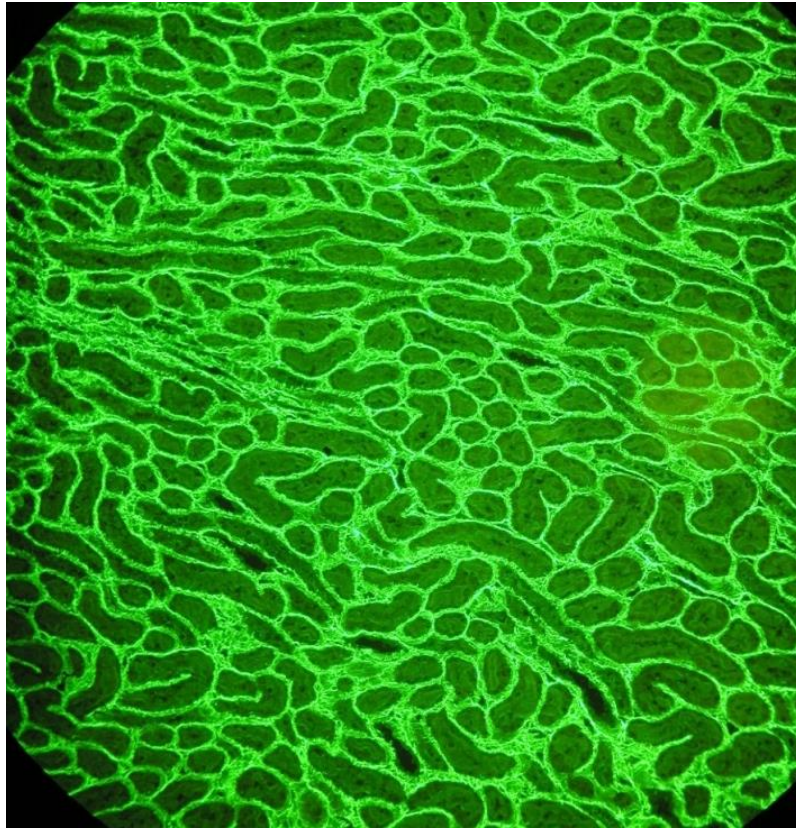
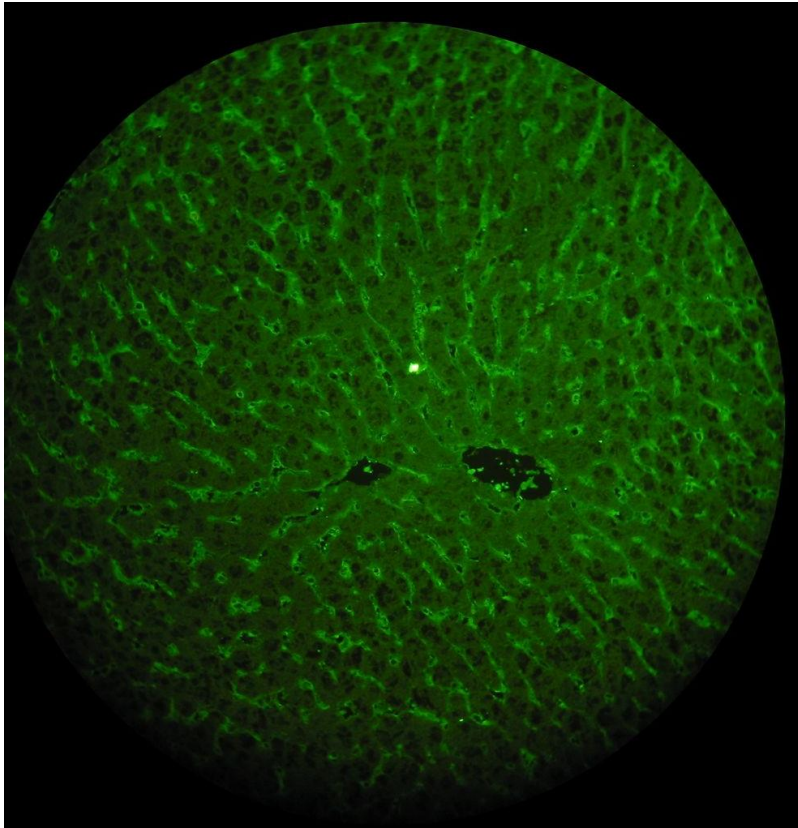
ASMA

(proti hladkému svalu)

– krysí žaludek

Při pozitivě ASMA svítí pouze struktury obsahující hladkou svalovinu, např.

- Cévy
- Stěna žaludku



RET (proti retikulinu) – krysí žaludek, ledviny, játra

Retikulin je mezibuněčnou složkou mezenchymální tkáně se značným množstvím antigenních determinant, protilátky jsou většinou ve třídě IgG, eventuálně IgA.

GPC = anti-Gastric Parietal Cell antibody

Protilátky proti parietálním buňkám žaludku

- Výskyt u **perniciózní anemie**

- Vznik protilátek proti **parietálním buňkám žaludku**

(mohou se tvořit i autoprotiátky proti vnitřnímu faktoru, který parietální buňky produkují a který je nezbytný pro transport vitamínu B12 přes střevní sliznici, popř autoprotiátky, které blokují komplex vnitřní faktor+vitamin B12)

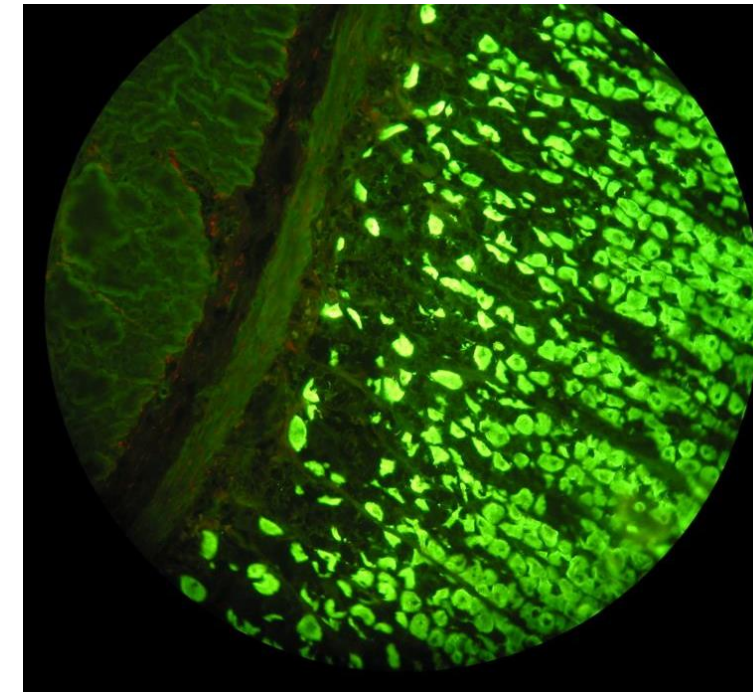
- Důsledek:

- Nedostatek vitamínu B12 (=kobalamin), který je nutný pro syntézu DNA
 - Rozvíjí se megaloblastová anemie (viz. učebnice hematologie)
 - Klinické příznaky
 - Typické postižení jazyka – „Vyhlazený“ jazyk
 - Subikterus
 - Symetrické parestezie končetin
 - Nechutenství, průjemy

- Perniciózní anemie bývá spojena s atrofickou gastritidou, častějším vývojem rakoviny žaludku a taktéž kolorektálního karcinomu

- Léčba – suplementace chybějících vitaminů – B12+kyselina listová

Substrát – krysí žaludek



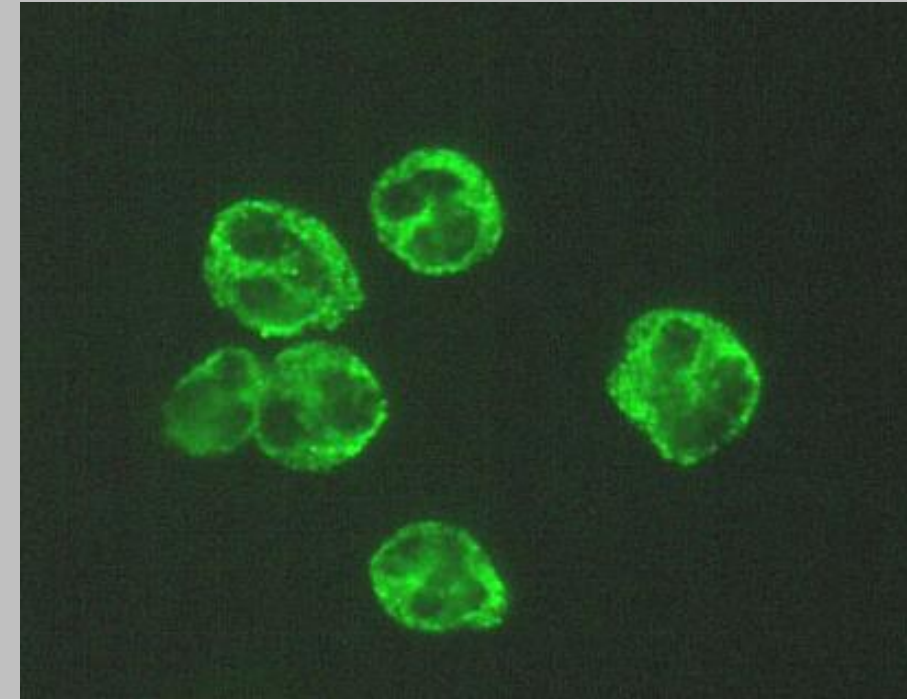
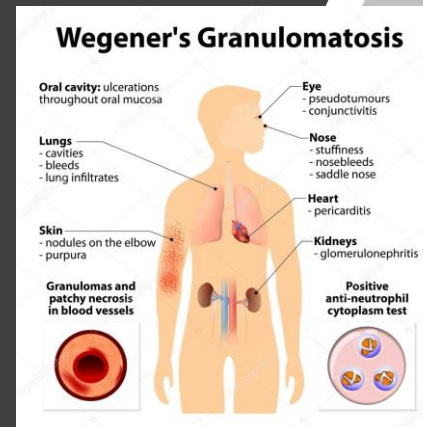
ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilů)

- Skupina protilátek proti některým vnitřním cytoplazmatickým strukturám neutrofilů (**myeloperoxidáza, proteináza 3**, elastáza, laktoferin...)
- Vyskytují se obecně u **autoimunitních vaskulitid**
- Existuje několik typů positivity ANCA imunofluorescence (IF):
 - **pANCA** – perinukleární IF → antigenem je myeloperoxidáza (MPO) – **polyarteritidy**
 - **cANCA** – cytoplazmatická IF → antigenem je proteináza 3 (PR3) – **Wegenerova granulomatóza**
 - **aANCA** – atypická IF – různé antigeny (elastáza, lysozym...) - má vazbu na ulcerózní kolitidu
- Substrát pro IF: ethanolem fixované neutrofilní granulocyty
- Kromě IF se pANCA a cANCA stanovují také ELISOU

ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilů)

pANCA – perinukleární – antigenem je MPO (myeloperoxidáza)

Atypická ANCA – různé antigeny (elastáza, lysozym, katepsin)



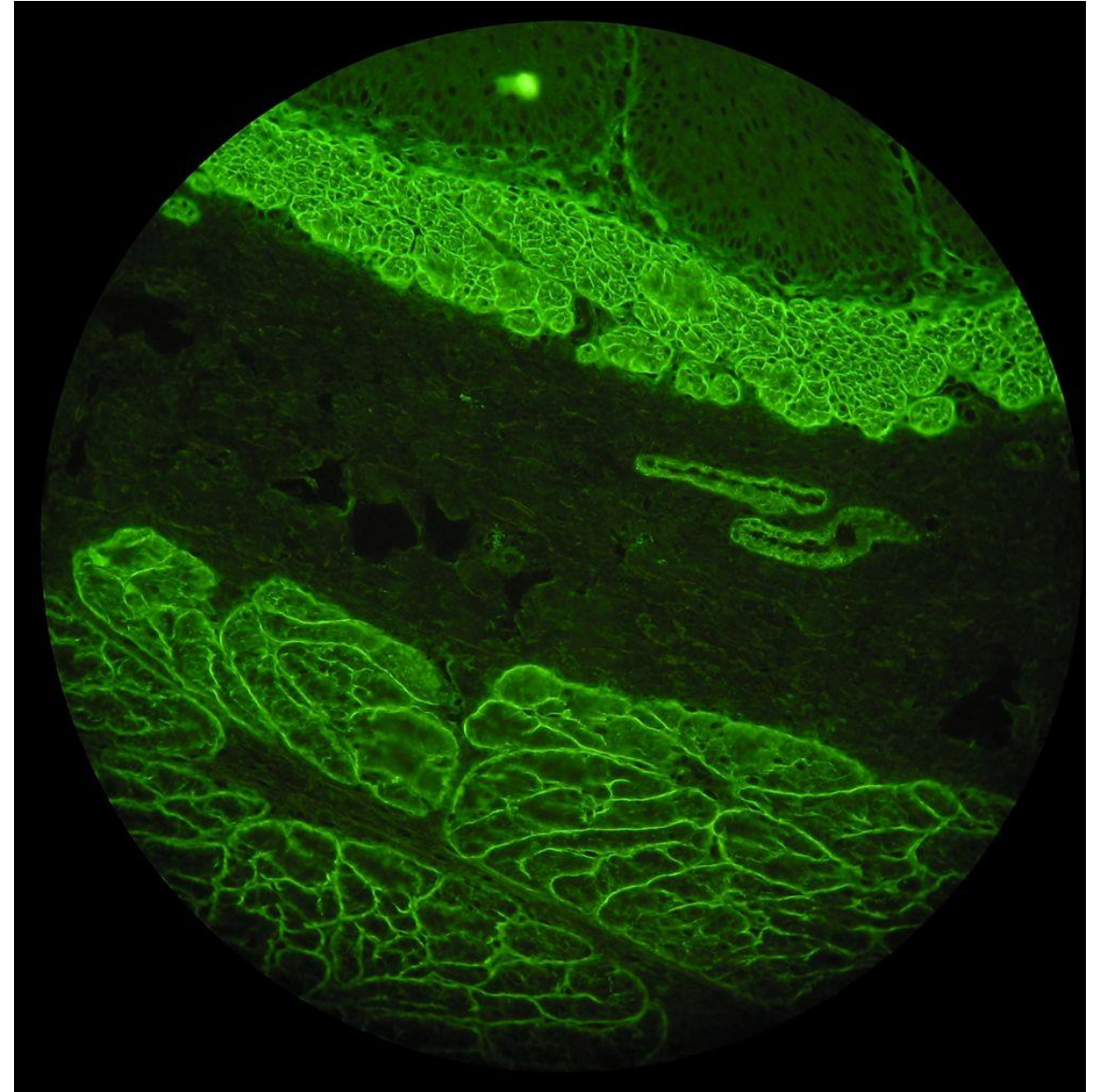
cANCA – cytoplazmatická – antigenem je PR3 (proteináza 3) – typická pro Wegenerovu granulomatózu s polyangitidou
pozitivní = vážná diagnóza = okamžite hlásit

Zvláštní postavení – ASCA protilátky

- Nejedná se o autoprotiátky (nejsou namířeny proti strukturám tělu vlastním)
- Jedná o protilátky proti kvasince *Saccharomyces cerevisiae*
- Stanovení **ASCA** slouží k diferenciaciální diagnostice nespecifických střevních zánětů
 - **Crohnova choroba – ASCA pozitivní až v 81% případů** (+ pANCA pouze 18%)
 - Ulcerózní kolitida – ASCA pozitivní jen v 22% případů (+ pANCA až 70%)
- ASCA protilátky se stanovují ELISOU, ne imunofluorescencí

EMA (protilátky proti endomysiu)

- Na řezu opičího jícnu
- Ag je TTG (tkáňová transglutamináza) (též lze stanovit ELISOU)
- Výskyt u *celiakie* (hlavně IgA)



VÝSLEDKY -Pracovní list - EMA diagnostika celiakie - screening

Hlavička pracovního listu

Strana 1 z 2

06.03.2020 13:08:43

Název pracoviště, kde bylo vyšetření provedeno

Název metody → Pracovní list

Datum provedení → Datum provedení: 9.3.2020

Ústav klinické imunologie a alergologie
Oddělení laboratorní imunologie

Zpracoval: Jméno laborantky, podpis

Vyhodnotil: Jméno VŠ (razítko, podpis)

Údaje o použitých sklech → Šarže: EUROIMMUN SLIDE 1 x 10
Substrát na skle – u EMA řezy opičího jícnu → Oesophagus Prim. (IgA)

Údaje o použité pozitivní kontrole → 4123 S_EMA
Pozitivní kontrola EMA
02819 EMA IgA+
Testováno: 19.2.2019 exp.4 /2020

KONJUGÁT IgA
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/FITC,
DAKO, F0204
č.š. 20062671
Exp.10/2024

Jednotky: _____

Údaje o použitém konjugátu

- Zde použit konjugát ve třídě **IgA** (Ve **slizniční imunitě** hraje třída protilátek IgA dominantní roli)
- Lze stanovit i **IgG** – pokud má pacient diagnostikovaný IgA deficit

Pracovní list –EMA

Výsledky pacientů

Pozitivní kontrola je nezbytnou součástí vyšetření

- musí být provedena s každou analytickou sérií vzorků
- Odečítá se jako první
- Pokud kontrola vyjde, lze pokračovat v odečítání pacientů
- Pokud pozitivní kontrola nevyjde, nelze odečíst vzorky → nutné zjistit proč kontrola nevyšla, přijmout nápravná opatření

Vzorky pacientů

- Pokud byl pacient vyšetřován již dříve, je u něj informace o výsledku posledního vyšetření + datum, kdy bylo toto vyšetření provedeno
- Pokud je pacient nový, tato informace chybí
- V této sérii vzorků je na EMA pozitivní pouze pacient 10

Odborný dohled

- VŠ nelékař bez atestace může odečítat pouze pod odborným dohledem
- Odborný dohled – lékař s atestací → kontroluje správnost odečtených výsledků
- Pokud je vše v pořádku, správnost výsledků stvrdí lékař s atestací razítkem „odborný dohled“

+

svým osobním razítkem a podpisem

	4123 S_EMA Pozitivní kontrola EMA 02819 EMA IgA+ Testováno: 19.2.2019 exp.4 /2020	4124 S_EMAG	4216 S_IGAP
1	Kontrola pozitivní		
2	Pacient 1		
3	Pacient 2		
4	Pacient 3	[22.11.18 negativní]	
5	Pacient 4		
6	Pacient 5	[26.11.18 negativní]	
7	Pacient 6	[11.12.17 negativní]	
8	Pacient 7		
9	Pacient 8		
10	Pacient 9		
11	Pacient 10	Pacient 10 na skle 7 je EMA pozitivní	
12	Pacient 11		
13	Pacient 12		
14	Pacient 13		
15	Pacient 14		
16	Pacient 15		
17	Pacient 16		

Sklo číslo 6

Sklo číslo 7

odečítající VŠ pozitivní kontrola je pozitivní

Pacienti na skle č. 6 byli EMA negativní

neg

neg

+

ODBORNÝ DOHLED

Razítko + podpis
VŠ s atestací
odborný dohled

Diagnostika celiakie

- 1) Stanovení celkového IgA
- 2) Nepřímá imunofluorescence – EMA – protilátky proti endomysiu → jedná se o nespecifické vyšetření – odhalí autoprotiátky proti určité tkáňové struktuře – zde endomysium
- 3) Zda se jedná konkrétně o protilátky proti tkáňové transglutamináze – anti-TTG (třída IgA, popř. IgG u nemocných s IgA deficitem) – ELISA

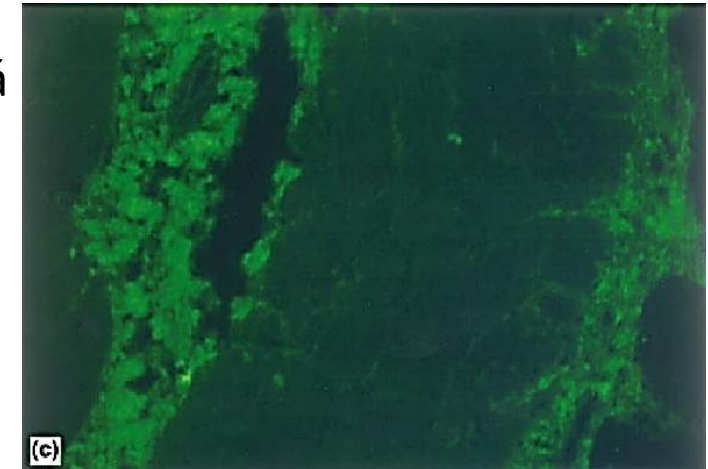
Imunologická laboratoř provádí pouze screening celiakie



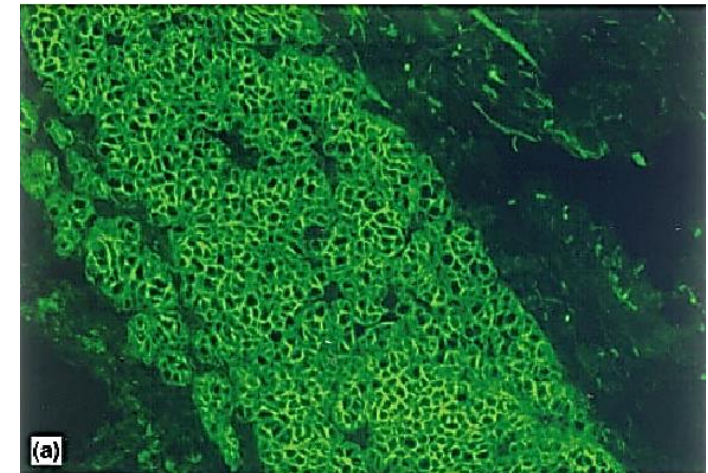
4) Definitivní potvrzení celiakie: gastroenterolog

- Enterobiopsie – odběr vzorků tkáně tenkého střeva na histologii →
 - Histologie - atrofie klků tenkého střeva
 - Histochemie - deficit enzymů kartáčového lemu enterocytů
 - **Změny na sliznici pouze u aktivní a tiché formy celiakie**
 - **Latentní forma** celiakie má pozitivní sérologii avšak normální architekturu sliznice!

Negativní obraz



Pozitivní obraz



Imunofluorescence

- Zlatý standard
- Na prvním místě– každá imunologická laboratoř by měla poskytovat stanovení autoprotilátek IF metodou
- Kombinace s ELISA + ImunoBlot
- Interpretace výsledků:
 - záleží na typu
 - pozitivní/negativní nebo titr Ab
 - **Pozor** – hladiny autoprotilátek narůstají s **věkem** (zvýšené hladiny tedy nemusejí nutně znamenat autoimunitní onemocnění)
 - Avšak u dětí jsou zvýšené hladiny patologické vždy

Imunofluorescence

- Popis vzorků + sklíčka
- Pracovní list – seznam pacientů → zápis výsledků
- Přepis výsledků do systému (LIS/NIS)

Při zpracování IF se mohou objevit problémy...

1) Když nevyjdou kontroly

- Vidíme fluorescenci v negativní kontrole – nespecifická vazba konjugátu, špatné promytí skel
- Nevidíme fluorescenci v pozitivní kontrole – expirovaný konjugát, nevhodně skladovaný konjugát (např. na světle), popř. zapomenutá zpracovaná skla na světle (došlo k „vysvícení“ fluorochromu - bleaching)
- Pokud kontroly nevyjdou, nelze odečíst vzorky pacientů
- Problém je vždy potřeba objasnit a přijmout nápravná opatření

2) Výskyt artefaktů

- Stárnutí reagensů – např. v dlouho skladovaném montovacím médiu – glycerinu- se tvoří krystaly, které ve světle mikroskopu odrážejí světlo a na řezu jasně svítí → obraz připomíná „hvězdné nebe“ → doporučením je vždy vzít nové montovací médium
- Prachové částice

Kvalifikace k odečítání imunofluorescencí

- Samostatně odečítat imunofluorescence může pouze vysokoškolský pracovník (min. vzdělání – Mgr. v přírodních vědách = VŠ bez atestace)
- VŠ bez atestace – min 2 roky se učí odečítat IF pod dohledem někoho s atestací (=paralerní čtení)
→ na výsledcích hodnocených pracovníkem bez atestace musí být jasně viditelné razítko „odborný dohled“, za správnost výsledků ručí VŠ s atestací
- 5 let trvá složení magisterské atestace
- Po splnění těchto podmínek může VŠ odečítat IF sám

Pozn:

Odečítání imunofluorescencí je velmi náročné, odečítající musí velmi dobře znát anatomii používaných tkání (substrátů) a buněk, musí dobře znát, jaké typy fluorescence se u jednotlivých tkání a buněčných suspenzí mohou vyskytnout a také musí vždy brát v potaz fluorescenční pozadí preparátů, výskyt artefaktů (nečistoty, krystaly...) a rovněž musí brát ohled na věk pacienta (s vyšším věkem narůstají hladiny autoprotilátek, aniž by starší lidé měli jakékoli klinické příznaky autoimunitních onemocnění).

Kontroly kvality IF

- Odečítající VŠ jsou pravidelně podrobováni kontrolám – hodnotí se, zda jsou skla správně odečítána
- Interní kontroly kvality – každý měsíc probíhá kontrolní čtení
- Externí kontroly kvality – SEKK
 - Organizátoři SEKKu do laboratoří zasílají anonymní séra
 - Laboratoř sérum nasadí na skla, odečte a výsledky zašle organizátorovi
 - Organizátor výsledky zhodnotí a laboratoři zašle výsledek + jak si daná laboratoř vedla v porovnání s jinými laboratořemi
 - Pokud při kontrolách došlo k chybnému odečtení skel, musí laboratoř přijmout nápravná opatření