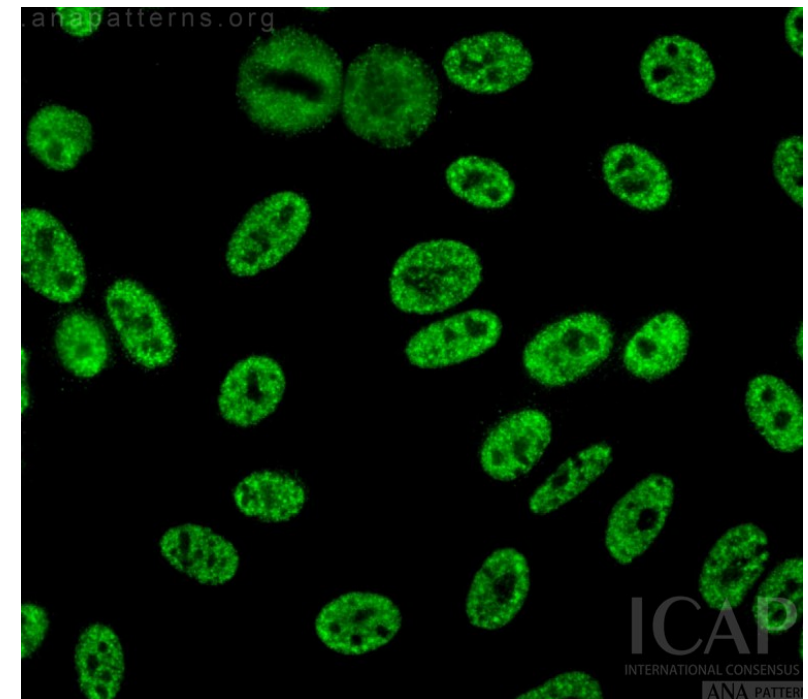




Imunofluorescence

diagnostika autoimunitních onemocnění

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



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

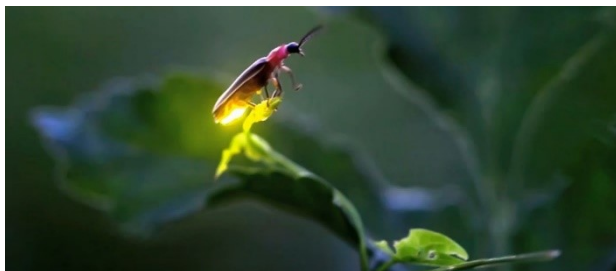
Fluorescence

- Luminiscence

Jev, při kterém látka emituje záření po absorpci energie - 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

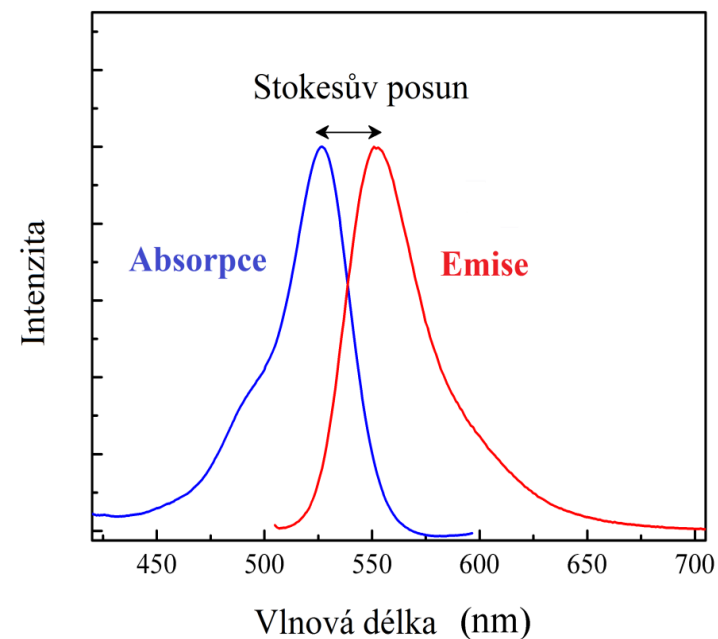
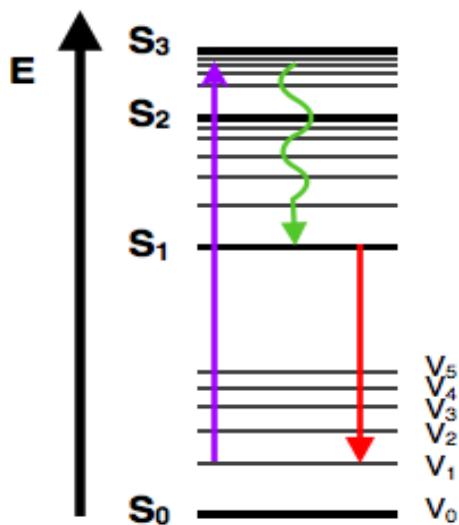
emise záření krátce po excitaci (10^{-8} až 10^{-5} s)

Fosforescence

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

Fluorescence

- Látka po absorpci excitačního záření uvolňuje emisní záření o delší vlnové délce (nižší energii) – tento jev se nazývá **Stokesův posun**
- Při návratu elektronů do základní hladiny se část energie **transformuje** do jiných, nefluorescenčních procesů (uvolnění tepla, rezonanční přenos energie na okolní molekuly...)



Imunofluorescence (IF)

využití fluorochromem značených protilátek

➤ Přímá IF

Slouží k detekci **antigenů** – vazba konjugátu přímo na antigen

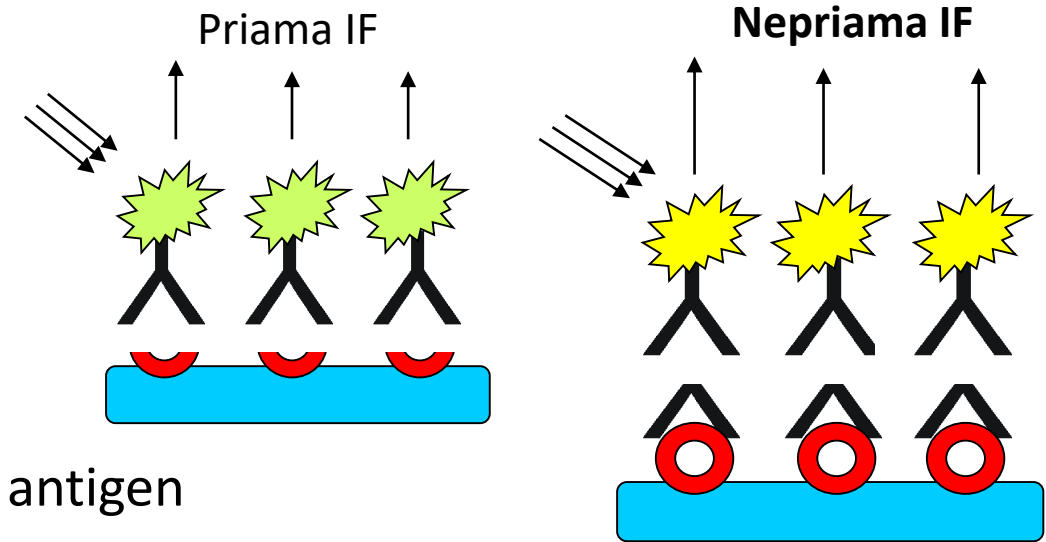
Využití: histologie – prokázání antigenu ve tkáni
mikrobiologie – rychlá detekce patogenů v biologickém materiálu

➤ Nepřímá IF

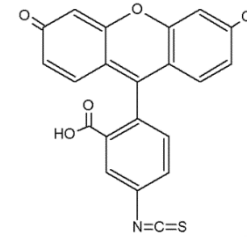
Používá se k detekci **protilátek** v séru → vazba protilátek a konjugátu ve 2 krocích:

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



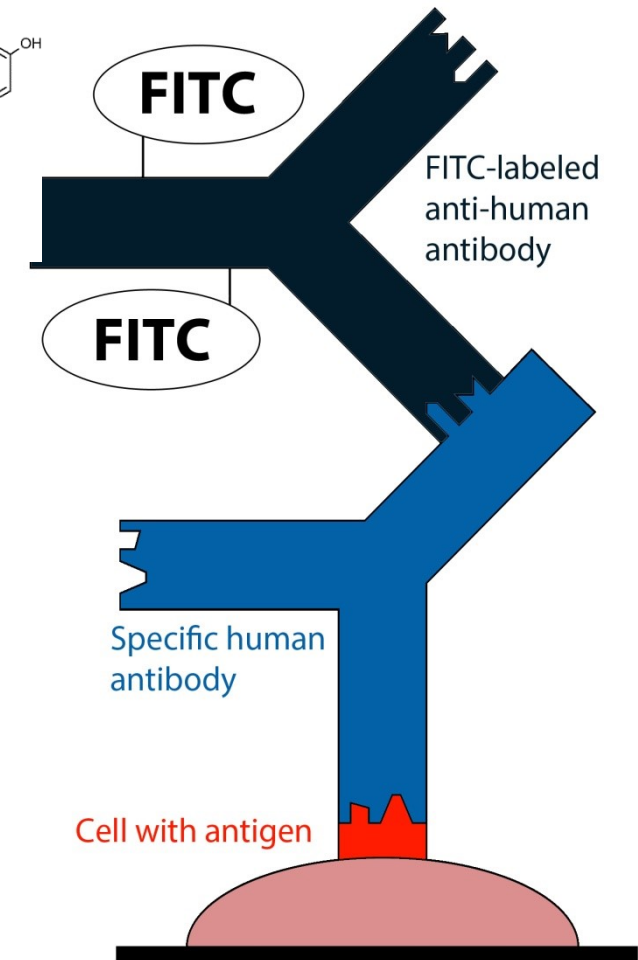
Konjugát



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

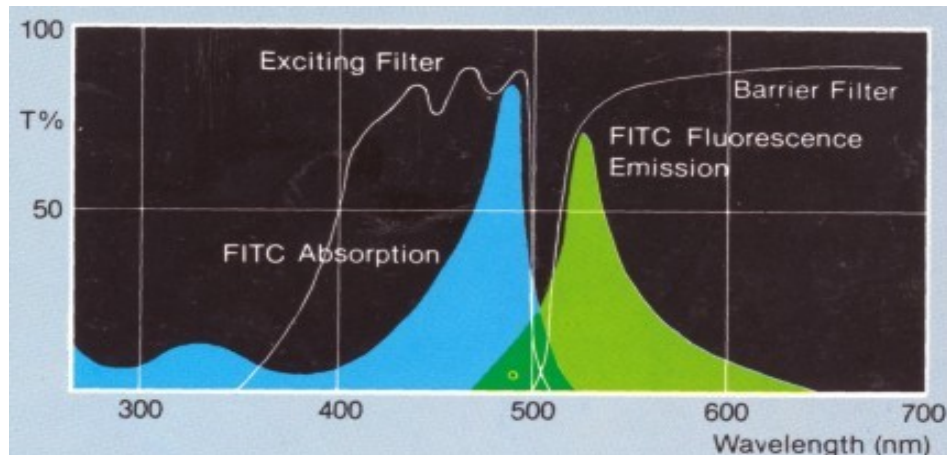
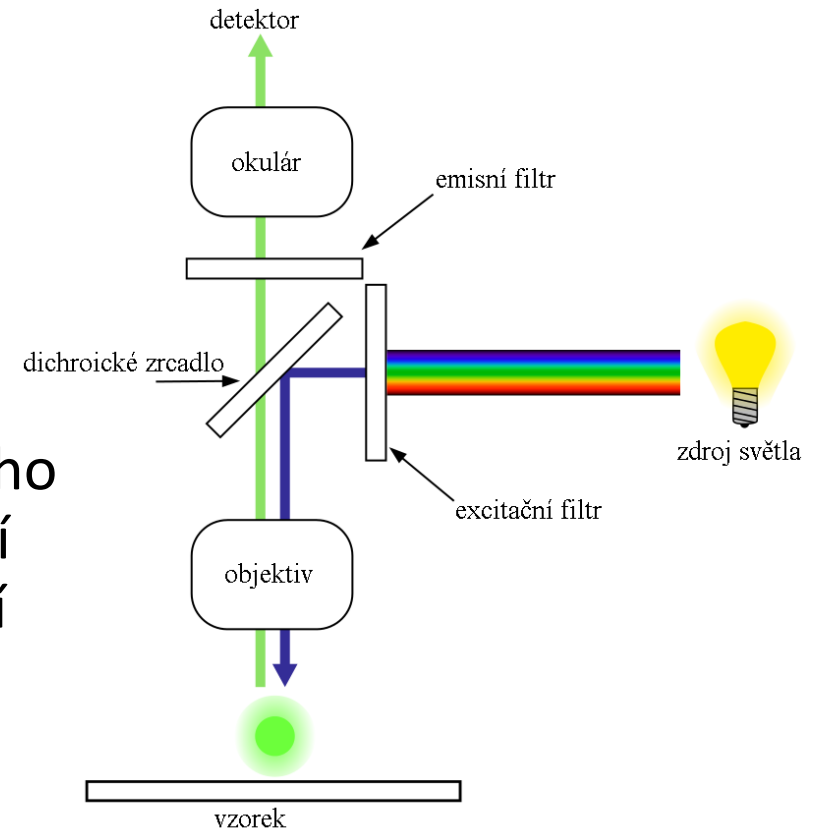
excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (zelené světlo)

- 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)



Fluorescenční mikroskop

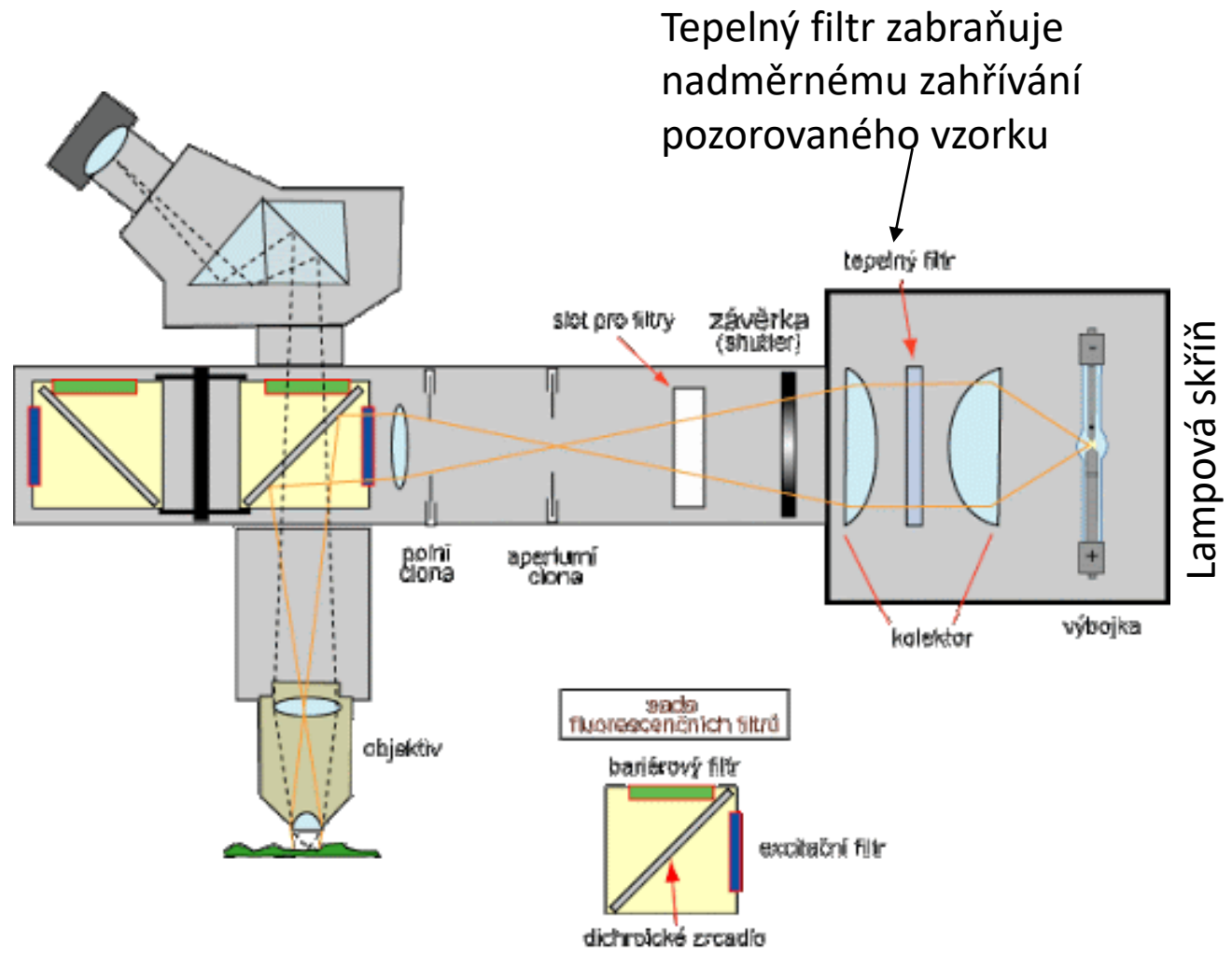
- Zdroj světla – rtuťová výbojka, **LED dioda**
- Excitační filtr – propouští pouze část spektra potřebného pro excitaci fluorochromu a zabraňuje přechodu záření v oblasti emisní vlnové délky, která by vytvářela pozadí
- Emisní (bariérový) filtr – propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu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



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

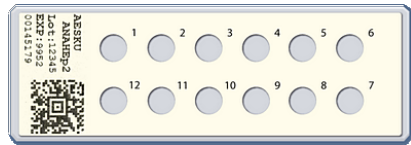
Součástí moderních fluorescenčních mikroskopů je také počítač s monitorem

Schéma fluorescenčního mikroskopu



Základní princip imunofluorescence (IF) – detekce autoantilát

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

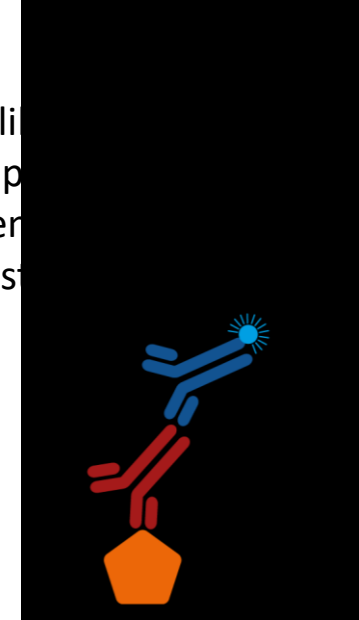
3. Pokud autoantitělka je přítomen v antigenní tkáni (řez tkáně)



4. Promytí skel v PBS+TWEEN – 5 min



5. Aplikace fluorescenčního antitělka, je značeného fluorescenčním barvivem (FITC) – nejčastěji zeleně

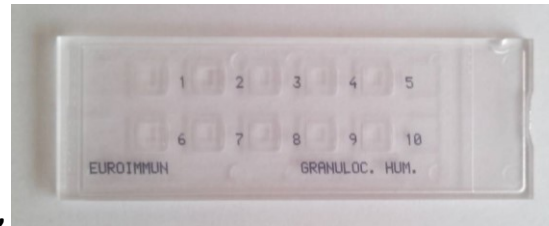


6. Inkubace 30 min v temnu



7. Promytí skel v PBS+TWEEN – 5 min

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



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

10. Skla jsou připravena k odečtení na mikroskopu



Vlastní zpracování vzorku na IF – 2 různé přístupy

Princip zpracování – viz. Slide č. 6

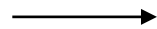
1. Zpracování manuálně

- 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



Imunofluorescence



Antigenní substráty používané při nepřímé IF

- **Buňky HEp2** (Human Epithelial) – detekce **ANA** (anti-nukleární protilátky)
 - 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** (autoprotilátek proti cytoplazmě neutrofilů)
- **Crithidia luciliae** – prvok, detekce protilátek proti **dsDNA**
- **Opičí jícen** – detekce **EMA** (protilátky proti endomysiu)
- **LKS** (liver, kidney, stomach) – detekce **AMA** (anti-mitochondriální Ab), **ASMA** (Ab proti hladkému svalu), **GPC** (gastic parietal cells), **RET** (Ab proti retikulínu) ...
 - kombinace 3 krysích tkání

Laboratorní postup při podezření na autoimunitní onemocnění

- Celý proces začíná v ordinaci lékaře
 - Ordinuje vyšetření na autoprotiilátky – 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		
<p>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</p>		
<p>Autoprotiilátky proti:</p> <ul style="list-style-type: none"> B2-GP1 centromera citruinované proteiny (CCP) ds-DNA endomysium (EMA) ENA (screening) SS-A(Ro) SS-B(La) Sci-70 Sm/RNP Jo-1 fosfolipidy (AFL IgG, IgM) GAD, IA-2 GBM GPC histony kardiolipin (ACLA IgG, IgM) kardiolipin (ACLA IgA) LC-1 LKM-1 mitochondrie (AMA) mutovaný citruinovaný vimentin (MCV) PLA2 receptor (APLAR) nukleosomy retikulin (IgG, IgA) SLA štitná žláza (TG, TPO) tkáňová transglutamináza (TTG) U1 RNP protiilátky proti IgA 	<p>Autoprotiilátky:</p> <ul style="list-style-type: none"> ANA (IF) ANA (BLOT) ANCA ASMA RF RF (IgG, IgA, IgM) <p>Buněčné testy</p> <ul style="list-style-type: none"> základní buněčné vyšetření (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+) další CD znaky HLA B27 proliferační testy bronchoalveolární laváž-BAL CD3+ CD4+ CD8+ <p>Fagocytární testy</p> <ul style="list-style-type: none"> burst test stanovení přítomnosti myeloperoxidázy <p>Cirkul. imunokomplexy</p> <ul style="list-style-type: none"> CIK PEG CIK C1q <p>Imunoglobuliny</p> <ul style="list-style-type: none"> IgG IgA IgM IgE 	<p>Imunoglobuliny</p> <ul style="list-style-type: none"> IgD podtřídy IgA (IgA1-IgA2) podtřídy IgG (IgG1-IgG4) kryoglobulin <p>Komplementový systém</p> <ul style="list-style-type: none"> klasická cesta aktivace alternativní cesta aktivace C1 inhibitor kvantitativně C1 inhibitor funkční test C1q C2 C3 C4 C5 MBL <p>Proteiny akutní fáze</p> <ul style="list-style-type: none"> CRP alfa-1-antitrypsin alfa-2-makroglobulin ceruloplasmin orosomukoid prealbumin transferin

Další metody vyšetření autoprotilátek – přehled

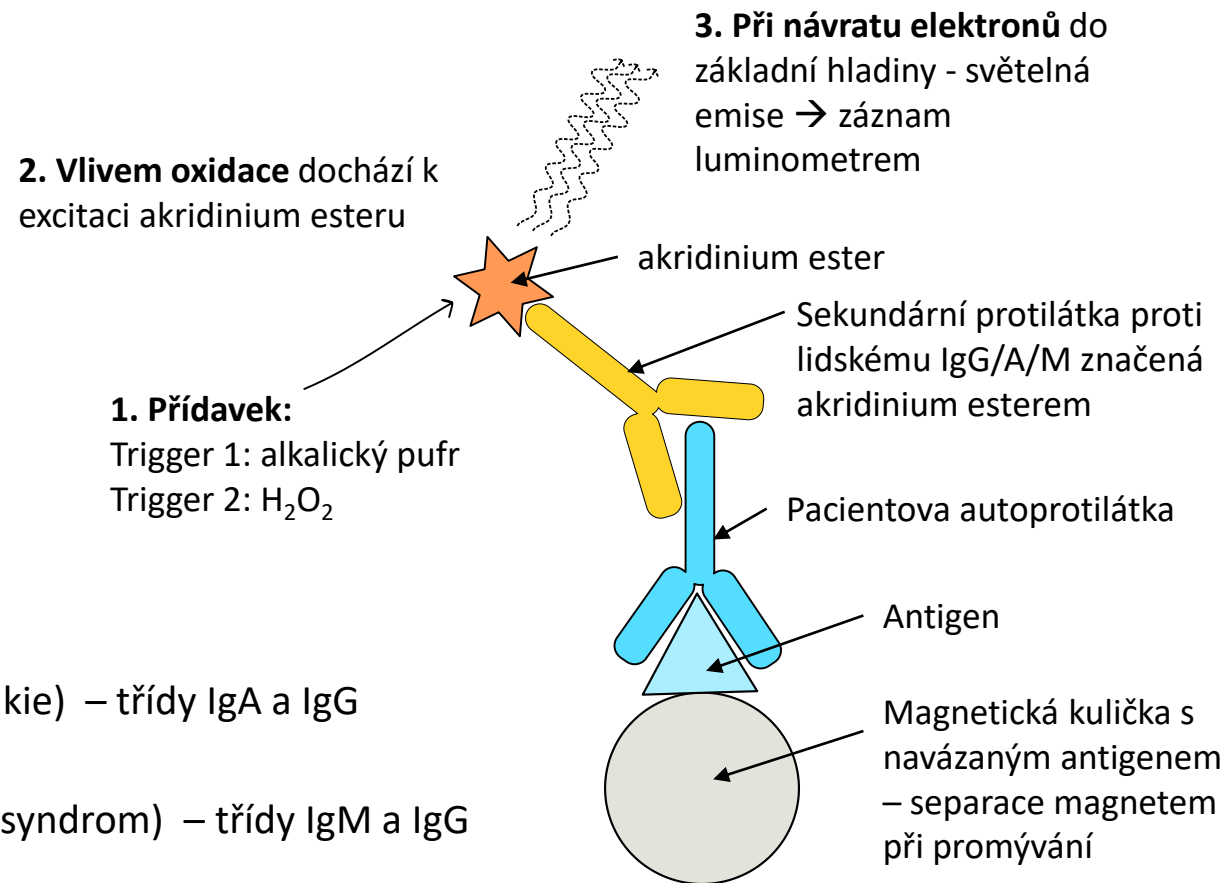
platí pro pracoviště ÚKIA FNUSA

1. **Imunofluorescence** – samostatná přednáška
2. Přístrojová ELISA – analyzátor Alegria nebo manuální ELISA
3. Chemiluminiscence – analyzátor Isys
4. Enzymově zesílená chemiluminiscence – **analyzátor Immulite** - samostatná přednáška (**protlátky proti štítné žláze**)
5. Immunoblot – samostatná přednáška



Analyzátor Isys

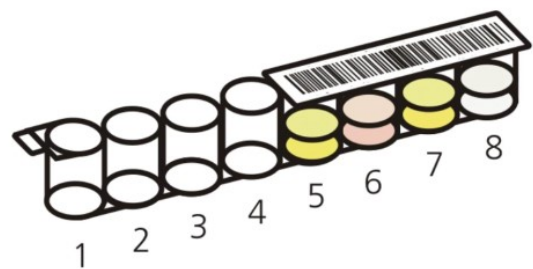
- Princip – **chemiluminiscence**
- Pevná fáze – **magnetické kuličky**
- Měření světelné emise která vzniká chemickou reakcí
- Extrémní citlivost
- Signál úměrný koncentraci auto-Ab ve vzorku
- V naší laboratoři:
 - **Stanovení ENA** (screening + jednotlivé antigeny)
 - TTG (protilátky proti tkáňové transglutamináze – celiakie) – třídy IgA a IgG
 - anti-dsDNA – třída IgG (systémový lupus - SLE)
 - ACLA – protilátky proti kardiolipinu (antifosfolipidový syndrom) – třídy IgM a IgG





Analyzátor Alegria

- Princip – **ELISA na stripech** – stanovení **autoprotilátek**



Jamka 1 a 2: prázdné, určené k ředění vzorku

Jamka 3 a 4: pokryté antigenem

Jamka 5: pozitivní kontrola (obsahuje hledanou autoprotilátku)

Jamka 6: křenovou peroxidázou označená anti-lidská IgM/G/A

Jamka 7: ředící pufr

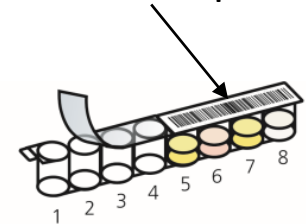
Jamka 8: TMB substrát (tetra-methyl-benzidin)

- Stačí pouze odtrhnout alobal z prvních 4 jamek a do první z nich napipetovat pacientovo sérum (10ul) → analyzátor provede ELISU sám

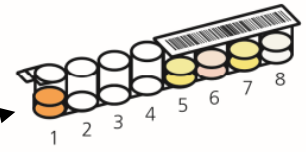
- Nevýhoda – v porovnání s ruční ELISOU drahé

Čárový kód – identifikace stripu

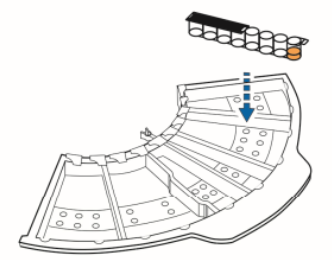
1



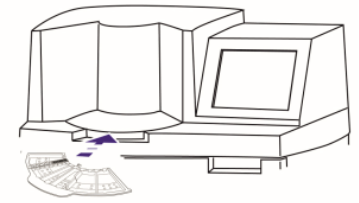
2



3



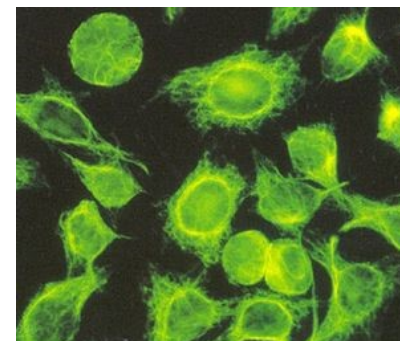
4



ANA protilátky

anti-nuclear antibodies

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

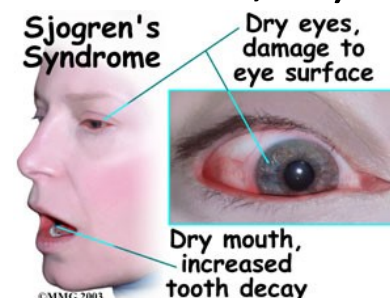


- Podskupinou ANA jsou ENA protilátky – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (jedná se o takové antigeny jádra buněk, které mají vyšší Mr a lze je extrahovat → např. SSA, SSB, Jo-1, Scl-70...)
- ENA protilátky – stanovují se ELISOU/ImunoBlotem/analyzátor Isys

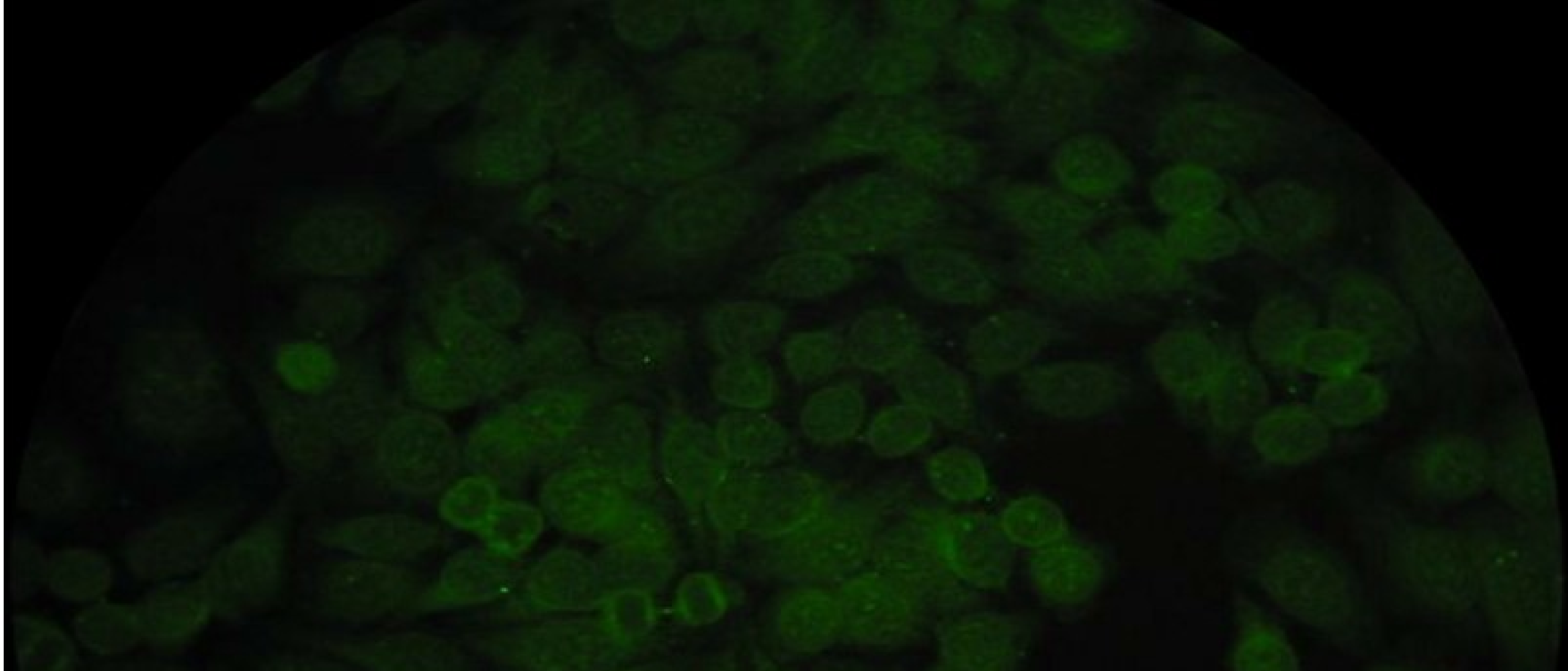
ANA (Anti Nuclear Antibodies)



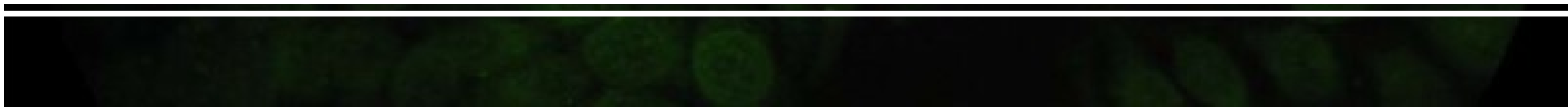
- Výskyt při různých **systemových autoimunitních onemocněních** (systemový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, ...)

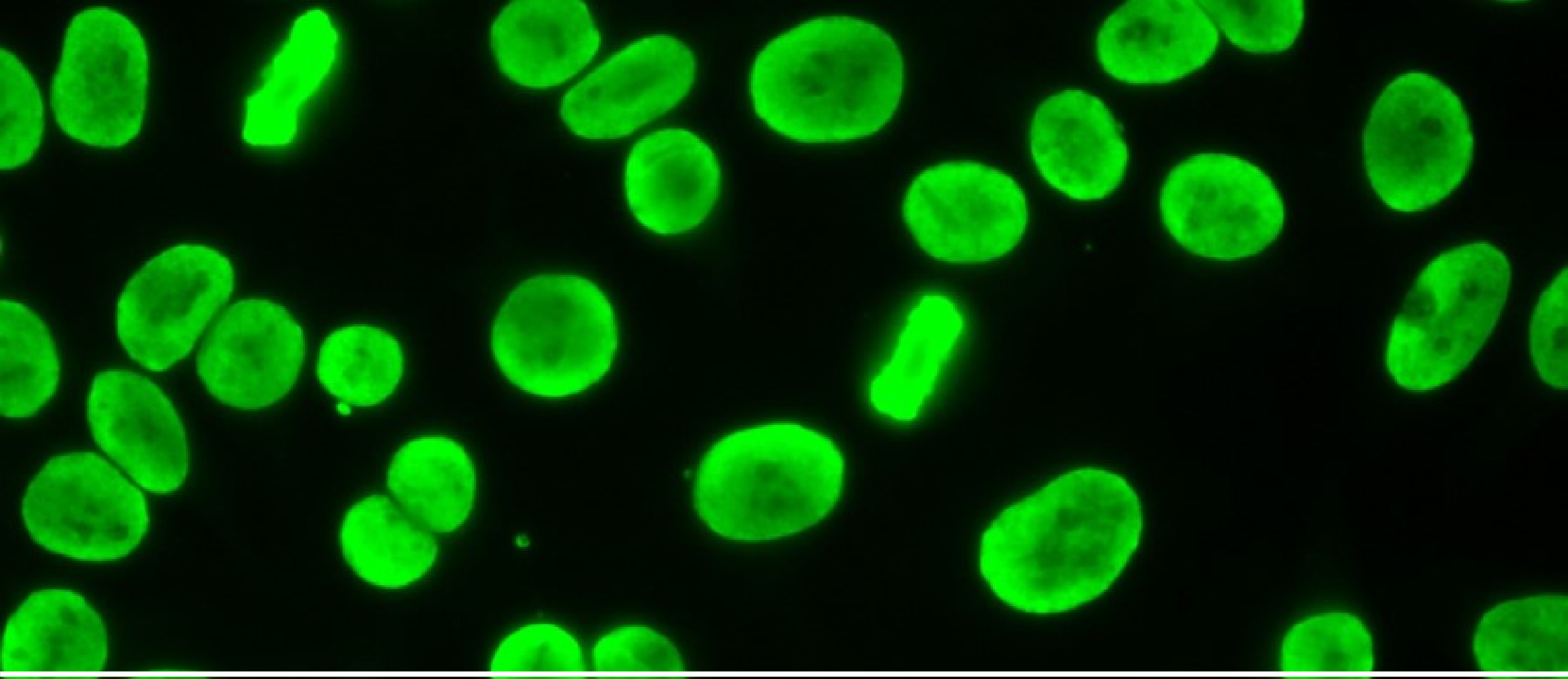


Fluorescenční obraz v mikroskopu může vypadat stejně nebo podobně u různých protilátek – pokud vidíme určitý obraz, **nevíme ještě, o jakou autoprotlátku se jedná** (na jaký antigen se váže), k jejímu bližšímu určení mohou pomoci jiné metody (ELISA, ImunoBlot, Isys)



Hep2 buňky – negativní obraz





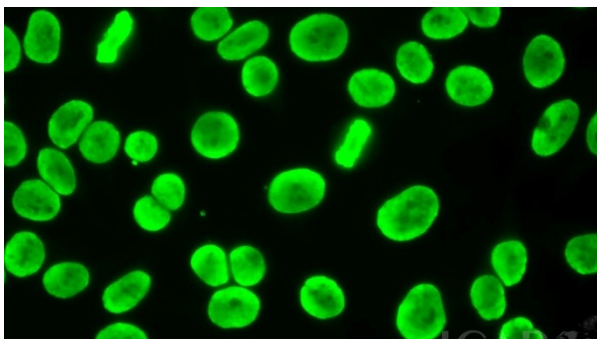
ANA – typ homogenní

diagnóza: **SLE**, léky indukovaný lupus, juvenilní idiopatická **artritida** (antigeny: dsDNA, chromatin, nukleosomy, histony)

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

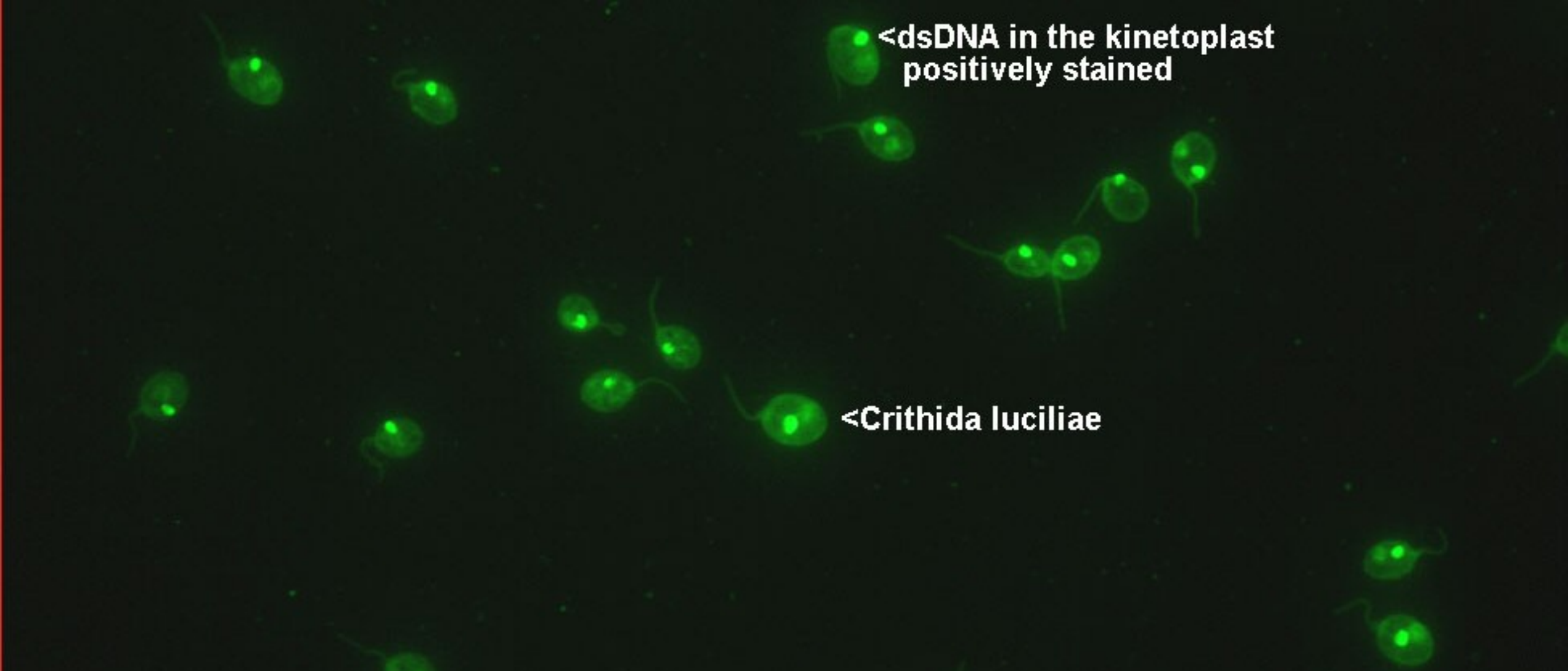


2. Sérum pacienta aplikováno na substrát *Crithidium luciliae*



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

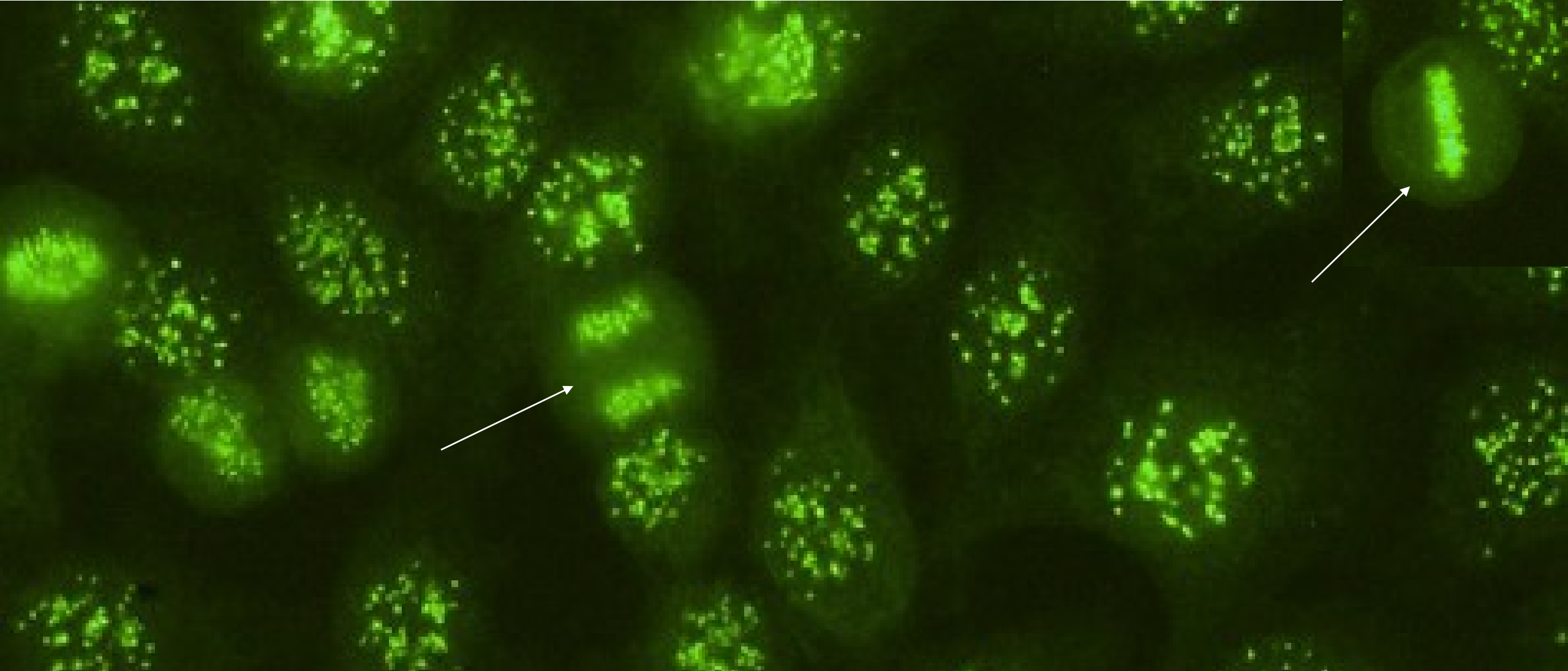




<dsDNA in the kinetoplast
positively stained

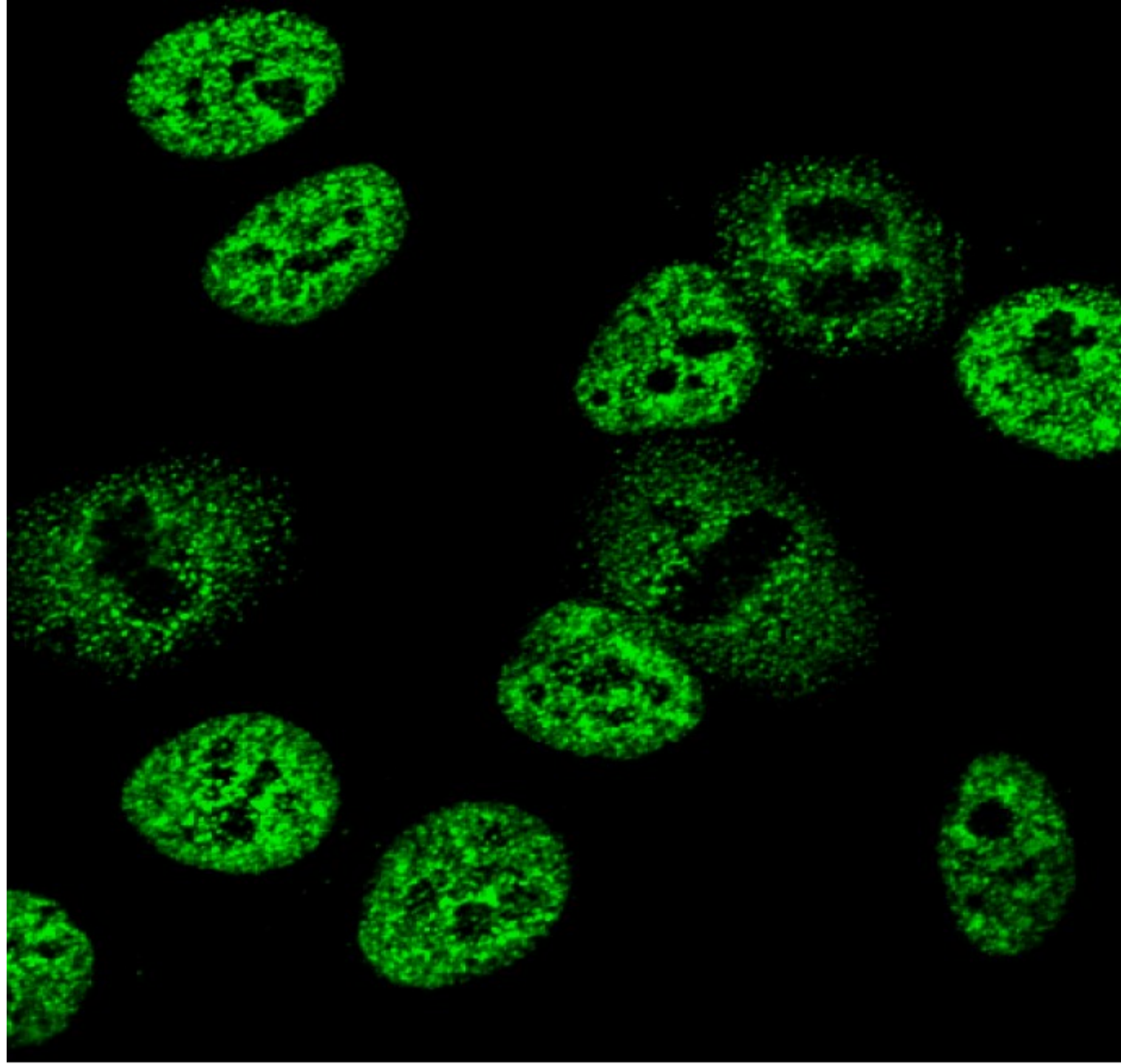
<Crithida luciliae

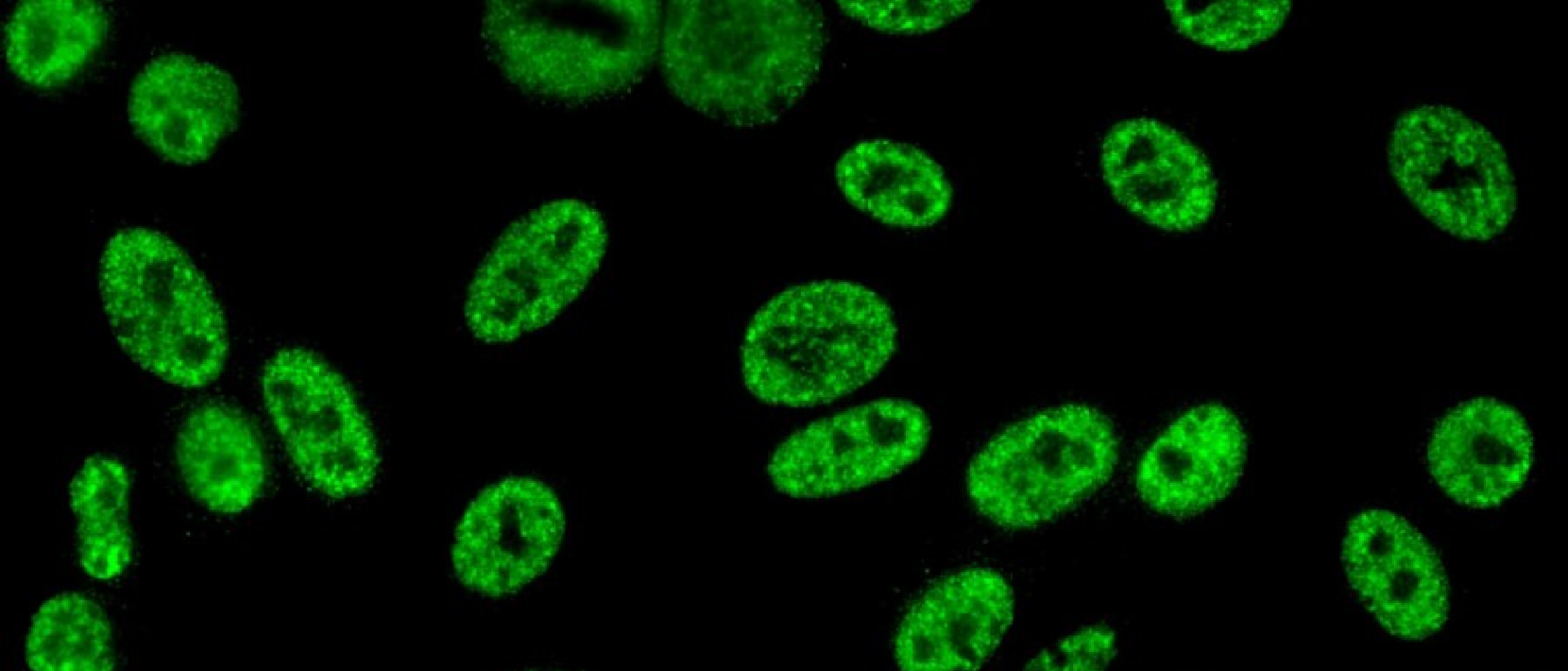
Prvok Crithidia luciliae – antigen je dsDNA



ANA – typ centromerický
diagnózy: CREST syndrom, systémová sklerodermie

ANA typ zrnitý





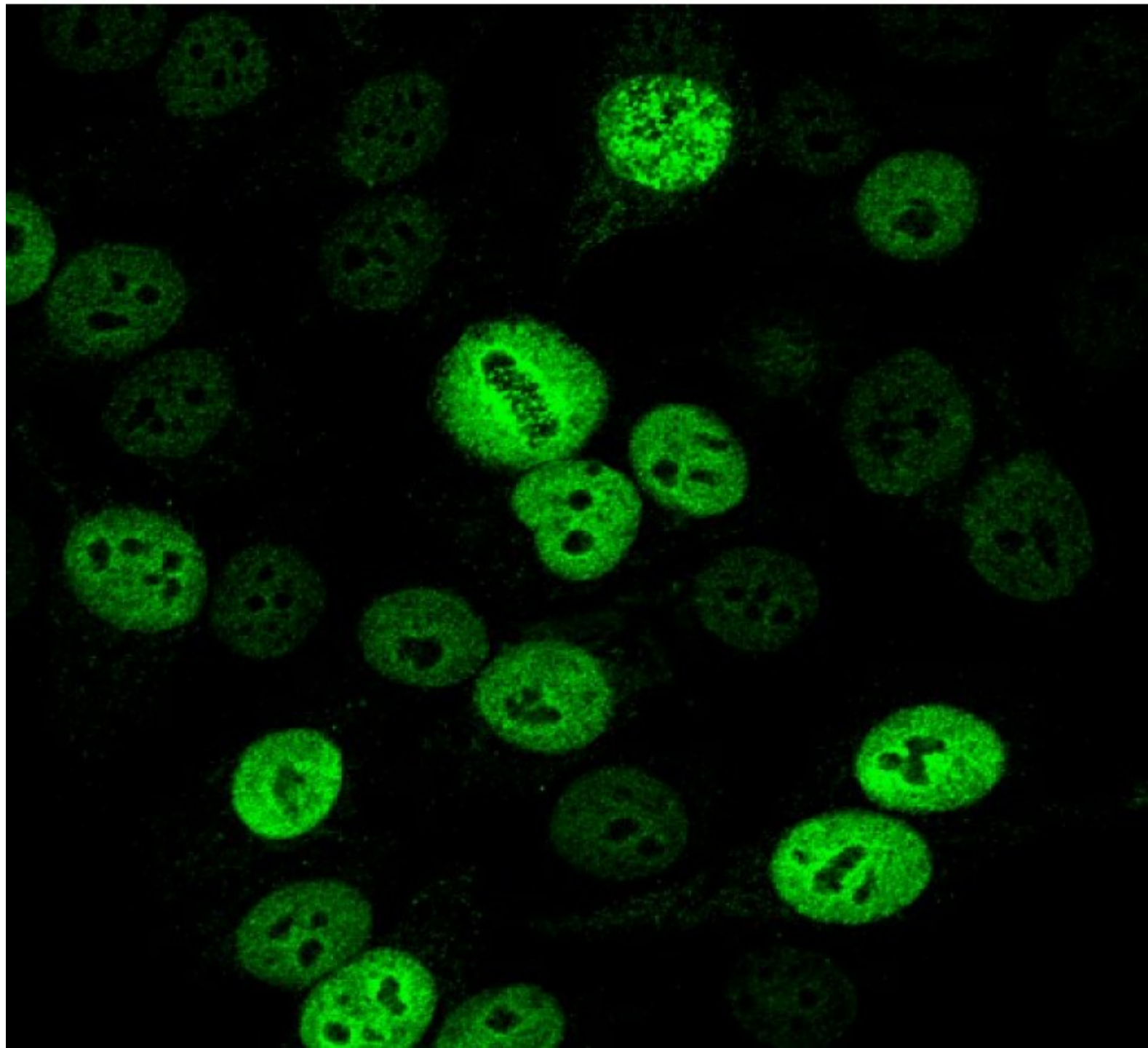
ANA – typ zrnitý (antigeny: ribonukleoproteiny ENA – Sm, SSA, SSB, U1-RNP)

možná diagnóza: smíšené onemocnění pojiva, Sjögrenův syndrom

PCNA

proliferating cell nuclear antigen

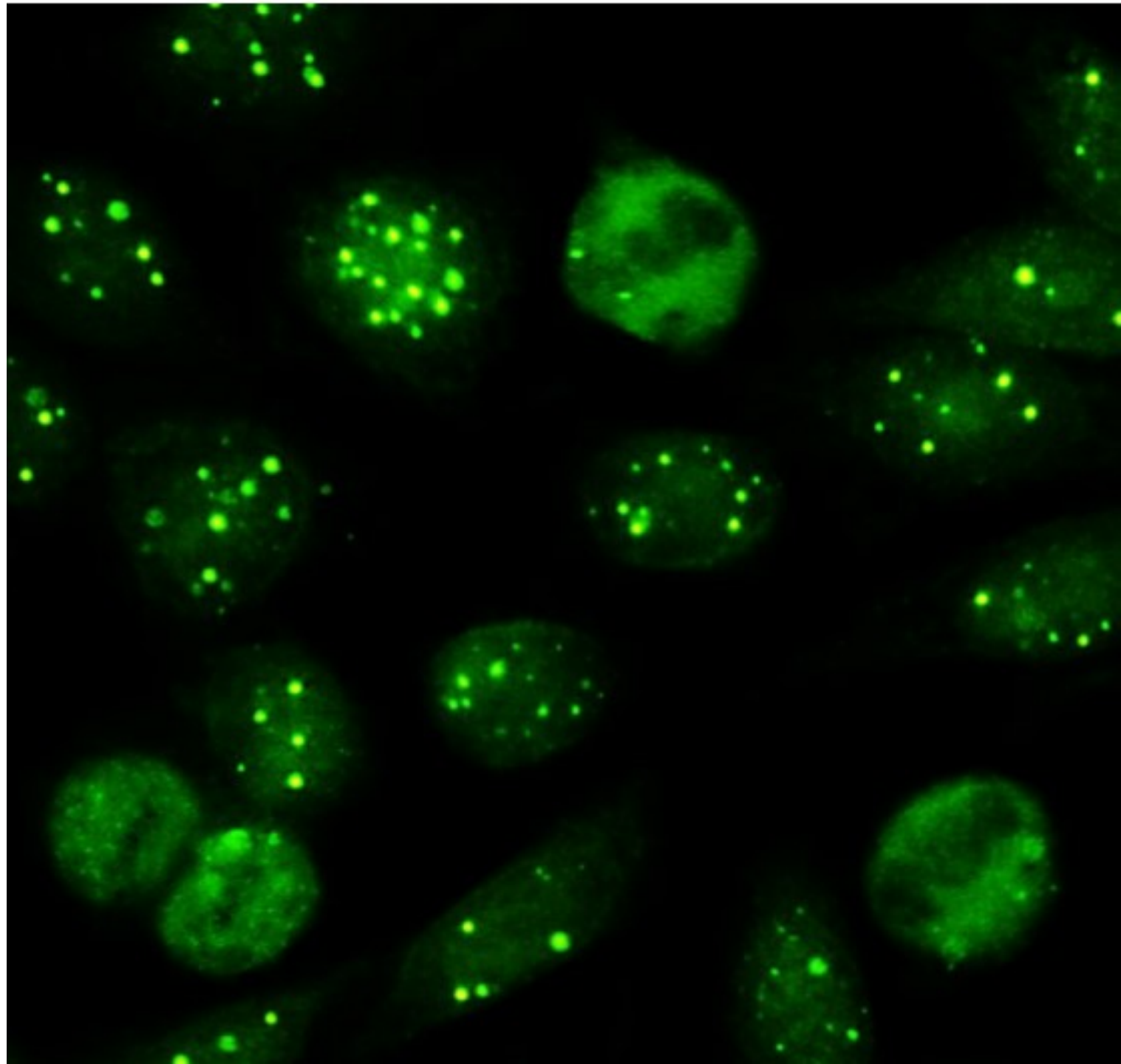
- Klinická asociace: SLE – 3%
- Dělicí se buňky v S fázi pozitivní
- Klidové buňky v G0 fázi negativní



ANA

četné jaderné tečky

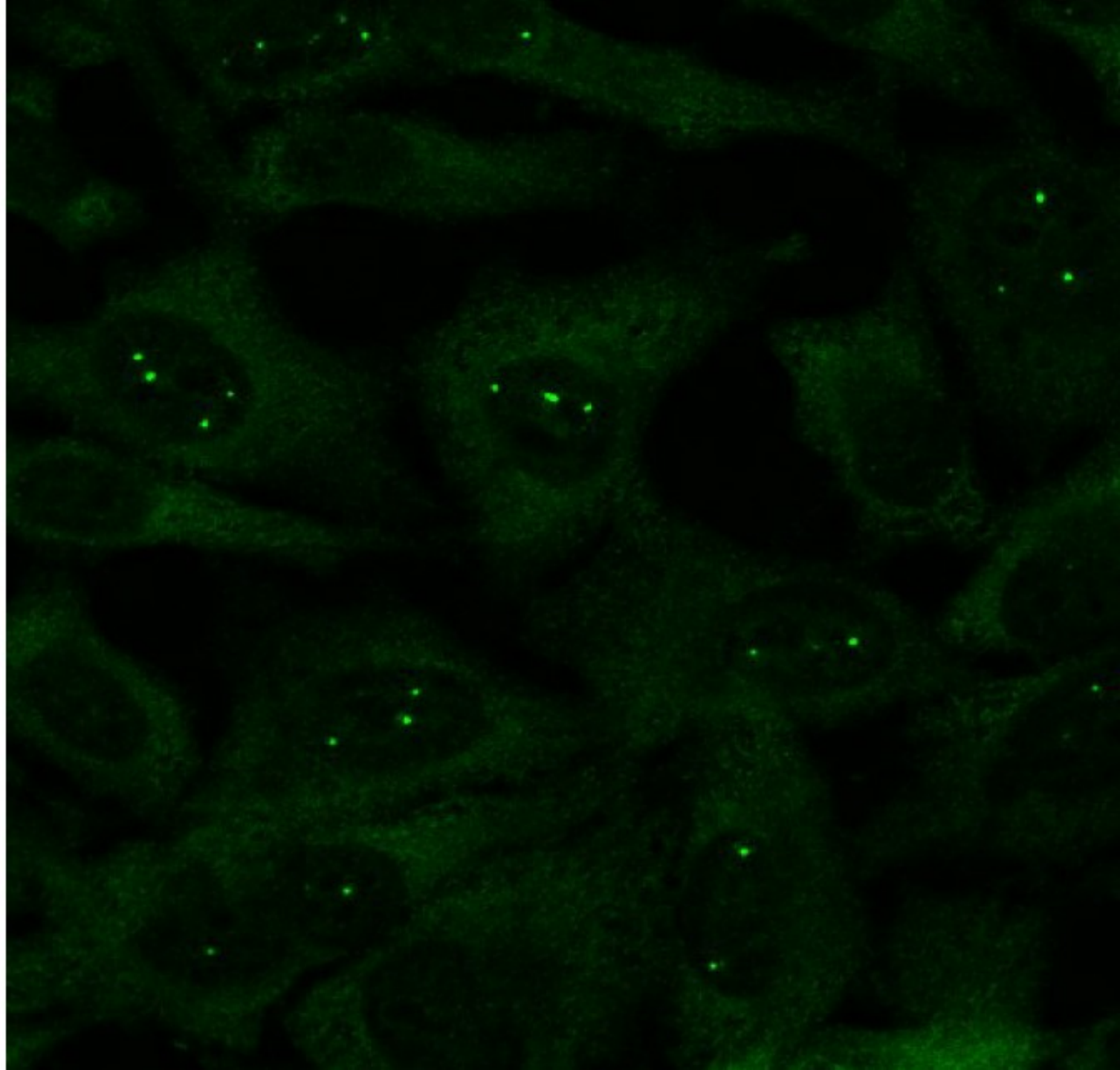
- Antigeny: protein Sp100, Gp210
- Klinická asociace: primární biliární cirhóza
- Pacienti s tímto onemocněním negativní na AMA → svědčí pro horší prognózu onemocnění

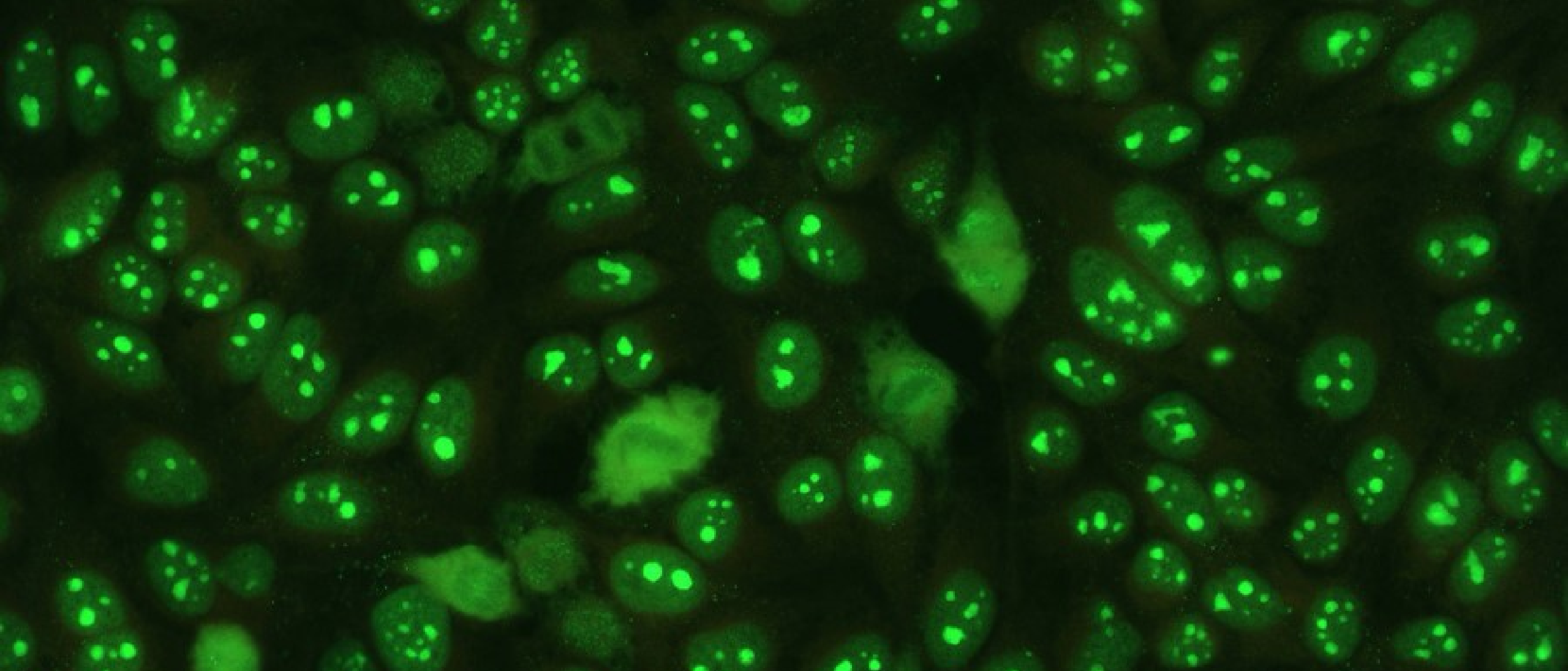


ANA

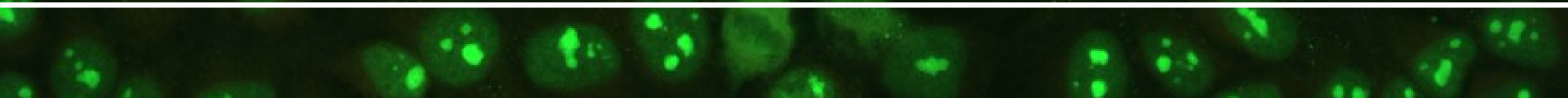
ojedinělé jaderné
tečky

- Antigen: coilin p-80
- Klinická asociace: autoimunitní a virová onemocnění jater





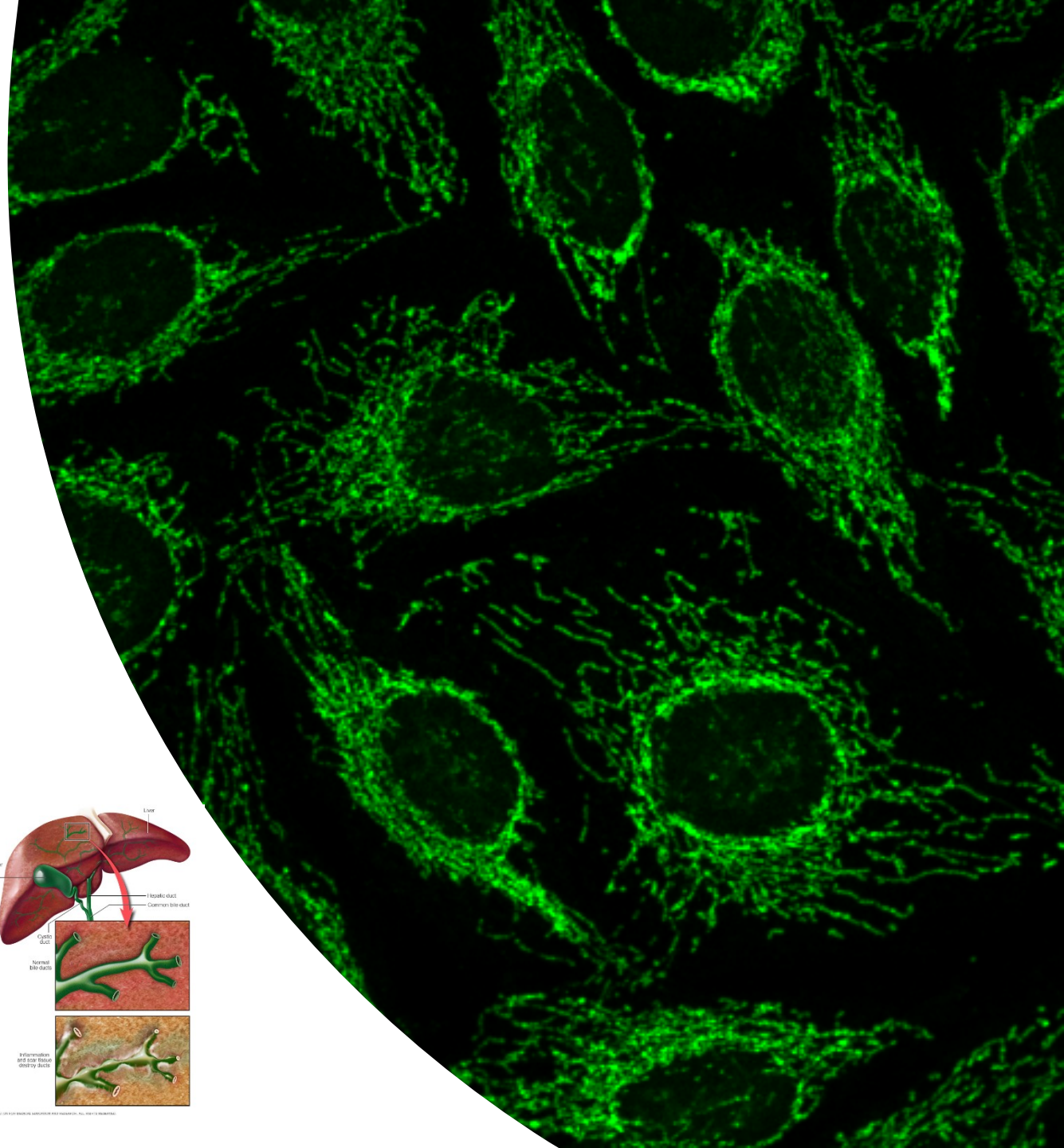
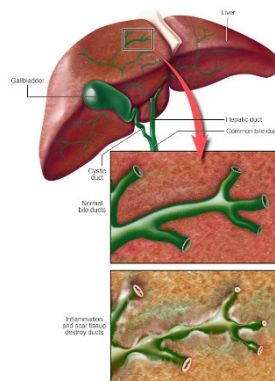
ANA – typ nukleolární (jadéřkový)
diagnóza: systémová sklerodermie



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

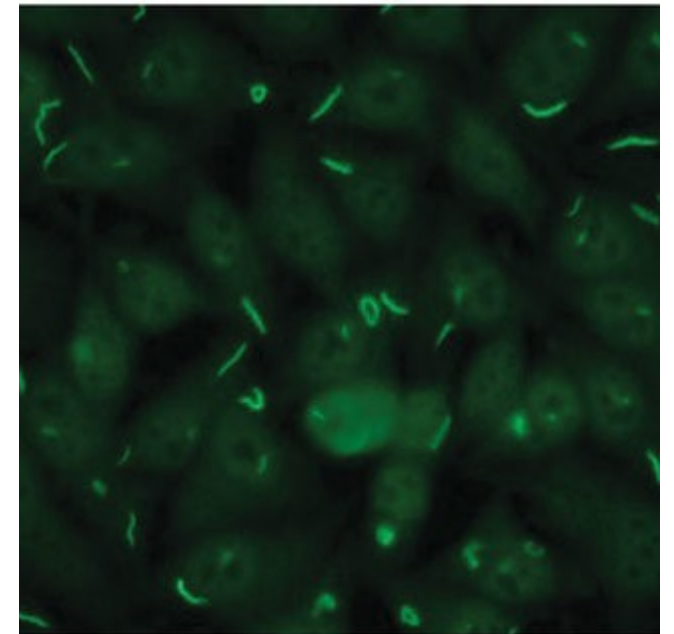
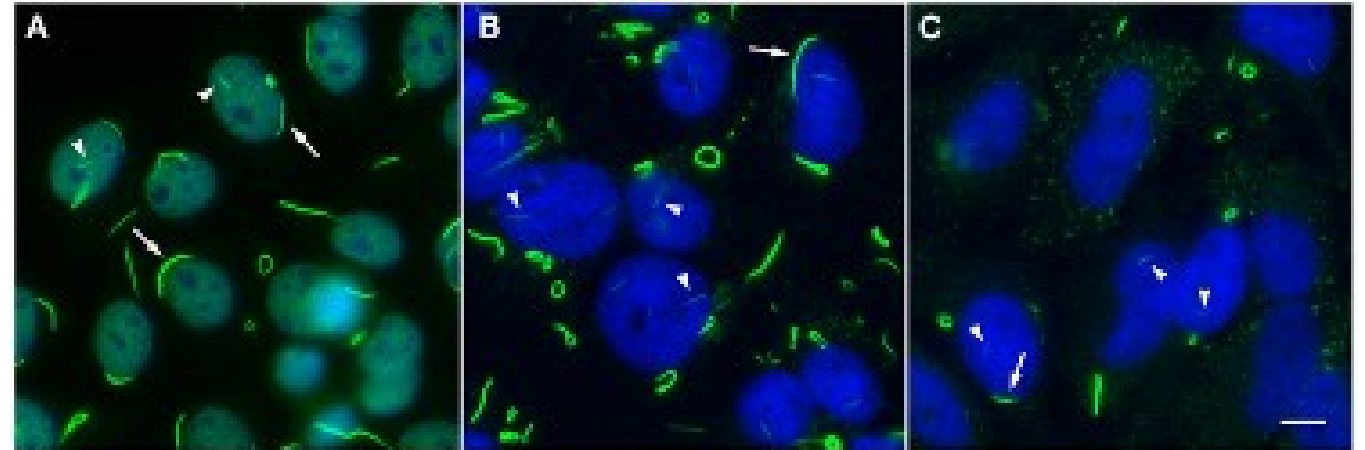
V cytoplasmě HEp2 buněk je možné
pozorovat i další typy fluorescence –
např. **mitochondriální – AMA** (anti-
mitochondrial antibodies) – výskyt u
onemocnění **primární biliární cirhóza**

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



Nejaderné obrázy IF

- Obraz tyčinek a kroužků „rods and rings“
- „Lochmanovi červi“
- Asociace: u pacientů po terapii interferonem a ribavirinem při hepatitidě C
- Antigen: neznámý



ANA protilátky – zpracování - 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 → Sarže: _____
Exp: _____
Datum dodávky: *19. 2. 2020*

Údaje o použitém konjugátu → KONJUGÁT IgG
Rabbit Anti-Hu.IgG/FITC, F0202
č.s.20069312
Exp.31/05/2025

Jednotky: _____

	4019 S_ANA	4020 S_ANAT	4344 S_ANATYP	4087 S_CENTR	4343 S_ANAV
Poloha kontrol/vzorků na skle	1				
Vzorky pacientů + kontroly					
Výsledky prvního odečítání skl	<i>HH✓</i>				
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		
Skló 1	1	Kontrola pozitivní	+ H [✓]					
	2	Kontrola negativní	mg.					
	3	Pacient 1	JG	[---] 160 [---] 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			
	Skló 2	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] _____		mg.		[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

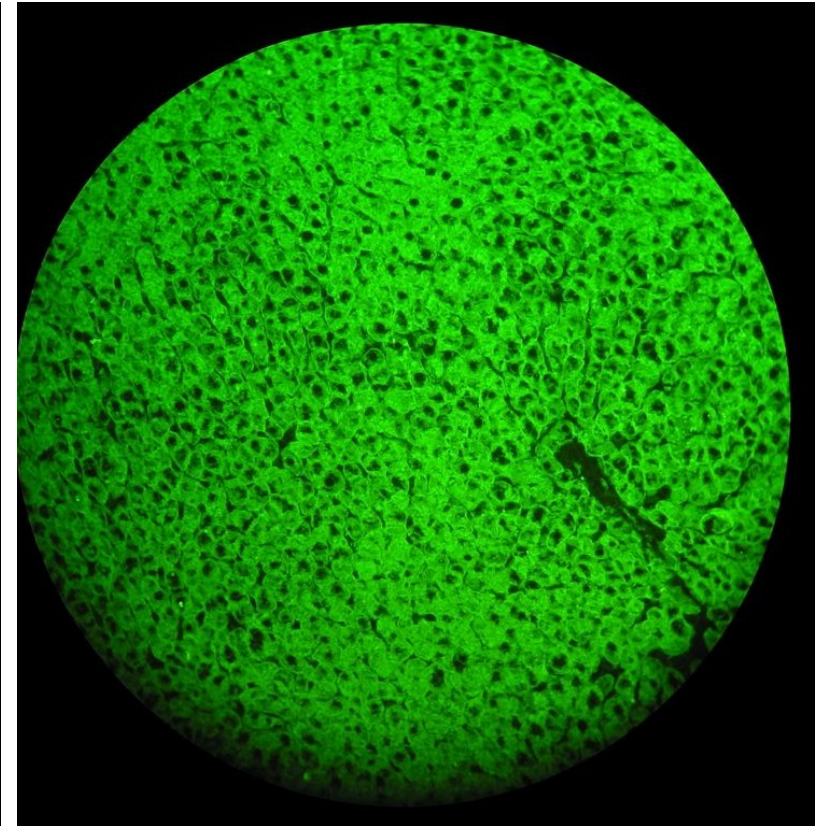
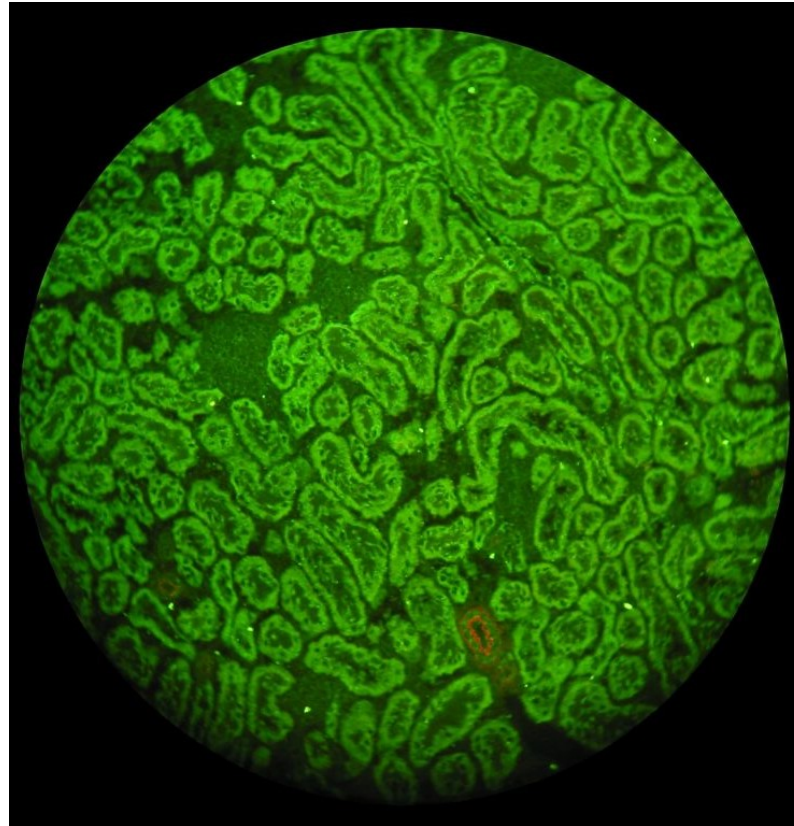
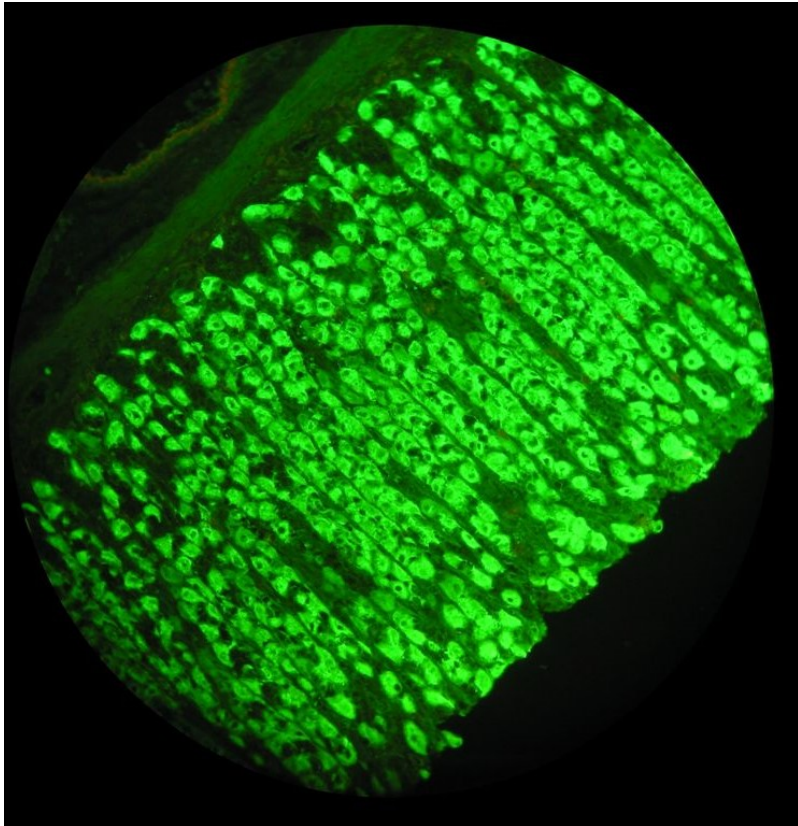
Typy fluorescence se popisují zkratkami, např:

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

Razítko + podpis odečítajícího VS

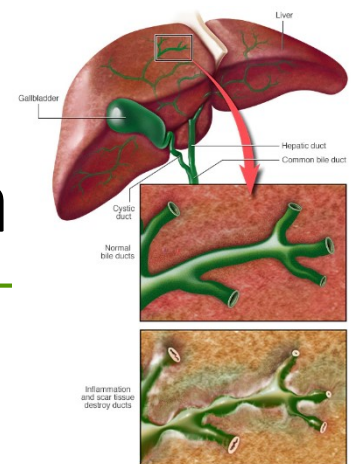
Substrát LKS

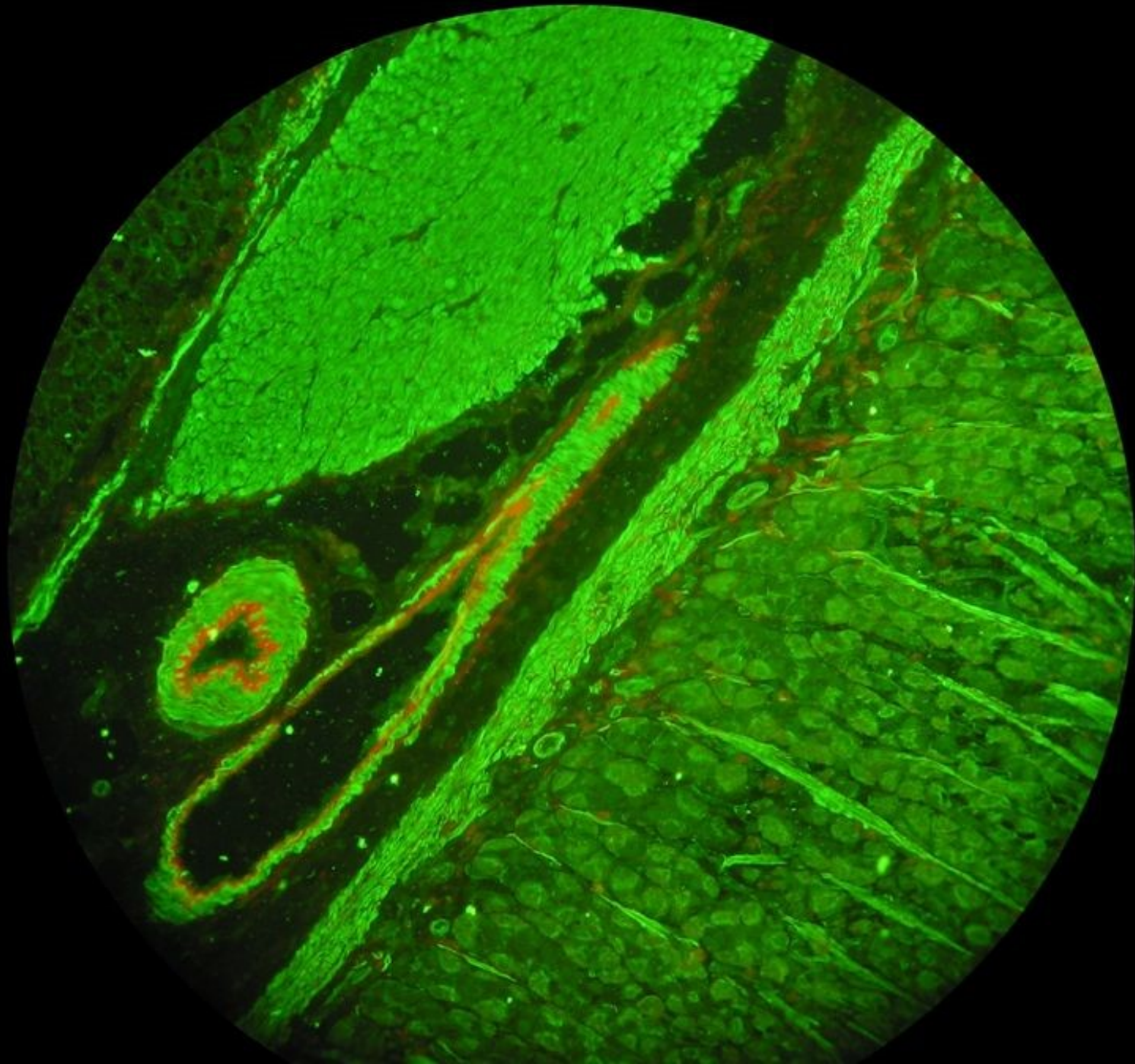
- Kombinace 3 krysích tkání
 - játra (Liver)
 - ledviny (Kidney)
 - žaludek (Stomach)
- Pozorujeme protilátky:
 - AMA (antimitochondriální) – primární biliární cirhóza
 - ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitní hepatitidy
 - GPC (proti parietálním buňkám žaludku) – prim. perniciózní anémie
 - RET (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.





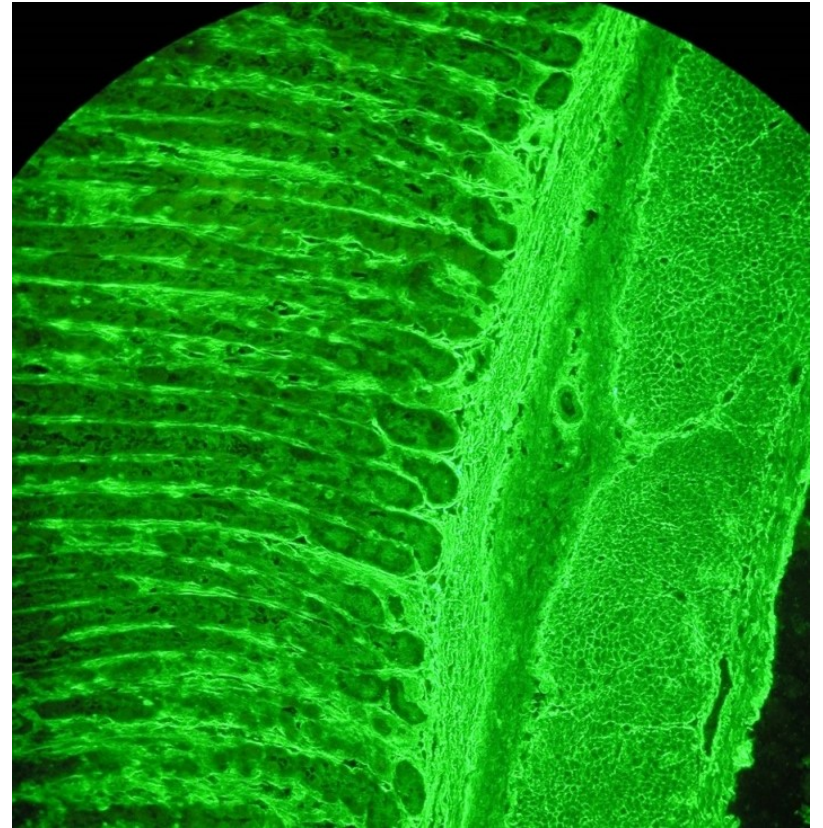
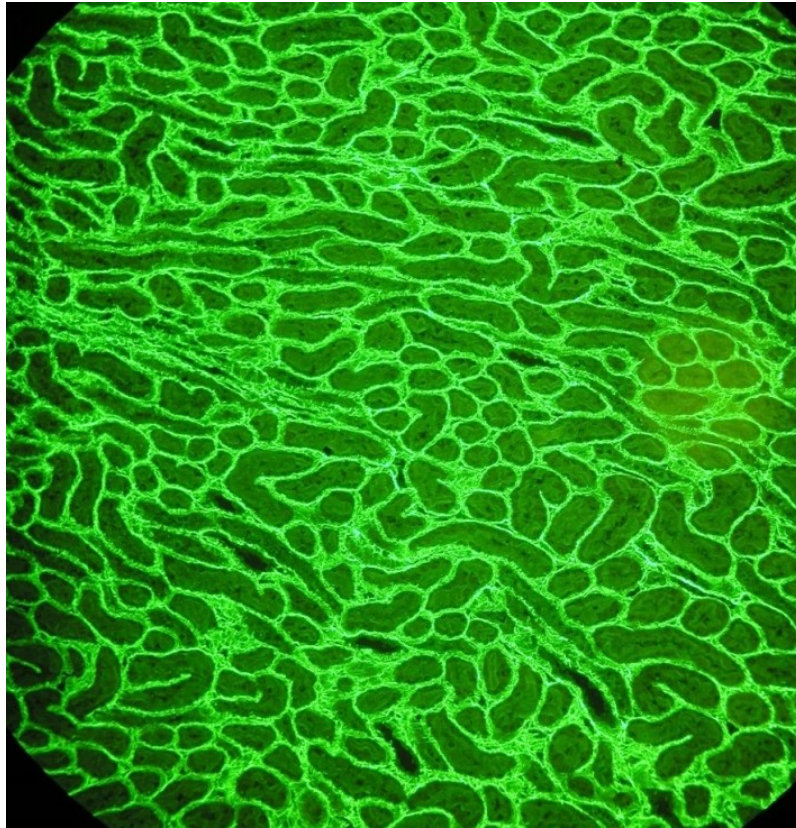
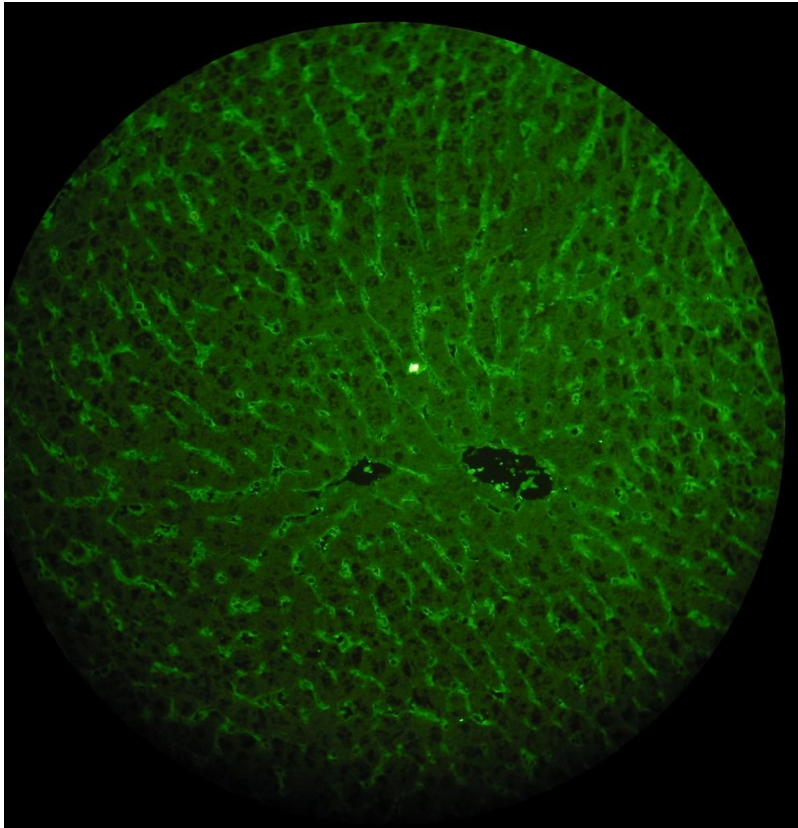
ASMA

(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 antibodies

Protilátky proti parietálním buňkám žaludku

- Výskyt u **perniciózní anemie**

- Přítomnost 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)

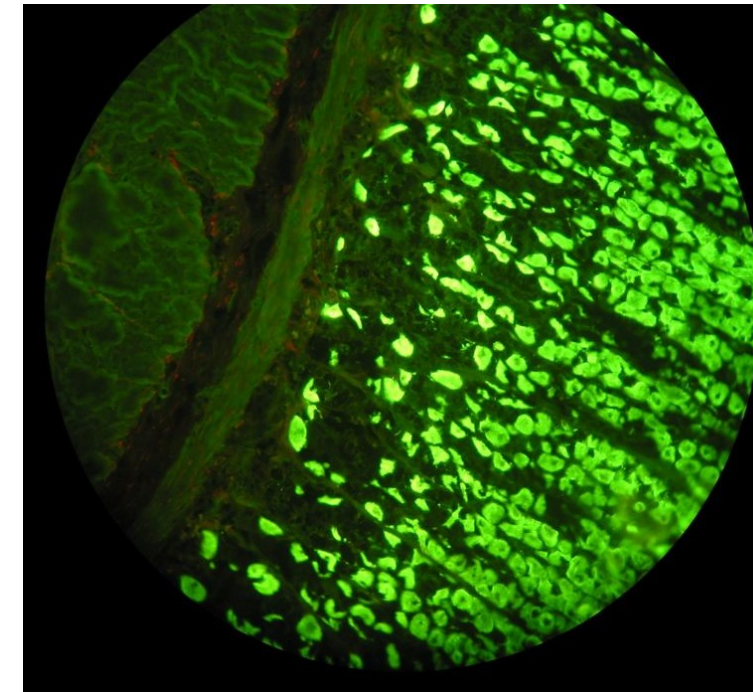
- Důsledek:

- 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



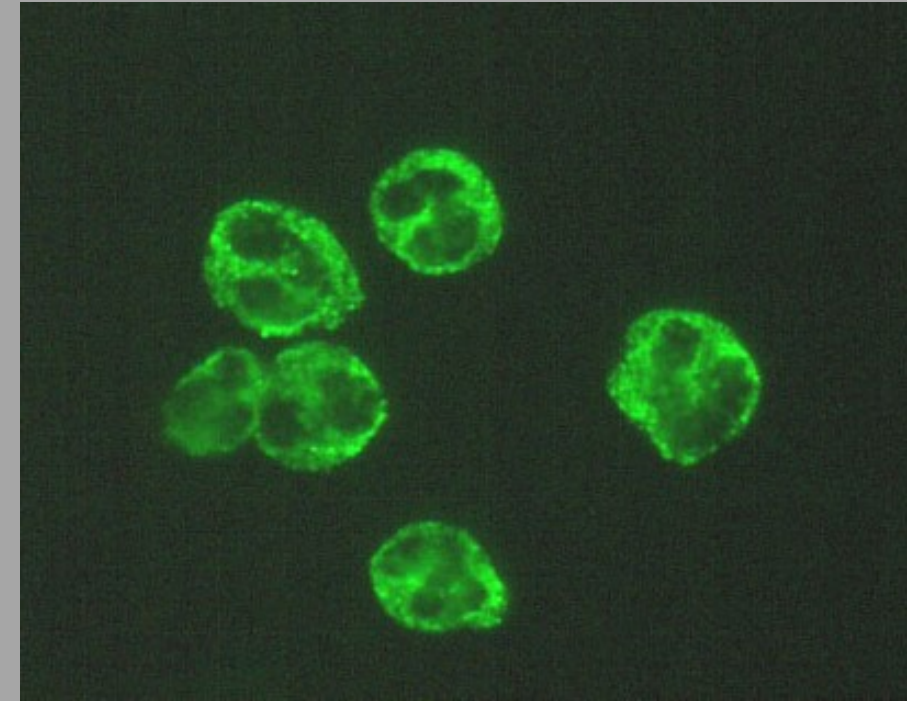
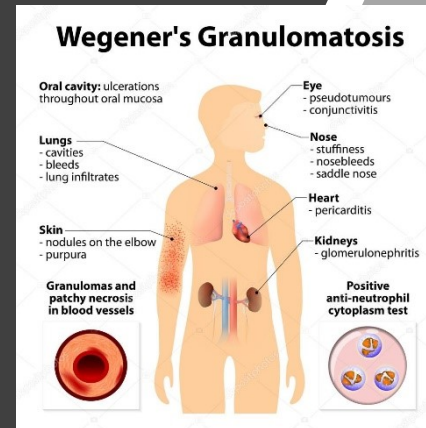
ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilů)

- 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) – **progresivní sklerotizující cholangitida, 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)

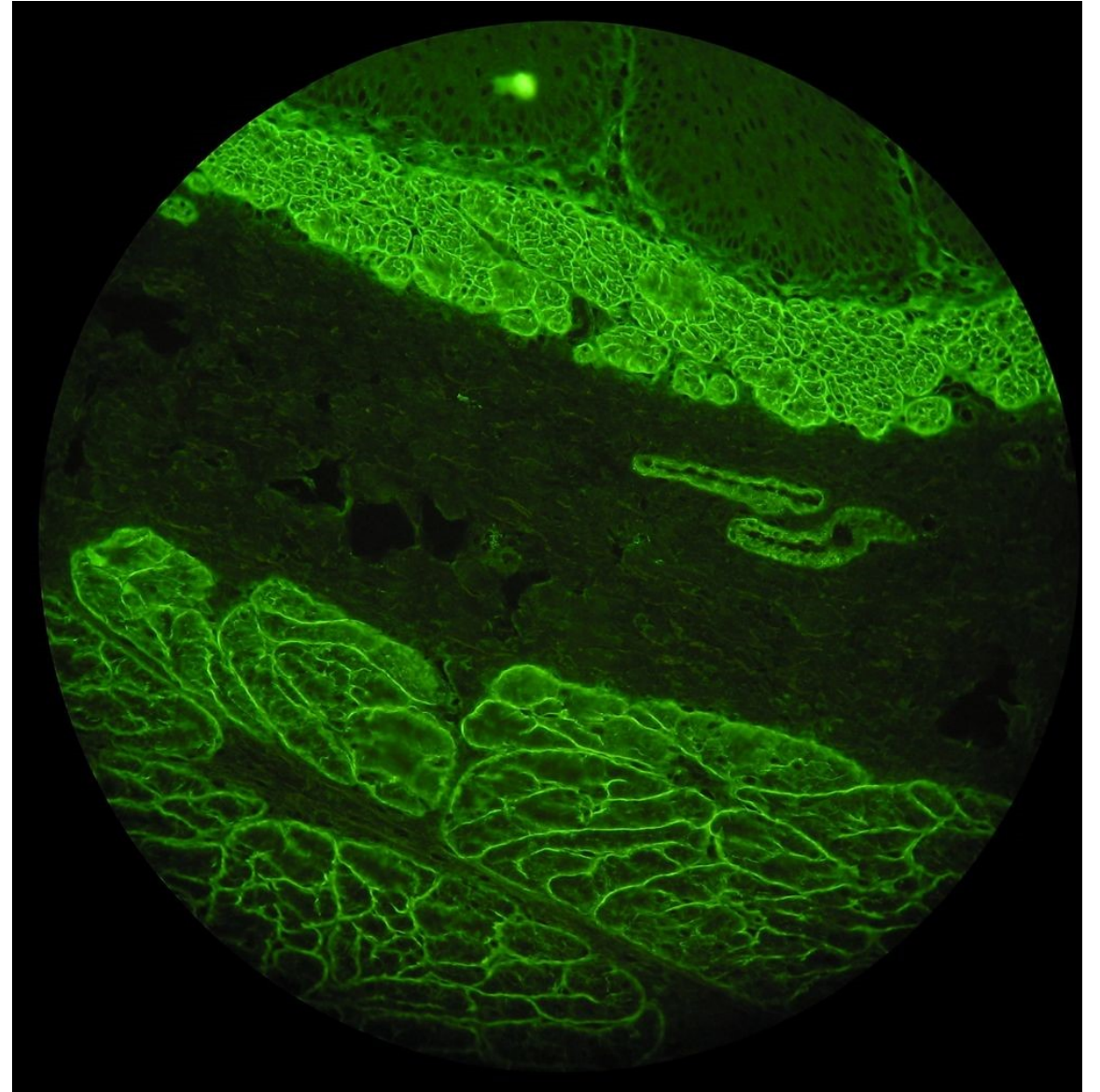
Atypická ANCA – různé antigeny (elastáza, lysozym, katepsin)



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

EMA (protilátky proti endomysiu)

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



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

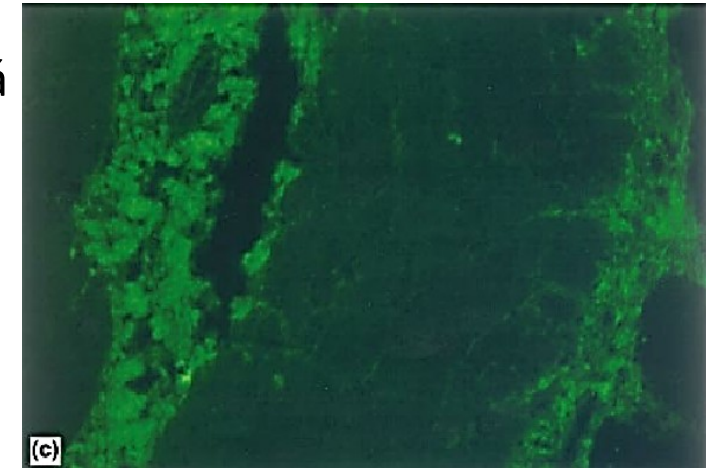
Imunologická laboratoř provádí pouze screening celiakie



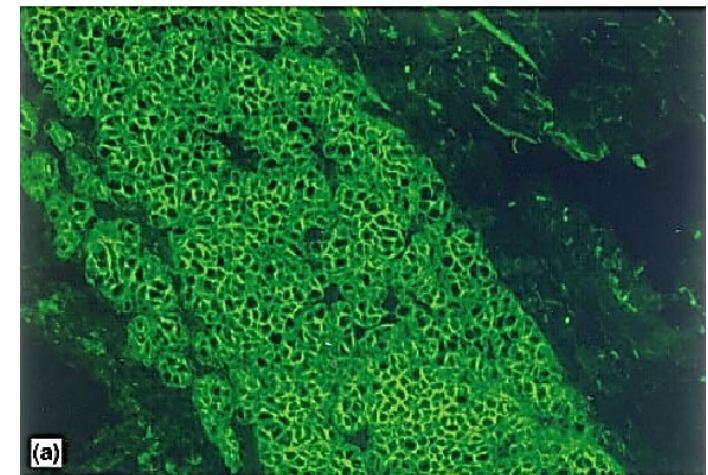
4) Definitivní potvrzení celiakie: gastroenterolog

- 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



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 Oesophagus Prim. (IgA)

Substrát na skle – u EMA řezý opičího jícnu

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		odečítající VŠ pozitivní kontrola je pozitivní
2	Pacient 1		
3	Pacient 2		
4	Pacient 3	[22.11.18 negativní]	
5	Pacient 4		
6	Pacient 5	[26.11.18 negativní]	} neg
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		} neg
13	Pacient 12		
14	Pacient 13		
15	Pacient 14		
16	Pacient 15		
17	Pacient 16		

ODBORNÝ DOHLED

Razítko + podpis
VŠ s atestací
odborný dohled

Zvláštní postavení – ASCA protilátky

- Nejedná se o autoprottilátky (nejsou namířeny proti strukturám těla vlastním)
- Jedná o protilátky proti kvasince *Saccharomyces cerevisiae*
- Stanovení **ASCA** slouží k diferenciální 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!

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 IF
 - 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

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 (vyšetření nutno opakovat!)
- 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

Problémy při stanovení autoprotilátek

- Při použití různých metodik mohou být někteří pacienti negativní i když onemocněním trpí, např.
 - Pacient je na určitou autoprotilátku negativní na imunofluorescenci, na ELISE, ale pozitivní na imunoblotu
 - Nebo
 - Pacient je pozitivní jen na imunofluorescenci ale negativní na ELISE i imunoblotu
- PROČ?
- Různé metody mají **různě ovlivněn cílový antigen** (vliv zpracování), na který se autoprotilátka má vázat, např:
 - Imunofluorescence – použití krysích tkání – antigen se nemusí plně shodovat s lidským – protilátka se nemusí vždy navázat
 - ELISA – vlivem zpracování antigenů na desku může být ovlivněna struktura antigenu
 - Imunoblot – vlivem elektroforézy a elektroblotu může dojít k pozměnění konformace molekuly antigenu která vyústí v neschopnost vazby autoprotilátky
 - Nutnost brát ohled na kliniku pacienta, pokud má typickou symptomatologii ale na určité metodice vyjde negativní, je třeba otestovat autoprotilátky jinou metodikou

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 laboratoře zasílají anonymní skla
 - Laboratoř 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