

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Klára Beránková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ WŮ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Klára Beránková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**ZAVEDENÍ AUTOMATICKÉHO HODNOCENÍ
FLUORESCENČNÍCH OBRAZŮ DO RUTINNÍ PRAXE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2023

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 3. 2023.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Beránková Klára

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Zavedení automatického hodnocení fluorescenčních obrazů do rutinní praxe

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 43

Počet stran – nečíslované: 22

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 35

Klíčová slova: Nepřímá imunofluorescence, antinukleární protilátky, protilátky proti cytoplazmatickým antigenům, EUROPattern, autoimunitní onemocnění

Souhrn:

Tato bakalářská práce je zaměřena na porovnávání vyhodnocených fluorescenčních obrazů automatickým odečtem s manuálním. Z obou zmíněných metod byly přezkoumány výsledky antinukleárních protilátek (ANA) a protilátek proti cytoplazmatickým antigenům (ANCA). Výsledky automatického analyzátoru nejsou shodné s mikroskopickým odečtem, jelikož analyzátor nezvládne určit všechny typy fluorescence. Ovšem automatickou titrací dokáže ušetřit čas, omezit vliv lidského faktoru na reprodukovatelnost výsledků a tím usnadnit chod laboratoře.

Abstract

Surname and name: Beránková Klára

Department: The Department of Paramedical science, Medical diagnostics studies and Public health

Title of thesis: Introduction of automatic evaluation of fluorescence images into routine practice

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 43

Number of pages – unnumbered: 22

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 35

Keywords: Indirect immunofluorescence, antinuclear antibodies, antibodies against cytoplasmic antigens, EUROPattern, autoimmune diseases

Summary:

This bachelor thesis is focused on the comparison of the evaluated fluorescence images by automatic readout with manual readout. Of the two methods mentioned, the results of antinuclear antibodies (ANA) and antibodies against cytoplasmic antigens (ANCA) were reviewed. The results of the automated analyser are not identical to the microscopic readout, since the analyser cannot detect all types of fluorescence. However, automated titration can save time, reduce the influence of human factors on the reproducibility of the results and thus facilitate the operation of the laboratory.

Předmluva

Metoda automatického hodnocení fluorescenčních obrazů se během několika let rapidně zdokonalila. Dokázala usnadnit chod laboratoře i přesto, že výsledky musí být nadále kontrolovány speciálně vyškoleným laboratorním pracovníkem. Hlavním cílem bylo tedy porovnat shodu výsledků automatického a manuálního odečtu, což nám umožňuje zhodnotit přínos této metody do provozu laboratoře.

Poděkování

Mé poděkování patří Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytnutí cenných rad a materiálních podkladů.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM OBRÁZKŮ	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK	15
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 FYZIOLOGIE A PATOLOGIE IMUNITNÍHO SYSTÉMU	18
1.1 Antigen	18
1.2 Druhy imunitních mechanismů	18
1.2.1 Nespecifická (neadaptivní) imunita.....	18
1.2.2 Specifická (adaptivní) imunita.....	18
1.3 Protilátky	19
1.3.1 Polyklonální protilátky	19
1.3.2 Monoklonální protilátky	19
1.4 Onemocnění způsobená poruchou imunity	20
1.5 Autoprotilátky.....	20
1.6 Antinukleární protilátky (ANA).....	21
1.6.1 Systémový lupus erythematosus (SLE).....	21
1.6.2 Smíšené onemocnění pojivové tkáně (MCTD).....	21
1.6.3 Systémová sklerodermie (SSc).....	22
1.6.4 Sjörgenův syndrom.....	22
1.7 Protilátky proti cytoplazmatickým antigenům (ANCA)	22
1.7.1 Wegenerova granulomatóza	23
1.7.2 Mikroskopická polyangiitida (MPA).....	23
1.7.3 Polyarteriitida nodosa (PAN).....	23
1.7.4 Syndrom Churga-Strausové	23
1.8 Metody stanovení autoprotilátek	24
1.8.1 Enzymová imunoanalýza (ELISA).....	24
1.8.2 Imunoblot.....	24
1.8.3 Nepřímá imunofluorescence.....	25
2 IMUNOFLUORESCENCE	26
2.1 Přímá imunofluorescence	26
2.2 Nepřímá imunofluorescence.....	26
2.3 Fluorochromy	26
2.4 Substráty	27

2.5	Fluorescenční mikroskop.....	27
2.6	Fluorescenční mikroskop s digitálním zpracováním a vyhodnocením obrazů....	27
2.7	ANCA vyhodnocení	28
2.8	Nomenklatura obrazů Hep-2 buněk.....	29
2.8.1	Homogenní fluorescence jader	29
2.8.2	Hustá jemně zrnitá fluorescence jader.....	30
2.8.3	Fluorescence centromer	31
2.8.4	Zrnitá fluorescence jader	31
2.8.5	Fluorescence jaderných teček.....	32
2.8.6	Fluorescence jadérek	33
2.8.7	Fluorescence jaderné membrány	34
2.8.8	Pozitivní fluorescence cytoplazmy.....	35
	PRAKTICKÁ ČÁST	37
3	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	37
3.1	Hlavní cíl	37
3.2	Dílčí cíle	37
4	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	38
5	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	39
6	METODIKA PRÁCE	40
6.1	Automatické vyšetření ANA a ANCA pomocí nepřímé imunofluorescence.....	40
6.1.1	Přístrojové vybavení	40
6.1.2	Pracovní postup	42
6.1.3	Vyhodnocení.....	46
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	47
7.1	Porovnání vyhodnocení ANA a ANCA protilátek nepřímou imunofluorescencí.....	47
7.1.1	Vyhodnocení ANA protilátek.....	48
7.1.2	Vyhodnocení ANCA protilátek.....	48
7.1.3	Interpretace výsledků.....	49
7.2	Porovnání vyhodnocení autoproti látek proti antigenu DFS-70 pomocí metod nepřímé imunofluorescence a imunoblot	50
7.3	Procesní mapa metod.....	51
7.4	Analýza rizik.....	52
7.4.1	Přehled vybraných rizik k metodě nepřímé imunofluorescence	53
7.5	Ekonomická rozvaha	54
	DISKUZE	56
	ZÁVĚR.....	59
	SEZNAM LITERATURY	60

SEZNAM PŘÍLOH	64
PŘÍLOHY	65
Příloha A – Schéma procesní mapy vyhodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.	65

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Výsledky ANA protilátek vyhodnocené automatickým odečtem a následně porovnané s manuálním mikroskopickým odečtem.	48
Graf 2: Výsledky ANCA protilátek vyhodnocené automatickým odečtem a následně porovnané s mikroskopickým odečtem.	49
Graf 3: Shoda výsledků ANA a ANCA protilátek metodou automatického odečtu a mikroskopického odečtu.	50
Graf 4: Shoda výsledků anti-DFS70 metodou nepřímé imunofluorescence a imunoblot...	51

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Typy fluorescence ANCA.....	28
Obrázek 2: Přehled dělení ANA vzorů.....	29
Obrázek 3: Homogenní fluorescence jader.	30
Obrázek 4: Hustá jemně zrnitá fluorescence jader.	30
Obrázek 5: Fluorescence centromer.	31
Obrázek 6: Jemně zrnitá fluorescence jader s drobnými skvrnkami.	31
Obrázek 7: Zrnitá fluorescence jader s hrubými skvrnkami.....	32
Obrázek 8: Fluorescence četných jaderných teček.....	32
Obrázek 9: Fluorescence ojedinělých jaderných teček.....	33
Obrázek 10: Homogenní fluorescence jadérek.....	33
Obrázek 11: Tečkovitá fluorescence jadérek.....	34
Obrázek 12: Chuchvalcovitá fluorescence jadérek.	34
Obrázek 13: Homogenní fluorescence jaderné membrány.....	35
Obrázek 14: Chuchvalcovitá fluorescence jaderné membrány.	35
Obrázek 15: Pozitivní fluorescence cytoplazmy.	36
Obrázek 16: Vortex V-1 plus, Biosan.	41
Obrázek 17: IF Sprinter, Euroimmun.	41
Obrázek 18: EUROPattern, Euroimmun.	42
Obrázek 19: Potřebné složky pro přípravu roztoku PBS-Tween.....	44
Obrázek 20: Připravené reagenty umístěné na příslušných pozicích v přístroji IF Sprinter.	45
Obrázek 21: Šablona na montování sklíček NIF.....	45
Obrázek 22: Zhotovená sklíčka připravená ke skenování.	46
Obrázek 23: Procesní mapa hodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.....	52
Obrázek 24: Členění hodnot míry rizika.	53
Obrázek 23: Procesní mapa hodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.....	65

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Laboratorně zjištěné hodnoty pro ANA protilátky.....	47
Tabulka 2: Laboratorně zjištěné hodnoty pro ANCA protilátky.....	47
Tabulka 3: Hodnoty významnosti a pravděpodobnosti rizika.	52
Tabulka 4: Přehled rizik, která mohou mít vliv na NIF.....	54
Tabulka 5: Přehled cen jednotlivých metod stanovení.....	55

SEZNAM ZKRATEK

A-ANCA	Atypické protilátky proti cytoplazmatickým antigenům
ACA	Protilátky proti centromerám
AMA	Antimitochondriální protilátky
ANA.....	Antinukleární protilátky
ANCA	Protilátky proti cytoplazmatickým antigenům
Anti-dsDNA.....	Protilátky proti dvojspirálové DNA
ASMA.....	Protilátky proti hladkému svalu
BPI	Z angl. Bacterial Permeability Increasing Factor
C-ANCA	Cytoplazmatické protilátky proti cytoplazmatickým antigenům
CCD	Z angl. Charge-Coupled Device
ELISA	Enzymová imunoanalýza
ENA	Protilátky proti extrahovatelným jaderným antigenům
EOH.....	Granulocyty fixované etanolem
Fab fragment	Z angl. Fragment Antigen Binding
Fc fragment.....	Z angl. Fragment Crystallizing
FITC.....	Fluoresceinizoithiokyanát
FN	Fakultní nemocnice
Hep-2 buňky	Z angl. Human Epithelial Cells
HCHO	Granulocyty fixované formalinem
ICAP	Z angl. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns

Ig Imunoglobulin

LED..... Z angl. Light Emitting Diode

LIS Laboratorní informační systém

MCTD Smíšené onemocnění pojivové tkáně

MPA..... Mikroskopická polyangiitida

MPO..... Myeloperoxidáza

NIF Nepřímá imunofluorescence

P-ANCA..... Perinukleární protilátky proti cytoplazmatickým antigenům

PAN Polyarteriitis nodosa

PBC..... Primární biliární cholangitida

PBS Z angl. Phosphate Buffered Saline

PR3..... Proteináza 3

PVDF Polyvinyl difluorid

QR kód..... Z angl. Quick Response Code

SARD..... Systémové autoimunitní revmatické onemocnění

SLE Systémový lupus erythematosus

SSc Systémová sklerodermie

TRITC..... Tetrametylrhodamin

ÚIA Ústav imunologie a alergologie

UV..... Z angl. Ultraviolet

ÚVOD

Od roku 1957, kdy byla poprvé použita nepřímá imunofluorescence na detekci antinukleárních protilátek, se její využití pokrokově zdokonalilo a manuální práce byla postupně nahrazena automatickými analyzátory, i přesto ale vyhodnocení fluorescenčních obrazů musí provádět školený pracovník.

Bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou shrnuty základní imunologické a imunopatologické pojmy. Jsou popsány charakteristiky antinukleárních protilátek (ANA), protilátek proti cytoplazmatickým antigenům (ANCA) a s nimi spojená onemocnění. V následující kapitole imunofluorescenčních metod vysvětlují princip imunofluorescence, vše potřebné pro stanovení metody, kde v závěru jsou shrnuty a znázorněny typy fluorescence, které můžeme pomocí automatického odečtu vyhodnotit.

V praktické části se věnuji porovnávání výsledků ANA a ANCA protilátek metodou automatického i manuálního odečtu. Jsou zde zahrnuty také ekonomické charakteristiky, časová náročnost a analýza rizik zmíněných metod.

TEORETICKÁ ČÁST

1 FYZIOLOGIE A PATOLOGIE IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Základní funkcí imunitního systému je udržování homeostázy organismu. Rozpoznává a chrání organismus proti patogenům, zachovává toleranci vůči vlastním tkáním, průběžně likviduje staré, poškozené a některé mutované buňky. Jakákoliv dysbalance má za následek poruchu imunity a s tím spojená onemocnění. [1, 2]

1.1 Antigen

Jedná se o makromolekulární látku bílkovinného charakteru, kterou imunitní systém rozeznává jako cizí. Může být přirozeného i syntetického původu. Jeho přítomnost v organismu stimuluje produkci protilátek. Antigen má na svém povrchu část zvanou epitop, která je rozpoznávána imunitními receptory. Antigen může být nekompletní, takový nazýváme jako haptén, ten organismus rozeznává až po navázání na makromolekulární nosič a následně je schopen vyvolat imunitní reakci. [1, 3]

1.2 Druhy imunitních mechanismů

Imunitní mechanismy rozlišujeme nespecifické (neadaptivní) a specifické (adaptivní). Vzájemnou spoluprací jsou potřebné ke správné funkci imunitního systému. Oba mechanismy jsou tvořeny humorální a buněčnou složkou. [1]

1.2.1 Nespecifická (neadaptivní) imunita

Nespecifické mechanismy jsou vrozené a disponují navíc přirozenou bariérovou funkcí, do které patří neporušené povrchy kůže a sliznic. Systémy nespecifických mechanismů jsou připraveny předem, proto reagují ihned během několika minut. Mezi buněčné složky jsou zahrnuty fagocytující buňky (neutrofilní a eozinofilní granulocyty, monocyty a jejich tkáňová forma makrofágy) a cytotoxické buňky (NK buňky). Humorální složka je tvořena komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. [1]

1.2.2 Specifická (adaptivní) imunita

Humorální složka specifických mechanismů zahrnuje protilátky a buněčná složka T lymfocyty. K tomu, aby došlo ke vzniku imunitní reakce je zapotřebí řádově několika dní až týdnů. Specifické mechanismy reagují na antigeny vysoce specifickými molekulami. Jejich důležitou vlastností je imunologická paměť. [1]

1.3 Protilátky

Protilátky jsou molekuly, které jsou produkovány plazmatickými buňkami v reakci na antigenní stimulaci. Tyto molekuly mají schopnost specificky rozpoznat a vázat se na antigenní struktury a tím je označit k degradaci imunitním systémem. Jedná se o glykoproteiny, které nazýváme imunoglobuliny. Jsou strukturně uspořádány do tvaru písmene Y. Protilátka je tvořena 2 lehkými (κ , λ) a 2 těžkými (α , γ , δ , ϵ a μ) řetězci, které jsou mezi sebou spojeny disulfidickými můstky. Podle těžkých řetězců rozlišujeme 5 izotypů: IgM, IgD, IgG, IgA, IgE. Každá molekula imunoglobulinu může být rozdělena na variabilní a konstantní část. Variabilní část má vlastnost se vázat na konkrétní antigen, je součástí tzv. Fab fragmentu. Konstantní část zahrnuje tzv. Fc fragment, který zajišťuje důležité funkce např. aktivaci komplementu, opsonizaci a přestup protilátek do placenty. Protilátky jsou nedílnou součástí laboratorní diagnostiky, kde nejčastěji používáme protilátky izotypu IgG. Podle výrobního postupu a typu je dělíme do dvou základních skupin: polyklonální a monoklonální. [1, 3, 4, 5]

1.3.1 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky připravujeme cílenou imunizací zvířat. Jedná se o proces, kdy se vhodný antigen aplikuje vybranému zvířeti v emulzi s tzv. „Freundovým adjuvans“ (směs minerálních olejů, vosků a neživých bakterií, která zvyšuje imunitní odpověď na daný antigen). Vytvoření protilátek může trvat 2–6 měsíců v závislosti na daném antigenu. V procesu imunizace v krevním séru zvířete vzniká směs protilátek proti různým epitopům použitého antigenu. Polyklonální protilátka, tak může reagovat s několika epitopy. Proces výroby těchto protilátek je nereprodukovatelný, v případě opakování postupu nejsme schopni připravit identické protilátky. [3]

1.3.2 Monoklonální protilátky

Tento typ je produkován buněčnou kulturou na rozdíl od polyklonálních protilátek, které se vytvářejí organismem. Nejdříve dochází k imunizaci myši vhodným antigenem. Poté jsou z její sleziny získány lymfocyty produkující protilátky. Hybridizací lymfocytů myelomovými buňkami dojde k fúzi. Tím se vytvoří hybridom, který dále syntetizuje protilátky. Myelomové buňky se získávají po aplikaci minerálního oleje intraperitoneálně injekcí. Minerální olej plní funkci karcinogenu a část plazmocytů se změní na nádorové buňky myelomu, které zatím ale nevytvářejí monoklonální protilátky. Výsledný hybridom nese vlastnosti myelomových buněk i B-lymfocytů. Po myelomových buňkách si zachovává charakteristiku téměř neustálého dělení a po B-lymfocytech je schopen syntetizovat homo-

genní protilátky, pocházející z jednoho klonu lymfocytů, s jediným typem vazebného místa. Monoklonální protilátka je tak schopna rozeznat jediný epitop. Na rozdíl od polyklonální protilátky je její výroba reprodukovatelná. [3, 6]

1.4 Onemocnění způsobená poruchou imunity

Jako patologií imunitního systému se nejčastěji setkáváme s alergií, která se projevuje nepřiměřeně silnou reakcí na alergeny. Dalším typem poruch jsou imunodeficitní onemocnění, imunokomplexové poruchy a autoimunitní onemocnění. Imunodeficitní poruchy jsou vyznačeny nedostatečnou reakcí imunitního systému na antigeny. Imunokomplexové poruchy způsobují zánětlivé procesy v organismu, jelikož dochází k ukládání komplexů antigen-protilátka do tkání. V bakalářské práci se věnuji především diagnostice autoimunitních chorob, které se vyznačují reakcí protilátek proti vlastním antigenům organismu, tzv. autoprotiilátek. Autoprotiilátky zde hrají roli jako markery autoimunitních onemocnění. Vyšší množství autoprotiilátek se přirozeně vyskytuje s přibývajícím stářím. Jejich příčiny vzniku nejsou zcela známy, ale existují faktory, které se předpokládají jako spouštěče např. hormonální nerovnováha, genetická predispozice, infekce, náhodné mutace a další. Autoimunitní onemocnění lze rozdělit na 2 kategorie, dle rozsahu postižení na orgánově nespecifické (systémové) a specifické (lokalizované). Orgánově nespecifické autoimunitní onemocnění postihují zpravidla více orgánů nebo tkání v těle. Specifické zasahují konkrétní orgány nebo tkáně v organismu. [4, 7, 8]

1.5 Autoprotiilátky

Autoprotiilátky jsou heterogenní skupinou protilátek. Přirozené autoprotiilátky se obvykle vyskytují v nízkých titrech a převážně jsou izotypu IgM. Můžeme je rozdělit stejně jako autoimunitní onemocnění, na orgánově nespecifické a specifické. Do nespecifických můžeme zahrnout protilátky ovlivňující funkci štítné žlázy (protilátky proti tyroidální peroxidáze, tyreoglobulinu, receptoru pro TSH), trávicího traktu (protilátky proti tkáňové transglutamináze, gladinu, deamidovaným gliadinovým peptidům a další), jater (protilátky proti hladkému svalu – ASMA, antimitochondriální – AMA, protilátky proti mikrozomům jater a ledvin), ledvin (protilátky proti bazální membráně glomerulů), pankreasu a další. Mezi orgánově nespecifické řadíme antinukleární protilátky (ANA) a protilátky proti cytoplazmatickým antigenům (ANCA), kterým se věnuji ve své bakalářské práci. [7, 9]

1.6 Antinukleární protilátky (ANA)

Identifikace antinukleárních protilátek je důležitou součástí klinické medicíny a klinické imunologie. Od roku 1957, kdy byly k průkazu antinukleárních protilátek poprvé použity imunofluorescenční techniky, se postupně rozšířilo vyšetřování ANA pro posouzení systémových a orgánově specifických autoimunitních onemocnění. Testy ANA nyní patří mezi celosvětově nejčastěji prováděné testy na protilátky v mnoha laboratořích klinické imunologie. Antinukleární protilátky jsou heterogenní skupina nespecifických protilátek, které se vážou na různé části buněčného jádra, zejména na nukleární antigeny. Existuje mnoho různých typů ANA, které se vážou na různé nukleární antigeny. Tyto protilátky se mohou vázat na chromatin, RNA a DNA, což jsou základní stavební jednotky buněčného jádra. Některé z nejčastějších typů ANA jsou: protilátky proti dvojspirálové DNA (anti-dsDNA), extrahovatelným jaderným antigenům (ENA), centromerám (ACA), histonům a další. Tyto protilátky se často spojují s autoimunitními onemocněními, jako je systémový lupus erythematosus (SLE), smíšené onemocnění pojivové tkáně (MCTD), systémová sklerodermie, Sjögrenův syndrom a další. [7, 10, 11]

1.6.1 Systémový lupus erythematosus (SLE)

Jedná se o závažné autoimunitní onemocnění s častým výskytem u žen. Způsobuje multiorgánové postižení, které může postihnout orgány nezbytně nutné pro život (ledviny a mozek). Laboratorně prokazujeme autoprottilátky proti antigenu dsDNA. Vznik nemoci není dosud známa, pojednává se o genetické predispozici a faktorech zevního prostředí. Průběh nemoci ovlivňuje pobyt na slunci a užívání hormonální antikoncepce u žen ve fertilním věku. Klinicky je prokazatelný motýlovitý exantém, který se vyznačuje červenavou, vyvýšenou lézí na obličeji. Dále u pacienta pozorujeme celkovou únavu, pokles váhy, artritidu, fotosenzitivitu, lupusovou glomerulonefritidu. Ta patří mezi nejčastější a nejzávažnější orgánové projevy nemoci. Léčba je prováděna podáváním glukokortikoidů a metylprednisolonem. U nepříznivých pacientů navazuje pulzní léčba cyklofosfamidem. [12, 13]

1.6.2 Smíšené onemocnění pojivové tkáně (MCTD)

Smíšené onemocnění pojiva je soubor onemocnění, které postihují pohybový aparát, ale také i několik orgánů (např. kůže, srdce, plíce, nervový systém aj.). Objevují se příznaky onemocnění lupus erythematosus (SLE), systémové sklerodermie (SSc), polymyositidy a revmatoidní artritidy. Onemocnění poprvé popsal v roce 1972 Gordon Sharp a po něm je také pojmenováno jako Sharpův syndrom. Projevuje se otoky prstů rukou, artriti-

dou, myositidou, slerodaktylií a dalšími symptomy. Nacházíme ANA protilátky proti nukleárnímu ribonukleoproteinu senzitivnímu vůči ribonukleáze. Podle klinických příznaků se uplatňuje specifická léčba. [13, 14]

1.6.3 Systémová sklerodermie (SSc)

Jedná se o autoimunitní onemocnění pojivové tkáně (kolagenóza), které se projevuje chronicky a pacienta značně limituje. Nejdříve postihuje kůži a pohybový systém, dále zasahuje do vnitřních orgánů. Příčiny onemocnění jsou idiopatické, ale postihuje převážně mladé ženy. V průběhu onemocnění dochází k fibrotizaci cév, toto bývá podkladem vzniku Raynaudova fenoménu, jehož typickou charakteristikou je bělání prstů na rukou. Sledujeme celkové příznaky jako je hubnutí, únava, deprese a současně propukají změny vnitřních orgánů. Nejčastěji se vyskytují kožní změny jako atrofie a otok tkáně, které pozorujeme obvykle na prstech rukou. Laboratorně prokazujeme antinukleární protilátky (70-90 % případů), anticentromerové (cca 70 %) a protilátky proti DNA topoizomeráze 1. Léčba je pouze symptomatická. Kožní projevy léčíme kortikoidy, Raynaudův fenomén blokátory kalciových kanálů a další. [15]

1.6.4 Sjörgenův syndrom

Toto autoimunitní onemocnění probíhá chronicky a pomalu progreduje. Vyznačuje se jako chronický zánět postihující exokrinní žlázy (slinné, slzné, případně exokrinní žlázy pankreatu). Etiologie je neznámá, určitý vliv na toto onemocnění mají viry (Epstein-Baarové virus, cytomegalovirus) a asociace v HLA systému. Laboratorně prokazujeme autoprotlátky ENA, revmatoidní faktor a ANA. Léčba je zahrnuje substituční terapii jako jsou oční kapky, zvlhčující mléka, žvýkačky. Při léčbě základního onemocnění se podávají glukokortikoidy kombinované s jinými imunosupresivy. [16]

1.7 Protilátky proti cytoplazmatickým antigenům (ANCA)

Jedná se o skupinu autoprotilátek proti antigenům uvnitř neutrofilů. Nejčastěji proti proteináze 3 (PR3) a myeloperoxidáze (MPO). Ve vedlejších případech se můžou vyskytovat protilátky proti BPI (bacterial permeability increasing factor), laktoferinu, elastáze, lysozymu a katepsinu G. Antineutrofilní cytoplazmatické protilátky mají velký klinický význam při posuzování pacientů s cévními poruchami. ANCA jsou primárním znakem onemocnění, jako je granulomatózní polyangiitida (Wegenerova granulomatóza), mikroskopická polyangiitida, polyarteritis nodosa a Churg-Straussově syndrom. Jsou sekundárním znakem onemocnění, jako je revmatoidní artritida a SLE. Účinná léčba závisí na včasné rozpoznání těchto onemocnění, a proto je důležité provádět testy ANCA. Rozeznává-

me 3 typy ANCA: cytoplazmatické (c-ANCA), perinukleární (p-ANCA), atypické (a-ANCA). Každý typ je asociován s odlišnými vaskulárními poruchami. C-ANCA je sdružená převážně s pozitivitou proteinázy 3 a p-ANCA nejvíce s myeloperoxidázou. Atypická ANCA je popsána v souvislosti se smíšenou skupinou zánětlivých onemocnění včetně ulcerózní kolitidy, sklerotizující cholangitidy a poruch pojivové tkáně. A-ANCA reaguje s laktoferinem, elastázou, katepsinem G a BPI. [7, 17, 18]

1.7.1 Wegenerova granulomatóza

Onemocnění je pojmenováno podle otorinolaryngologa Friedricha Wegenera. Choroba je provázena zánětem cév, který způsobuje tvorbu granulomů. Následkem toho mají cévy tendenci k rozpadu. To se projevuje záněty lokalizovanými v horních a dolních cestách dýchacích, což se může projevit vykašláváním krve. Dále pacient může trpět zánětem ledvin a systémovou vaskulitidou. Ve více jak 90 % onemocnění prokazujeme pomocí laboratorního vyšetření c-ANCA, které reagují s enzymem primárních granul neutrofilů, proteinázou 3. K terapii se využívá účinnost steroidů a imunosupresiv. [4, 8]

1.7.2 Mikroskopická polyangiitida (MPA)

Toto autoimunitní onemocnění se projevuje akutním renálním selháním nebo postižením plic, opět s možným vykašláváním krve. MPA se vzácně vyskytuje u dětí, většinou postihuje osoby starší 50 let. V laboratoři nejčastěji prokazujeme protilátky p-ANCA, které reagují s myeloperoxidázou. [8]

1.7.3 Polyarteriitis nodosa (PAN)

Polyarteriitis nodosa je zánětlivé onemocnění, které se vyznačuje postižením malých a středních cév kůže, ledvin, periferních nervů, kardiovaskulárního a gastrointestinálního systému. Projevuje se zvýšenými teplotami až horečkami, bolestmi svalů a kloubů, erytémy, hypertenzí, v případě poškození gastrointestinálního traktu se může vyskytnout krvácení a dalšími příznaky. Toto onemocnění je vzácné a postihuje muže kolem 50. roka života. Etiologie je idiopatická. V určitých případech je spojena s virovými infekcemi (např. virem hepatitidy B). Laboratorně nalézáme pozitivitu c-ANCA. Onemocnění se léčí kortikosteroidy a při těžkých průbězích je kombinujeme s cyklofosfamidem. [8, 19]

1.7.4 Syndrom Churga-Straussové

Syndrom Churga-Straussové se nověji nazývá alergická granulomatózní angitida nebo eozinofilní granulomatóza s polyangiitidou. Jedná se o vzácné multisystémové autoimunitní onemocnění. Projevuje se v několika fázích, nejprve začíná bronchiálním astmatem a alergickými projevy, pokračuje zvyšující se eozinofilií a završena je systémovou

vaskulitidou. Syndrom poprvé popsali v roce 1951 Švédi Jakob Churg a Lotte Strauss. Onemocnění se projevuje astmatem, nosí polypózou, eozinofilii v krvi i tkáních a systémovou vaskulitidou. Laboratorně nacházíme ANCA protilátky ve 30-40 % případů. Většinou se jedná o p-ANCA. Při léčbě ANCA pozitivních vaskulitid je nejprve cíl navodit remisi onemocnění a dále léčbu udržovat. Obvykle podáváním kortikosteroidů a jinými imunosupresivy. [20, 21]

1.8 Metody stanovení autoprotilátek

Sledováním výskytu autoprotilátek v organismu přispíváme k diagnóze autoimunitního onemocnění a monitorování léčby pacienta. K jejich stanovení nejčastěji používáme enzymovou imunoanalýzu, imunoblot a nepřímou imunofluorescenci. [7]

1.8.1 Enzymová imunoanalýza (ELISA)

Jedná se o nepoužívanější imunologickou metodu k detekci a stanovení koncentrace antigenů nebo protilátek. ELISA metodu rozdělujeme dle způsobu detekce na přímou, nepřímou, sendvičovou a kompetitivní. V principu jde o imunoenzymatickou reakci, kdy je bezbarvý (chromogenní) substrát hydrolyzován na barevný produkt, který je následně měřen spektrofotometricky. K tomu využíváme protilátek konjugovaných s enzymem, který zviditelní reakci. Výsledná intenzita zabarvení koreluje s koncentrací vyšetřovaného antigenu nebo protilátky. [22]

1.8.2 Imunoblot

Imunoblot je metoda známá také pod názvem Western blot, pomocí níž dokážeme detekovat specifické proteiny ve vzorku tkáně nebo jiného biologického vzorku. Tato metoda se skládá z několika kroků. Nejprve provedeme elektroforézu v gelu, kde dochází k oddělení proteinů na základě velikosti a jejich náboje. Následně jsou přeneseny na nitrocelulózovou nebo PVDF membránu, která je inkubována s primární protilátkou. Rozlišujeme dva postupy detekce specifických proteinů: dvoukrokový a jednokrokový. Případě dvoukrokového se přidává na membránu sekundární protilátka konjugovaná s reportérovým enzymem, který ve výsledku umožní vizualizovat proteiny. V případě jednokrokové metody je reportérový enzym konjugován již s primární protilátkou. V závěru sledujeme přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt buď kolorimetricky nebo chemiluminiscenčně. [23]

1.8.3 Nepřímá imunofluorescence

Tato metoda je používána k vizualizaci specifických proteinů nebo jiných molekul v buňkách nebo tkáních pomocí fluorescenčních barviv a specifických protilátek. Výsledné preparáty následně školený pracovník vyhodnocuje pomocí fluorescenčního mikroskopu. Vyhodnocení fluorescenčních obrazů může být plně zautomatizováno, kdy výsledky musí být vždy kontrolovány laboratorním pracovníkem. Metoda je dále podrobněji popsána v samostatné kapitole. [2,24]

2 IMUNOFLUORESCENCE

Princip metody imunofluorescence vychází z kvantového jevu zvaného luminiscence, kdy pevná nebo kapalná látka spontánně emituje fotony. K tomu dochází pomocí vnějšího zdroje (např. UV světla). Ten vybudí atom do excitovaného stavu, který se následně vrátí do základního stavu. Luminiscenci dělíme podle délky vyzařování signálu na 2 podtypy: fluorescenci a fosforescenci. Fluorescence je schopna probíhat pouze po dobu působení vnějšího zdroje. Na rozdíl od fosforescence, která se koná určitou dobu i po odebrání zdroje. Počátky přímé imunofluorescence sahají do roku 1942, kdy Albert Coons a spol. prokázali značení protilátek proti pneumokokům fluoresceinem v plicní tkáni. Metoda imunofluorescence jako samotná je založena na vizualizaci reakce antigen-protilátka pomocí fluorescenčních barviv (fluorochromy). Podle detekce antigenů nebo protilátek ji dělíme na přímou a nepřímou. [2, 25, 26]

2.1 Přímá imunofluorescence

Se používá k detekci antigenů v tkáních pomocí fluorescenčně značených primárních protilátek. Vyšetřovaná tkáň se inkubuje s konjugovanou primární protilátkou, která se naváže na příslušné antigeny a ty ve výsledku sledujeme ve fluorescenčním mikroskopu. Přímou imunofluorescenci využíváme k vyšetření autoimunitních dermatologických onemocnění. [24]

2.2 Nepřímá imunofluorescence

Jedná se o tzv. dvoustupňovou metodu k průkazu autoprotiátek v séru pacienta. Nejprve používáme primární protilátku, která identifikuje cílové struktury. K tomu je zapotřebí substrát, kterým obvykle bývá tkáňový řez, buněčná suspenze nebo fixovaná tkáňová kultura. Následně detekujeme autoprotiátky v séru aplikací sekundární protilátky značené fluorochromem. Ta se specificky váže na primární protilátku a díky tomu výslednou fluorescenci autoprotiátek sledujeme ve fluorescenčním mikroskopu. [2]

2.3 Fluorochromy

Konjugované protilátky s fluorescenční látkou obvykle obsahují fluoresceinizo-thiokyanát (FITC). Jeho vlastností je charakteristické zelené světlo, které emituje po absorpci světla o vlnové délce 490 nm. Dalším typickým fluorochromem, co se používá v imunofluorescenci je tetrametylrhodamin (TRITC), jež se projevuje emitací červeného světla. [2]

2.4 Substráty

Pro vizualizaci specifických protilátek využíváme následující substráty (v závorce jsou uvedeny autoprottilátky, které jsou na substrátu detekovány): opičí jícen (endomysální protilátky), krysí ledviny (antimitochondriální protilátky), krysí žaludek (protilátky proti hladkému svalu – ASMA, proti parietálním buňkám), opičí ledvina (protilátky proti membráně glomerulů), opičí kosterní sval (ASMA), krysí játra a ledviny (protilátky proti mikrozomům jater a ledvin). [2]

K detekci nespecifických autoprottilátek proti dvoušroubovici DNA (ds-DNA) používáme *Crithidium lucilliae*. Jedná se o prvoka, který obsahuje kinetoplast, jenž obsahuje koncentrovanou dvoušroubovici DNA. [2]

Dále můžeme detekovat antinukleární protilátky, pro které byly dříve tradičním substrátem tkáň hlodavců, často játra s ledvinami a žaludek. Tyto substráty nahradily HEp-2 buňky. Jedná se o epitelální buňky pocházející z lidského karcinomu hrtanu. Jejich výhodou je, že jsou lidského původu, buňky mají velká jádra a jsou přítomny ve všech fázích buněčného cyklu. [11]

Autoprottilátky proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA) vyšetřujeme na subpopulaci lidských neutrofilních granulocytů. K tomu používáme etanolem (EOH) nebo formalinem fixované granulocyty (HCHO) a Hep-2 buňky. [17]

2.5 Fluorescenční mikroskop

Jedná se o světelný mikroskop, který nám umožňuje pozorovat fluoreskující látky ve vzorku. Fluorescenční mikroskop musí mít zabudovaný silný zdroj světla, kterým obvykle bývá rtuťová výbojka nebo LED dioda. Součástí mikroskopu je také excitační filtr, dichroické zrcadlo a emisní filtr. Díky tomu je ze světleného zdroje vybráno požadované rozmezí vlnových délek, jenž dopadají na vzorek a umožňují nám tak sledovat skrz okuláry výsledný signál. K mikroskopu by měla být připojena CCD kamera. Pomocí ní dokážeme pořídit trvalé snímky, které ve výsledku můžeme sdílet s ostatními laboratoři, pro případnou spolupráci. [27]

2.6 Fluorescenční mikroskop s digitálním zpracováním a vyhodnocením obrazů

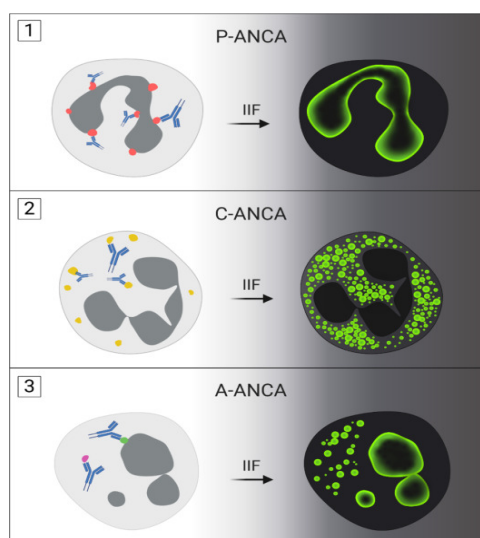
Ve své bakalářské práci jsem se zabývala výsledky z přístroje EUROPattern od výrobce Euroimmun. Zvládne automaticky generovat návrhy vyhodnocení obrazů, včetně

výpočtu titrů. K tomu dochází pomocí hlubokých konvolučních neuronových sítí. EURO-Pattern se skládá z plně automatizovaného mikroskopu se zásobníkem až 500 sklíček spolu se softwarem pro rozpoznávání vzorů. Během jedné hodiny zvládne naskenovat a vyhodnotit až 250 fluorescenčních obrazů. Výsledky jsou vyhodnoceny nejen jako pozitivní a negativní, ale také dokáže spolehlivě rozeznat různé typy ANA a ANCA protilátek. V případě ANA protilátek dokáže rozeznat až 9 typů fluorescence a jejich kombinace: homogenní, zrnitý, hustý jemně zrnitý, jádérka, jaderné tečky, centromerový, jadernou membránu, AMA a cytoplazmatický. U ANCA protilátek zvládne vyhodnotit všechny 3 typy fluorescence: c-ANCA, p-ANCA a atypickou ANCA. Zvládne také automaticky vyhodnotit jako pozitivní/negativní specifickou fluorescenci kinetoplastu pro detekci anti-dsDNA protilátek. [28]

2.7 ANCA vyhodnocení

U ANCA výsledků sledujeme 3 typy fluorescence: c-ANCA, p-ANCA, atyp-ANCA. Typ c-ANCA se vyznačuje zrnitou cytoplazmatickou fluorescencí EOH i HCHO granulocytů, které jsou spojené převážně s pozitivitou antigenu proteinázy 3 (PR3). Pro typ p-ANCA je charakteristická perinukleární fluorescence EOH granulocytů a zrnitá cytoplazmatická fluorescence HCHO granulocytů. Jsou asociovány především s pozitivitou myeloperoxidázy (MPO). A-ANCA můžeme hodnotit pouze při negativitě ANA. Vyznačuje se atypickou perinukleární, případně zrnitou cytoplazmatickou fluorescencí EOH granulocytů. HCHO granulocyty jsou negativní a pozitivita atyp-ANCA je specifická pro další známé i neznámé antigeny. [17]

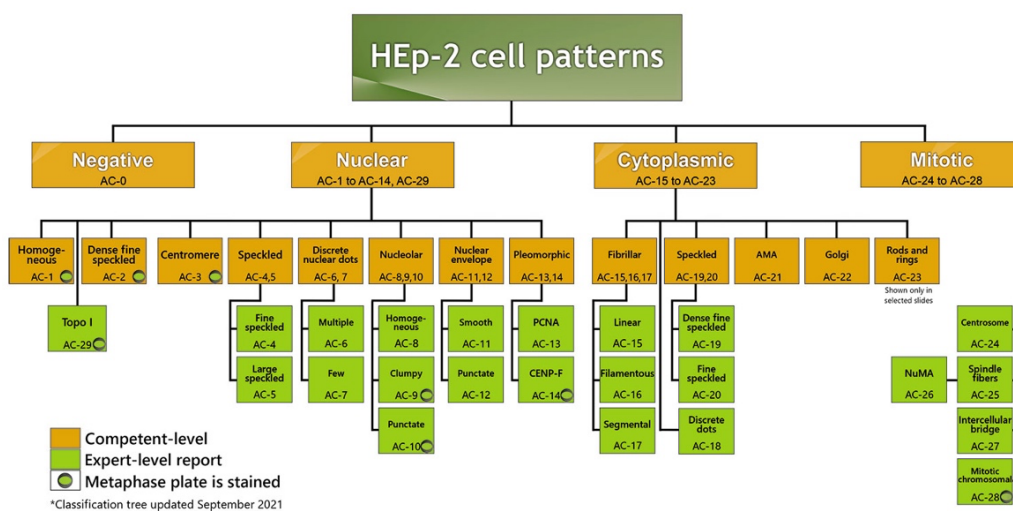
Obrázek 1: Typy fluorescence ANCA



2.8 Nomenklatura obrazů Hep-2 buněk

Při hodnocení vycházíme z mezinárodního konsensu ANA vzorů (ICAP). Na obrázku č. 2 je přehledná tabulka všech dosavadních vzorů, které se používají k diagnostice. Podrobněji je popsáno 9 typů, které automatický odečet dokáže sám rozeznat a kombinovat.

Obrázek 2: Přehled dělení ANA vzorů

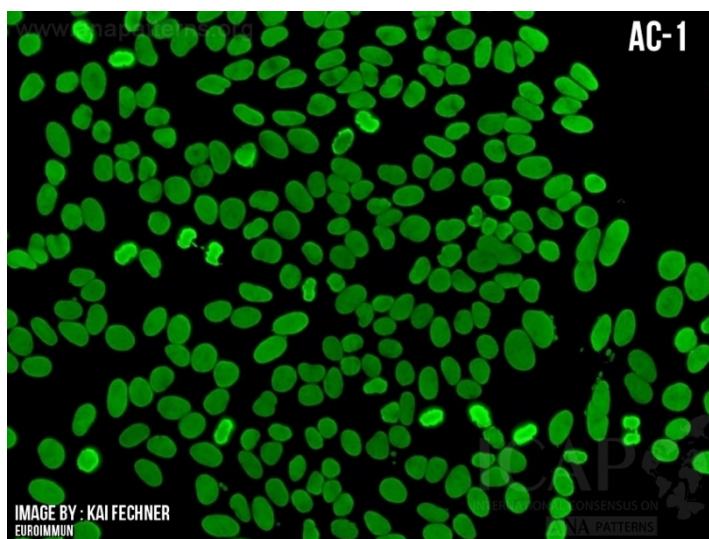


Zdroj: <https://www.anapatterns.org/trees-2021.php>

2.8.1 Homogenní fluorescence jader

Homogenní a rovnoměrná fluorescence v celé jaderné plazmě. Jádérka se mohou barvit i nebarvit v závislosti na buněčném substrátu. Mitotické buňky (metafáze, anafáze a telofáze) mají chromatinovou strukturu intenzivně obarvenou homogenním hyalinním odstínem. Vyskytuje se u pacientů se SLE, chronickou autoimunitní hepatitidou nebo juvenilní idiopatickou artritidou. Při klinickém podezření na SLE se doporučuje provést kontrolní test na anti-dsDNA protilátky. [29]

Obrázek 3: Homogenní fluorescence jader.

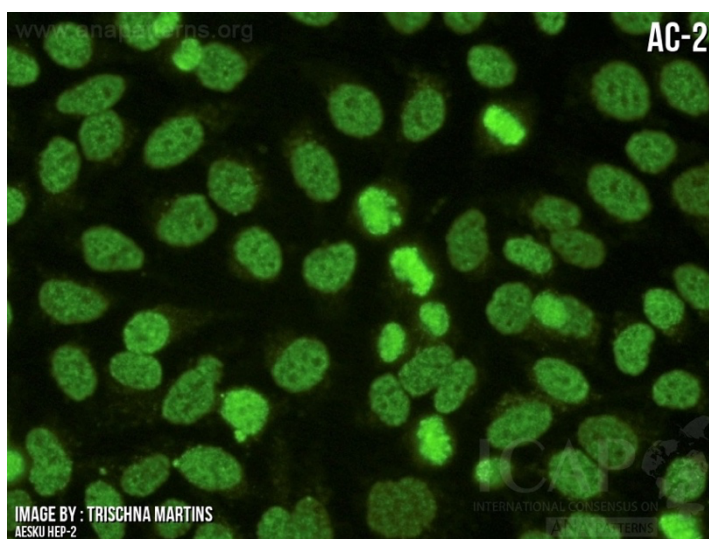


Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=1

2.8.2 Hustá jemně zrnitá fluorescence jader

Zrnitý obraz rozmístěný po celém interfázním jádře s charakteristickou heterogenitou ve velikosti, jasů a rozložení skvrn. V celém interfázním jádře se vyskytují hustší a volnější oblasti skvrn (velmi charakteristický rys). Metafázová destička zobrazuje silný skvrnitý vzor s některými vystupujícími hrubšími skvrnami. Běžně se vyskytuje jako HEp-2 NIF pozitivní ve vysokém titru u zdánlivě zdravých jedinců nebo u pacientů, kteří nemají systémové autoimunitní revmatické onemocnění (SARD). Negativní asociace se SARD platí pouze v případě, že se potvrdí, že autoreaktivita je zaměřena na DFS-70. [29]

Obrázek 4: Hustá jemně zrnitá fluorescence jader.

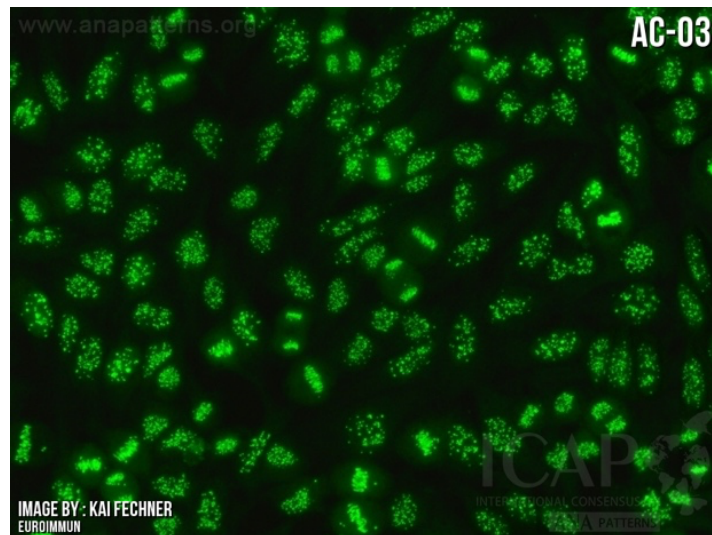


Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=2

2.8.3 Fluorescence centromer

Hrubé skvrny rozptýlené v interfázních buňkách a zarovnané v chromatinové hmotě na mitotických buňkách. Často se vyskytuje u pacientů s ohraničenou kožní SSc. [29]

Obrázek 5: Fluorescence centromer.

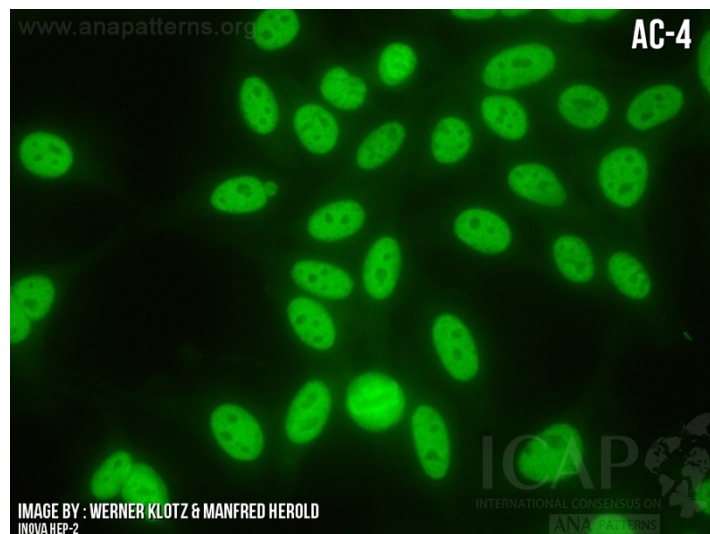


Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=3

2.8.4 Zrnitá fluorescence jader

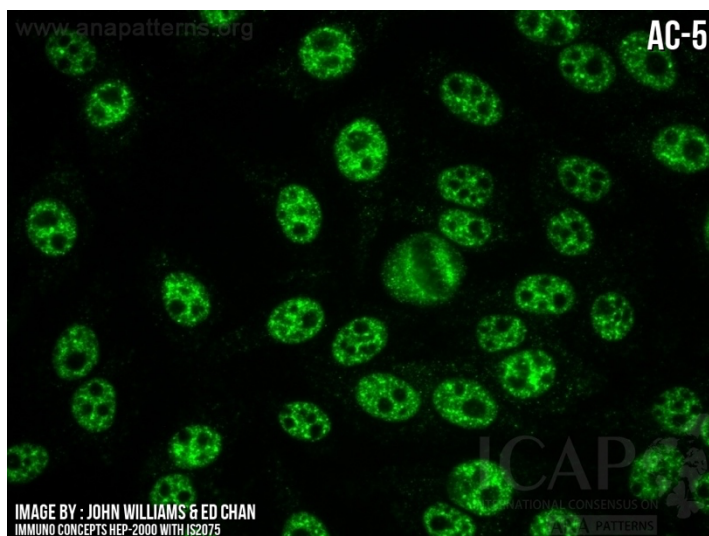
Nacházíme skvrny po celé nukleoplazmě. Mitotické buňky nemají chromatinovou hmotu obarvenou a nukleoly mohou být obarvené nebo neobarvené. Rozlišujeme ji na jadernou fluorescenci s velkými hrubými skvrnami a jemně zrnitou s drobnými skvrnkami v nukleoplazmě. [29]

Obrázek 6: Jemně zrnitá fluorescence jader s drobnými skvrnkami.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=4

Obrázek 7: Zrnitá fluorescence jader s hrubými skvrnami.

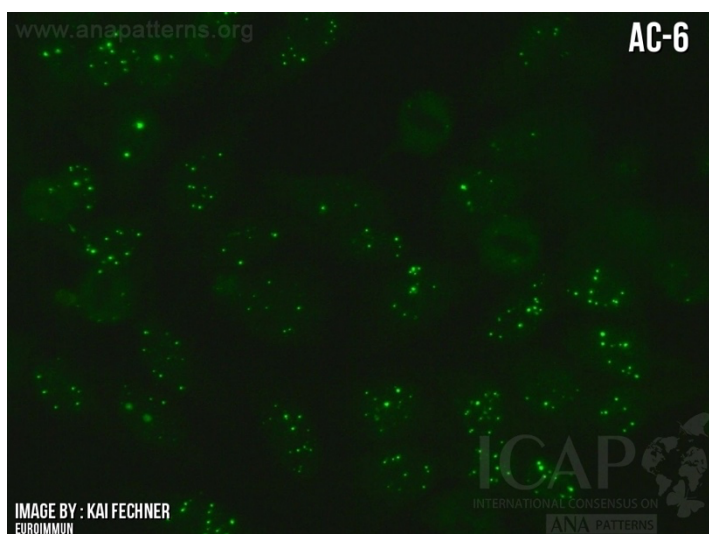


Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=5

2.8.5 Fluorescence jaderných teček

Spočitatelné diskontinuální jaderné tečky. Nacházíme buď četné jaderné tečky anebo ojedinělé. V případě ojedinělých teček se tato tělíska nazývají Cajalova a mají nízkou prediktivní hodnotu pro jakoukoli nemoc. Četné tečky se vyskytují u širokého spektra autoimunitních onemocnění, včetně primární biliární cholangitidy (PBC), diabetes mellitus a dalších zánětlivých stavů. [29]

Obrázek 8: Fluorescence četných jaderných teček.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=6

Obrázek 9: Fluorescence ojedinělých jaderných teček.

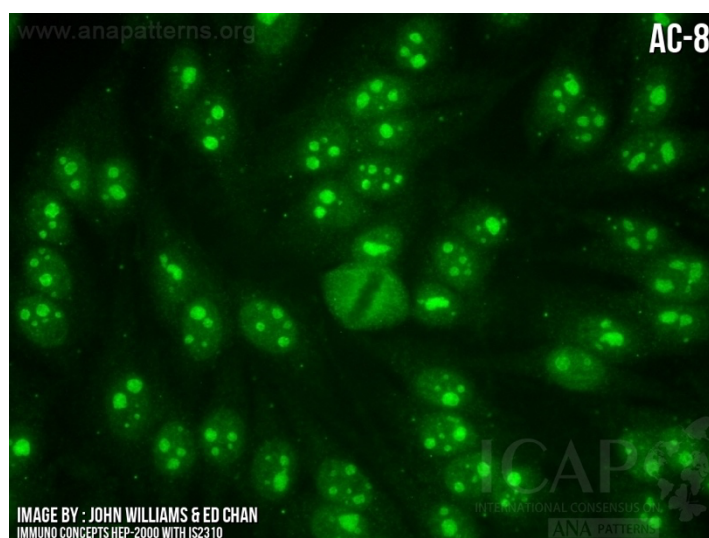


Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=7

2.8.6 Fluorescence jadérek

Rozlišujeme na homogenní, tečkovitou a chuchvalcovitou fluorescenci jadérek. Homogenní se vyznačuje difúzní fluorescencí celého jádra, zatímco metafázní destička nevykazuje žádné zbarvení. Vyskytuje se u pacientů se SSc a u pacientů s klinickými projevy SARD. Tečkovitá má nepravidelné zbarvení nukleolů a Cajalových tělísek s perichromozomálním vyznačením na metafázních destičkách. Nacházíme u pacientů se SSc. Chuchvalcovitá vykazuje hustě rozmístěná, ale zřetelná zrna, které můžeme vidět v nukleolech interfázních buněk. Cytoplazma mitotických buněk může být mírně pozitivní. Tento typ můžeme pozorovat u SSc, Raynaudova fenoménu a rakoviny. [29]

Obrázek 10: Homogenní fluorescence jadérek.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=8

Obrázek 11: Tečkovitá fluorescence jadérek.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=9

Obrázek 12: Chuchvalcovitá fluorescence jadérek.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=10

2.8.7 Fluorescence jaderné membrány

Rozlišujeme chuchvalcovitou fluorescenci jaderné membrány a homogenní. Ta vykazuje homogenní zbarvení jádra s větší intenzitou na jeho vnějším okraji a bez zbarvení na chromatinových destičkách v metafázi a anafázi. V místech, kde se sousední buňky vzájemně dotýkají, dochází ke zvláštnímu zvýraznění fluorescence. U chuchvalcovitého typu můžeme pozorovat bodové barvení v interfázních buňkách se zvýrazněním v místech, kde

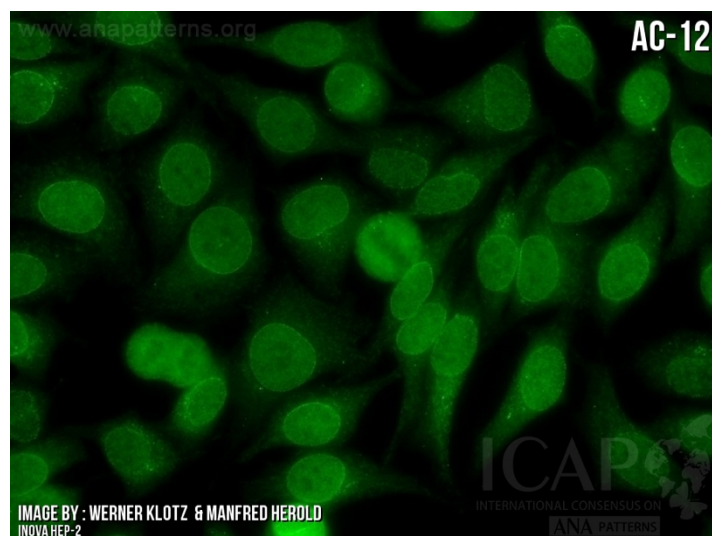
se buňky vzájemně překrývají. Chromatinové destičky se také v metafázi a anafázi nebarví. Vyskytuje se u pacientů s PBC a jinými jaterními chorobami. [29]

Obrázek 13: Homogenní fluorescence jaderné membrány.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=11

Obrázek 14: Chuchvalcovitá fluorescence jaderné membrány.



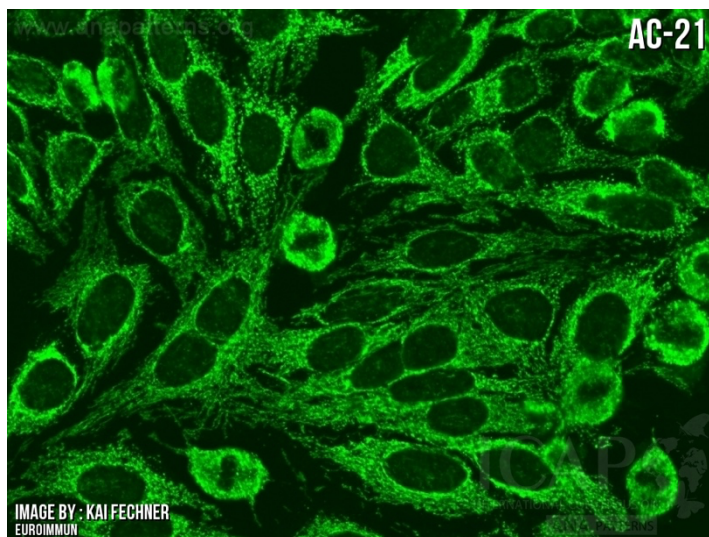
https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=12

2.8.8 Pozitivní fluorescence cytoplazmy

Analyzátor EUROPattern z typů fluorescencí cytoplazmy rozeznává konkrétně pouze cytoplazmatickou retikulární fluorescenci (AMA). Ta se projevuje jako hrubozrnné vláknité zbarvení táhnoucí se celou cytoplazmou. např. antimitochondriální protilátky. Běžně se vyskytují u PBC, ale i u SSc. Dále rozeznáváme cytoplazmatickou fibrilární flu-

orescenci, zrnitou, pozitivitu proti antigenům Golgiho aparátu, tyče a kroužky v cytoplazmě. Tyto zmíněné typy analyzátor nezvládne určit, ale rozezná, zdali je cytoplazma pozitivní anebo negativní. [29]

Obrázek 15: Pozitivní fluorescence cytoplazmy.



Zdroj: https://www.anapatterns.org/view_pattern.php?pattern=21

PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část bakalářské práce byla vykonána v únoru 2023 na pracovišti Ústavu klinické alergologie a imunologie ve Fakultní nemocnici Plzeň. Zaměřila jsem se na vyšetření ANA a ANCA protilátek metodou nepřímé imunofluorescence.

3 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

3.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem bylo zjistit, zda hodnocení pomocí automatického odečtu poskytuje shodné výsledky jako pomocí fluorescenčního mikroskopu.

3.2 Dílčí cíle

1. Ověřit shodu pro ANA protilátky
2. Ověřit shodu pro ANCA protilátky
3. Porovnat časovou náročnost odečtu
4. Zhodnotit způsoby hodnocení z pohledu analýzy rizik

4 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. Jsou výsledky typu fluorescence ANA protilátek z automatického odečtu shodné s výsledky z fluorescenčního mikroskopu?
2. Jsou výsledky fluorescence ANCA protilátek z automatického odečtu shodné s výsledky z fluorescenčního mikroskopu?
3. Shodují se výsledky protilátek proti antigenu DFS-70 při použití imunofluorescence a přesnější metody imunoblot?
4. Je automatický odečet z časového hlediska provedení metody úspornější, než mikroskopický odečet?
5. Jaká jsou rizika v klinické laboratoři a jaké nastolit vůči nim preventivní opatření?
6. Je použití diagnostického setu pro automatický odečet z ekonomické charakteristiky výhodnější, než pro manuální odečet?

5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

V praktické části bakalářské práce jsem se zabývala čtyřmi složkami: metodickou, analytickou, procesní a ekonomickou. Metodicky jsem shrnula pracovní postup a vyhodnocení automatického odečtu ANA i ANCA protilátek. V analytické části jsem pracovala se vzorky, které byly zpracovány rutinně za běžného chodu laboratoře. Celkem jsem porovnávala 101 výsledků nasbíraných z období 20. – 22. 2. 2023, kde nebyl kladen důraz na pohlaví či jiné rozlišovací podtřídy. Většina vzorků byla vyšetřována na ANA a zbylá část na ANCA protilátky. Všechny vzorky byly anonymizované. Dále jsem analyticky porovnávala shodu pozitivních výsledků autoprotilátek proti antigenu DFS-70 z automatického odečtu s výsledky metody imunoblot. Zpracovala jsem procesní mapu automatického a mikroskopického odečtu. Shrnula jejich časovou náročnost a vyhodnotila rizika s tím spojená. Následně jsem určila preventivní opatření. V ekonomické části jsem porovnávala výhody/nevýhody vyšetření ANA a ANCA protilátek pomocí automatického a mikroskopického odečtu.

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Automatické vyšetření ANA a ANCA pomocí nepřímé imunofluorescence

Pro vyšetření ANA a ANCA byl využit diagnostický set dodaný od firmy Euroimmun, který obsahuje diagnostická sklíčka, protilátky značené FITC, pozitivní a negativní kontroly, soli do PBS, Tween 20, montovací médium a krycí skla. Testovací políčka na diagnostických sklíčkách se inkubují se zředěným vzorkem pacienta. V případě pozitivní reakce dochází k navázání antigenů na specifické protilátky tříd IgA, IgG a IgM. V následujícím kroku se navázané protilátky obarví protilátkami proti lidským antigenům značenými FITC, které poté pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu. [30]

6.1.1 Přístrojové vybavení

K diagnostice ANA a ANCA protilátek nepřímou imunofluorescencí byly použity následující přístroje:

- Vortex V-1 plus, výrobce Biosan
- IF Sprinter, výrobce Euroimmun
- EUROPattern, výrobce Euroimmun

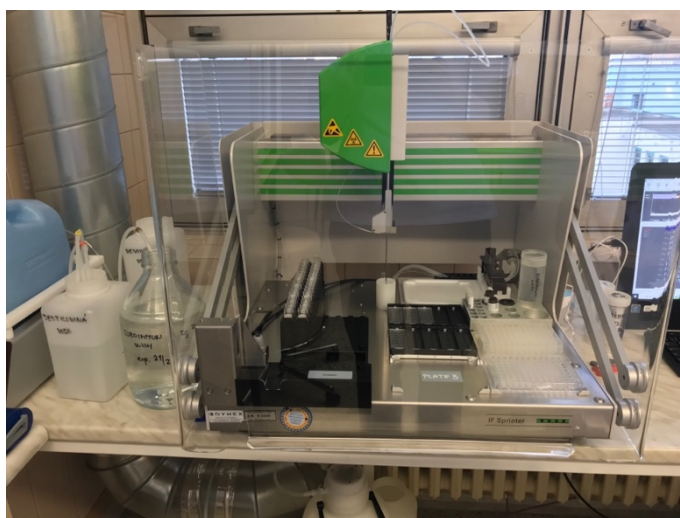
V rámci vyšetření pracujeme v programu EUROLabOffice 4. 0, který je propojen s Euroimmun přístroji a zároveň snadno a rychle přenáší vyhodnocená data do laboratorního informačního systému (LIS).

Obrázek 16: Vortex V-1 plus, Biosan.



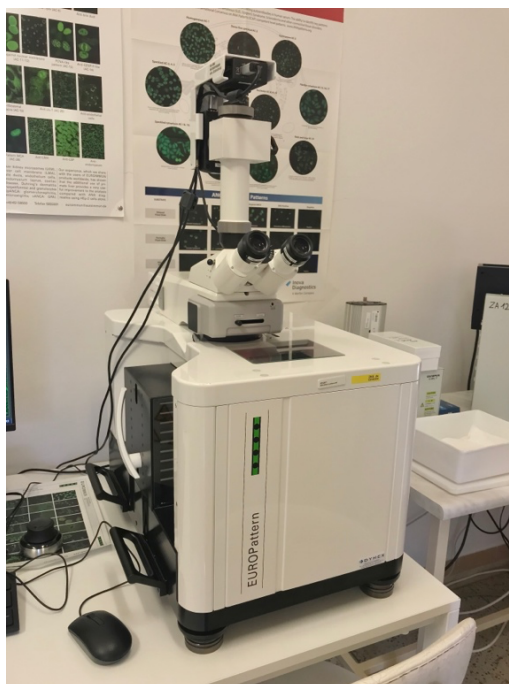
Zdroj: Autor, ÚIA FN Plzeň, 2023.

Obrázek 17: IF Sprinter, Euroimmun.



Zdroj: Autor, ÚIA FN Plzeň, 2023.

Obrázek 18: EUROPattern, Euroimmun.



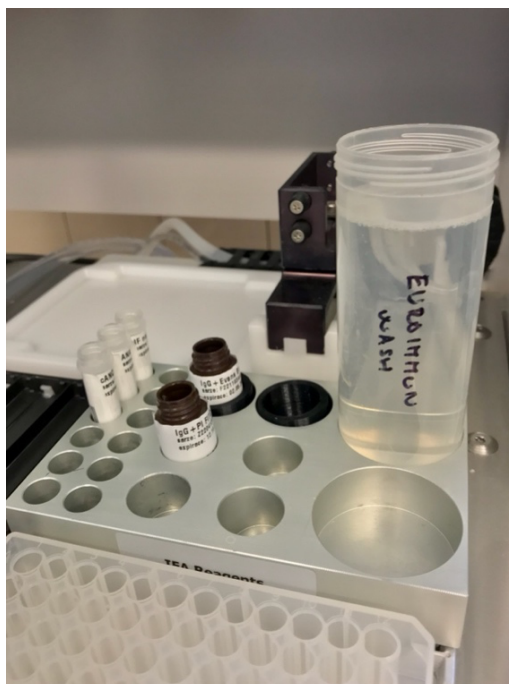
Zdroj: Autor, ÚIA FN Plzeň, 2023.

6.1.2 Pracovní postup

1. Před začátkem vyšetření zkontrolujeme IF Sprinter. V jeho zásobníku musí být dostatek destilované vody a promývacího roztoku PBS-Tween, který připravujeme čerstvý každý den.
2. PBS-Tween připravíme rozpuštěním jednoho sáčku soli do PBS z diagnostického setu (1 sáček = 10,2 g soli) v 1000 ml destilované vody. Do roztoku následně přimícháme 2 ml Tween 20. Mícháme přibližně 20 minut, dokud nevznikne homogenní roztok. Odlijeme 100 ml do plastové zkumavky a zbytek použijeme jako zásobní roztok.
3. Z LIS vytiskneme laboratorní protokol, který slouží ke kontrole vyšetření a identifikaci zkumavek. K diagnostice ANA a ANCA používáme patientské sérum odebrané do červené zkumavky s gelem. Před vyšetřením vzorky necháme centrifugovat, aby došlo k oddělení séra od krevní sraženiny.
4. Připravené a zkontrolované vzorky postupně promícháme na vortexu, vložíme do stojánek a umísíme do načítacích pozic. Načtením čárových kódů zkumavek se importují data do softwaru EUROLabOffice a dále pokračujeme podle pokynů na monitoru.

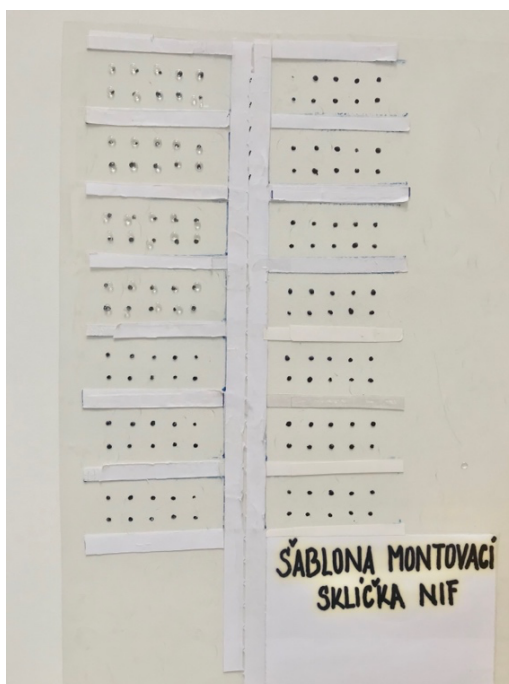
5. Do přístroje IF Sprinter umístíme diluční a titrační destičku na příslušná místa.
6. Vybalíme sklíčka z ochranného obalu a umístíme do stojánků. Před vložením stojánků na vyznačená místa PLATE 1–3 načteme sklíčka do systému pomocí QR kódů. ANA skla obsahují biočipy potažené HEp-2 buňkami a opičími játry. Sklíčka na vyšetření ANCA obsahují substráty: etanolem fixované granulocyty (EOH), formalinem fixované granulocyty (HCHO) a HEp-2 buňky + EOH granulocyty.
7. Připravenou zkumavku s PBS-Tween umístíme na pozice s reagensy.
8. Do reagenčních míst umístíme také pozitivní a negativní kontroly společně s protilátkami značenými FITC (propidium jodid, evans blue)
9. Zkontrolujeme pozice a spustíme IF Sprinter. ANA vyšetření se provádí v základním titru séra 1:100, ANCA v titru 1:10. Po spuštění začíná automatický proces pipetování, inkubace a promývání, jenž trvá přibližně 90 minut. Celý tento postup může být zpracován manuálně, ale v laboratořích se dnes už tak často nevyužívá.
 - I. Přístroj napipetuje 30 μ l naředěného séra na reakční pole destičky.
 - II. K reakci dochází, když sklíčka s biočipy překryjí reagenční destičku. Následně se inkubují 30 minut při pokojové teplotě a tím dochází k navázání primárních protilátek.
 - III. Po navázání se promývají sklíčka zhruba 5 minut v roztoku PBS-Tween, abychom je zbavili nenavázaných protilátek.
 - IV. Dále přístroj napipetuje 25 μ l konjugátu na každé pole reagenční destičky.
 - V. Reagenční destička s konjugáty se překryje sklíčky a následuje inkubace 30 minut při pokojové teplotě bez přístupu světla. Během inkubace dochází k navázání sekundárních protilátek.
 - VI. Na závěr se skla s biočipy opět promyjí přibližně 5 minut v roztoku PBS-Tween.

Obrázek 20: Připravené reagentie umístěné na příslušných pozicích v přístroji IF Sprinter.



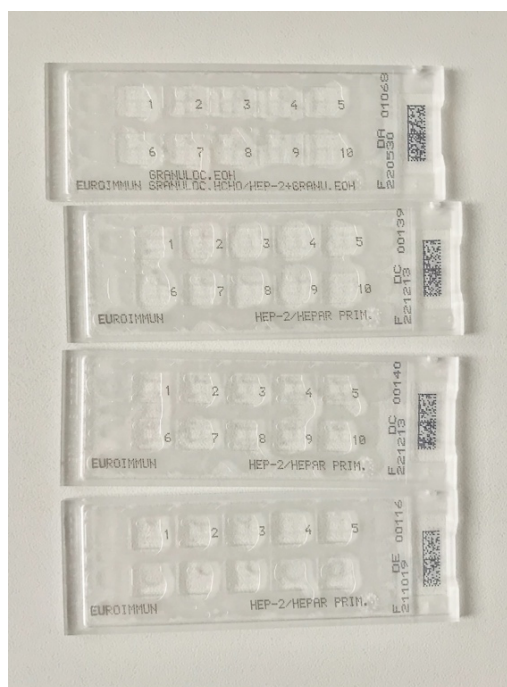
Zdroj: Autor, ÚIA FN Plzeň, 2023.

Obrázek 21: Šablona na montování sklíček NIF.



Zdroj: Autor, ÚIA FN Plzeň, 2023.

Obrázek 22: Zhotovená sklíčka připravená ke skenování.



Zdroj: Autor, ÚIA FN Plzeň, 2023.

6.1.3 Vyhodnocení

Výsledky ANA jsou vyhodnoceny jako negativní, hraniční a pozitivní. Negativní nevykazují žádnou fluorescenci, u hraničních sledujeme slabou fluorescenci a u pozitivních pozorujeme jasně viditelnou fluorescenci. Intenzitu fluorescence uvádíme v titrech 1:320, 1:640, 1:1000 a 1:1280. Pokud vyjde vzorek hraniční nebo pozitivní, je k výsledku uveden typ fluorescence. Pokud je pozitivní cytoplazma, je taktéž popsán typ fluorescence cytoplazmy. Na pracovišti Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň se při hodnocení fluorescenčních obrazů vychází z mezinárodního konsensu ANA vzorů (ICAP). [31]

U ANCA výsledků sledujeme 3 typy fluorescence: c-ANCA, p-ANCA, atyp-ANCA. Typ c-ANCA se vyznačuje zrnitou cytoplazmatickou fluorescencí EOH i HCHO granulocytů. Pro typ p-ANCA je charakteristická perinukleární fluorescence EOH granulocytů a zrnitá cytoplazmatická fluorescence HCHO granulocytů. Atyp-ANCA můžeme hodnotit pouze při negativitě ANA. Vyznačuje se atypickou perinukleární, případně zrnitou cytoplazmatickou fluorescencí EOH granulocytů. HCHO granulocyty jsou negativní a pozitivita atyp-ANCA je specifická pro další známé i neznámé antigeny. [17]

7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

7.1 Porovnání vyhodnocení ANA a ANCA protilátek nepřímou imunofluorescencí

Vyhodnocení bylo prováděno celkem na 101 vzorcích. 67 z nich se vyšetřovalo na ANA protilátky a 34 vzorků na ANCA protilátky. Výsledky jsou rozlišeny na shodné, editované a neshodné. Rozdělení je znázorněno v tabulkách 1 a 2. Toto členění je odrazem jejich shody mezi počítačem řízenou fluorescenční mikroskopií a subjektivním hodnocením laboratorního pracovníka.

Jestliže vydaný výsledek z automatického odečtu se na 100 % shodoval s výsledkem od školeného laboratorního pracovníka, v tabulkách 1 a 2 je označen jako shodný.

O editovaný vzorek se jedná v případě, že se výsledek shodoval s automatickým odečtem pouze z části a pracovník dále musel upřesnit typ fluorescence. Toto se týká pouze vyšetření ANA protilátek, jelikož analyzátor zvládne rozeznat pouze 9 typů fluorescence a jejich vzájemné kombinace. V případě ANCA protilátek dokáže rozeznat všechny 3 typy positivity.

Jako neshodné jsou označeny všechny výsledky, u kterých automatický odečet ani z části nedokázal vyhodnotit správnou fluorescenci. Laborant tak ve výsledku vydal jiný typ fluorescence než umělá inteligence.

Tabulka 1: Laboratorně zjištěné hodnoty pro ANA protilátky.

Výsledky	Shodné	Editované	Neshodné
Pozitivní/hraniční	29 (cca 43 %)	17 (cca 25 %)	4 (cca 6 %)
Negativní	13 (cca 19 %)	0	4 (cca 6 %)

Zdroj: Autor podle dat z ÚIA FN Plzeň, 2023.

Tabulka 2: Laboratorně zjištěné hodnoty pro ANCA protilátky.

Výsledky	Shodné	Editované	Neshodné
Pozitivní/hraniční	10 (cca 29 %)	0	4 (cca 12 %)
Negativní	17 (cca 50 %)	0	3 (cca 9 %)

Zdroj: Autor podle dat z ÚIA FN Plzeň, 2023.

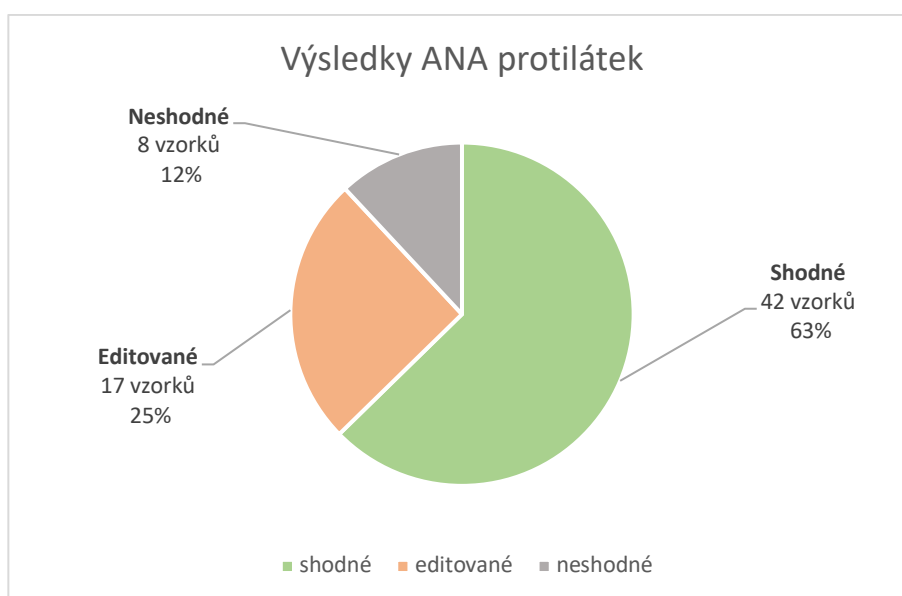
7.1.1 Vyhodnocení ANA protilátek

Z tabulky 1 je patrné, že 63 % výsledků ANA z automatického odečtu se plně shodovalo s odečtem laboranta. Z toho 29 % testů vyšlo správně pozitivních nebo hraničních a 13 % bylo vyhodnoceno jako správně negativní.

17 vzorků bylo editovaných. Z toho vyplývá, že 25 % výsledků automatický odečet vyhodnotil správně pozitivitu, ale pouze z části typ fluorescence.

Celkem 8 z 67 výsledků automatického odečtu se neshodovalo s vyhodnocením od laboratorního pracovníka. To činí 12 % nesprávných výsledků, z toho 6 % výsledků vyšlo falešně pozitivních nebo hraničních a 6 % výsledků vyšlo falešně negativních. Výsledky jsou shrnuty v grafu 1.

Graf 1: Výsledky ANA protilátek vyhodnocené automatickým odečtem a následně porovnané s manuálním mikroskopickým odečtem.



Zdroj: Autor podle dat z ÚIA FN Plzeň, 2023.

7.1.2 Vyhodnocení ANCA protilátek

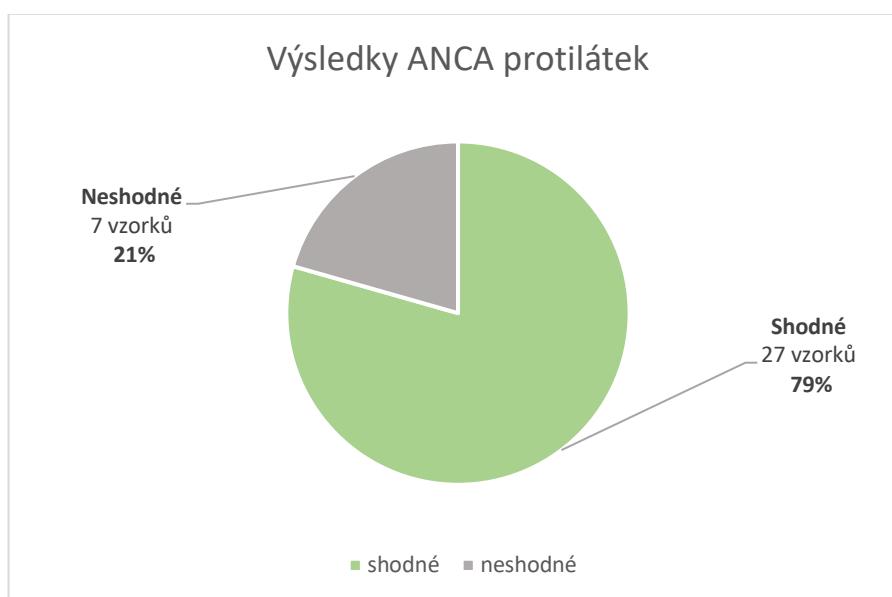
Jelikož přístroj zvládne určit správně všechny 3 typy fluorescence, nejsou proto žádné vzorky, které by ve výsledku byly editovány laborantem. Vyhodnocení jsou tedy pouze shodné a neshodné.

Celkem 27 vzorků ze 34 podle tabulky 2 vyšlo shodných. To znamená, že 79 % výsledků vyhodnocených automatickým odečtem se shodovalo s výsledky od školeného labo-

ratorního pracovníka. Z nich 29 % bylo vyhodnoceno jako správně pozitivní/hraniční a 50 % jako správně negativní.

Zbylých 7 vzorků bylo automatickým odečtem vyhodnoceno chybně. Z toho vyplývá, že z celkových 21 % nesprávných výsledků jich přibližně 12 % vyšlo falešně pozitivní/hraniční a přibližně 9 % falešně negativní. Výsledky jsou shrnuty v grafu 2.

Graf 2: Výsledky ANCA protilátek vyhodnocené automatickým odečtem a následně porovnané s mikroskopickým odečtem.

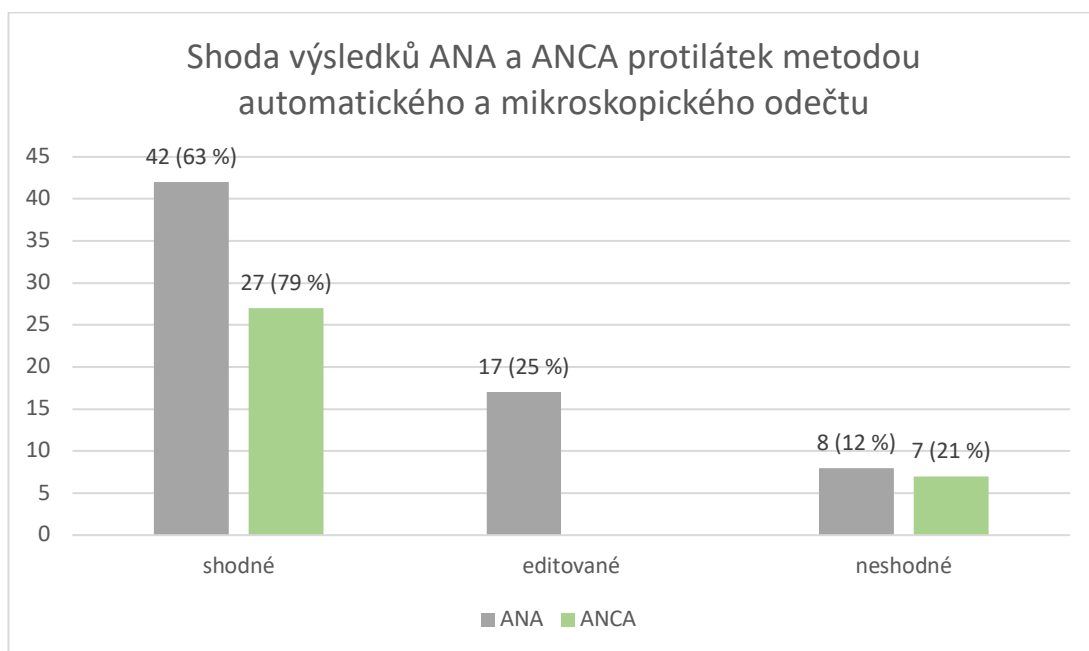


Zdroj: Autor podle dat z ÚIA FN Plzeň, 2023.

7.1.3 Interpretace výsledků

Z grafu 3, kde je shrnuta četnost shodných, editovaných i neshodných výsledků, jak pro ANA, tak pro ANCA protilátky vyplývá, že výsledné hodnoty pro shodné výsledky se od sebe liší o 16 % a neshodné pouze o 9 %. Nemůžeme s přesností určit, jestli vyšetření ANA nebo ANCA protilátek je přesnější, jelikož je soubor výsledků zatížený editovanými vzorky. Ve výsledku ale víme, že ANA protilátky jsou shodné s automatickým odečtem z 63 % a ANCA ze 79 %.

Graf 3: Shoda výsledků ANA a ANCA protilátek metodou automatického odečtu a mikroskopického odečtu.



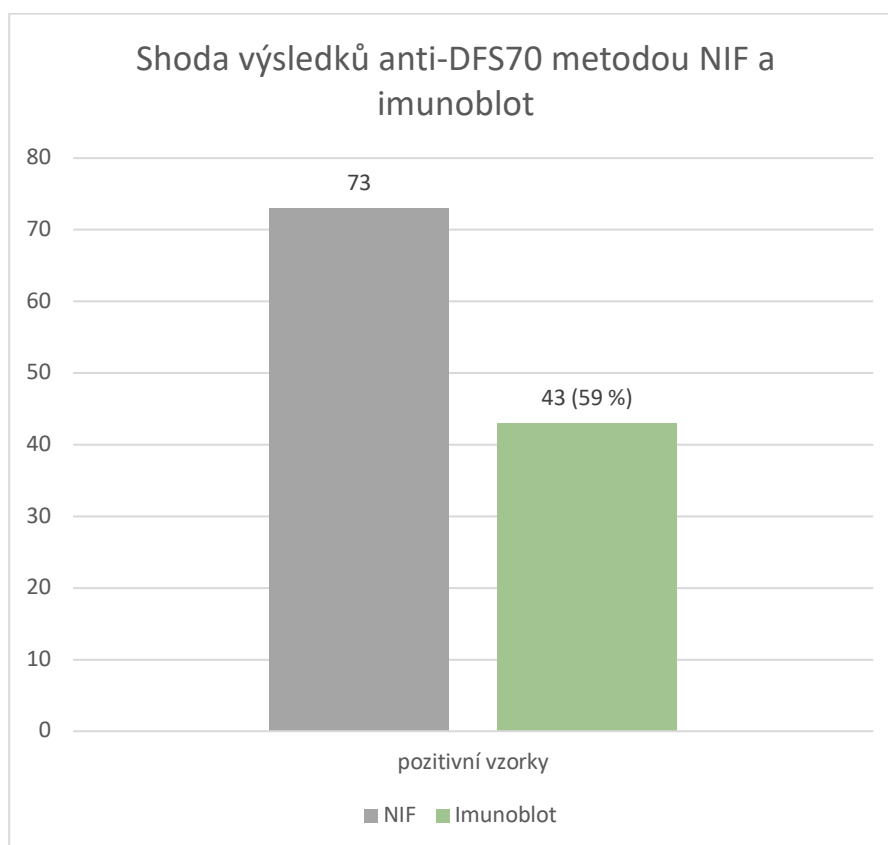
Zdroj: Autor podle dat z ÚIA FN Plzeň, 2023.

7.2 Porovnání vyhodnocení autoprotilátek proti antigenu DFS-70 pomocí metod nepřímé imunofluorescence a imunoblot

V rámci vyšetření ANA protilátek nepřímou imunofluorescencí se může objevit pozitivita autoprotilátek proti antigenu DFS-70. Pro něj je charakteristický typ fluorescence: jemně zrnitý obraz s negativními jádérky a pozitivní chromatinovou ploténkou. Tato pozitivita je následně ověřována metodou imunoblot.

Vycházela jsem z vyšetřovaných vzorků na ANA protilátky metodou nepřímé imunofluorescence z období od 1. 1. 2022 do 20. 2. 2023. Vyšetření byla vykonána na ÚIA FN Plzeň. To činilo 6896 testů, z kterých 73 vyšlo pozitivních na anti-DFS70. Ty následně byly upřesněny metodou imunoblot, podle které se ukázalo, že 43 vzorků vyšlo správně pozitivních a zbylých 30 vzorků nepřímá imunofluorescence vyhodnotila jako falešně pozitivní. Výsledky jsou znázorněny v grafu 4 a je z nich patrné, že nepřímá imunofluorescence se s metodou imunoblot za více než roční období shoduje z 59 %.

Graf 4: Shoda výsledků anti-DFS70 metodou nepřímé imunofluorescence a imunoblot.



Zdroj: Autor podle dat z ÚIA FN Plzeň, 2023.

7.3 Procesní mapa metod

Pomocí procesní mapy jsem se snažila vyhodnotit časovou náročnost metod automatického a mikroskopického odečtu. Proces je zaznamenán v příloze A. Nejprve se provede příjem, identifikace a zpracování vzorků, což v průměru zabere přibližně 8 minut v závislosti na množství dodaných vzorků. Dále během 2 minut importujeme data z LIS. Po importu dat v případě automatického odečtu se přechází rovnou k vyšetření vzorků pomocí přístroje IF Sprinter, které zabere přibližně 90 minut. V rámci mikroskopického odečtu mezi těmito dvěma kroky musíme vytvořit pracovní protokol. Tento proces trvá cca 15 minut.

Zpracované vzorky IF Sprinterem automatický odečet skenuje přibližně 45 minut. V porovnání s tím mikroskopický odečet trvá přibližně 60 minut a laborant zaznamená výsledky do připraveného pracovního protokolu. Výsledky následně během 20 minut zapíše do LIS, přičemž se může vyskytnout chybovost následkem ručního přepisování dat. Výsledná data z automatického odečtu kontroluje laboratorní pracovník a vyhodnocuje při-

blíže 30 minut. Veškeré výsledky exportuje do LIS, což časově zabere maximálně 2 minuty. Následně se v případě obou metod kontrolují všechna vyhodnocená data přibližně 20 minut v LIS.

V případě positivity, následuje titrace vzorků, která je v rámci automatického odečtu prováděna samočinně. Pokud odečítáme mikroskopicky, titrace je pozdržena o 24 hodin a provádí se následující den.

Ve výsledku tedy automatický odečet probíhá celkem 197 minut a mikroskopický odečet 225 minut. Ze souhrnu vyplývá, že mikroskopický odečet v případě negativních výsledků je zhruba o 28 minut delší než automatický odečet. Pokud ovšem připočítáme i vliv pozitivních výsledků, tak musíme předpokládat 24 hodinou prodlevu.

Obrázek 23: Procesní mapa hodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.

Zdroj: Autor, podle metodiky ÚIA FN Plzeň, 2023.

7.4 Analýza rizik

Analýza rizik je nedílnou součástí správného fungování klinické laboratoře. Významnost a pravděpodobnost rizika jsou bodovány od 1 do 5. Čím vyšším číslem je riziko ohodnoceno, tím pravděpodobnější a silnější důsledek má na laboratoř. Hodnoty bodování jsou podrobněji vysvětleny v tabulce 3. Vynásobením významnosti a pravděpodobnosti získáme hodnotu míry rizika, která může být vysoká, střední a nízká. Toto rozdělení je znázorněno na obrázku 9, podle kterého výsledná hodnota v rozmezí 16–25 určuje míru rizika jako kritickou s vysokým dopadem na laboratoř. Jestliže se hodnota pohybuje v rozmezí 12–15, vliv na chod laboratoře je závažný, ale nikterak kritický. V případě, že je hodnota míry rizika menší než 12, činnost laboratoře je ovlivněna jen z mála. [32]

Tabulka 3: Hodnoty významnosti a pravděpodobnosti rizika.

Významnost rizika (VV)		Pravděpodobnost výskytu rizika (PVV)	
1	zanedbatelné	1	téměř vyloučené
2	nevýznamné	2	Nepravděpodobné
3	střední	3	Možné
4	významné	4	pravděpodobné
5	kritické	5	Jisté

Zdroj: <https://www.vlastnicesta.cz/metody/analyza-rizik-risk/>

Obrázek 24: Členění hodnot míry rizika.

Dopady rizika	5	5	10	15	20	25	vysoká
	4	4	8	12	16	20	
	3	3	6	9	12	15	střední
	2	2	4	6	8	10	
	1	1	2	3	4	5	nízká
		1	2	3	4	5	
		Pravděpodobnost výskytu rizika					

Zdroj: <https://www.vlastnicesta.cz/metody/analyza-rizik-risk/>

7.4.1 Přehled vybraných rizik k metodě nepřímé imunofluorescence

Vybrala jsem celkem 5 rizik, která mohou mít vliv na vyšetření metodou nepřímé imunofluorescence. Všechna jsou vypsána v tabulce 4 společně s následky, preventivními opatřeními, hodnotami významnosti (VV) a pravděpodobnosti výskytu rizika (PVV).

V preanalytické části hrozí, že personál odebere nedostatečné množství vyšetřovaného materiálu. V tomto případě nelze provést některé analýzy, jako tomu je u automatického pipetování patientského séra u nepřímé imunofluorescence, kdy potřebujeme ideálně 200 μ l. Na rozdíl u ručního pipetování stačí značně menší množství a to 20 μ l. Míra rizika na provoz laboratoře je nízká, jelikož máme záložní možnost, kterou je manuální zpracování vzorku. Riziku lze ale předejít správnou informovaností odebírajícího personálu.

Nefunkčnost analyzátorů je dalších rizikem, které může nastat v běžném chodu laboratoře. Je schopna zapříčinit opožděné vydání výsledků, což snadno ovlivňuje situaci na pracovišti. Ve výsledku toto riziko, ale není nikterak závažné, jelikož vzorky mohou být náležitě manuálně zpracovány a vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Je proto nutné, aby personál byl připraven na záložní metodu analýzy, než se na pracoviště dostaví servis. Vhodným předcházením rizika je správná a pravidelná údržba analyzátorů.

V laboratoři může nastat situace, kdy nebude dostatek reagentů. Toto riziko zapříčiní opožděné vydání některých výsledků. Můžeme tomu zamezit správným hospodařením se skladovými zásobami a jejich pravidelnému doplňování.

Velmi významným rizikem je nesprávné odečtení výsledku. Je ovšem malá pravděpodobnost, že by tato okolnost nastala. Nesprávné odečtení zapříčiní chybný výsledek, který může vést ke špatné interpretaci anamnézy. Předcházíme tomu školením personálu, prováděním interní kontroly kvality a účastí v externím hodnocení kvality.

Dále hrozí, že personál chybně přepíše výsledky do LIS. Toto může nastat při mikroskopickém hodnocení, kdy veškeré hodnoty zapisujeme do protokolu a ty následně manuálně přepisujeme do LIS. Takto nesprávný výsledek opět může vést ke špatné interpretaci anamnézy. Chybnému výsledku můžeme zabránit kontrolou přepsaných údajů s pracovním protokolem a použitím k odlišení výrazná čísla.

Tabulka 4: Přehled rizik, která mohou mít vliv na NIF.

Rizika	Následky	VV	PVV	Míra rizika
malé množství materiálu	nelze provést určité analýzy	1	2	2 (nízká)
nefunkčnost analyzátorů	opožděné vydání výsledků	2	2	4 (nízká)
nedostatek reagentů	opožděné vydání výsledků	2	2	4 (nízká)
chybně odečtený výsledek	chybný výsledek	4	1	4 (nízká)
záměna výsledků	špatně přiřazené výsledky	4	1	4 (nízká)

Zdroj: Autor podle specifik ÚIA FN Plzeň, 2023.

7.5 Ekonomická rozvaha

Na vyšetření ANA a ANCA protilátek jsou rozdílné náklady, jak u metody automatického, tak i mikroskopického odečtu. Pro automatický odečet se na pracovišti ÚIA FN Plzeň používá diagnostický kit obsahující 2 protilátky narozdíl od mikroskopického, kde se vyšetřuje pomocí jedné protilátky. Počet protilátek tedy zásadně ovlivňuje cenu 1 vykonaného testu. Každý set obsahuje 20 sklíček, na kterých je 10 reakčních políček. 8 políček slouží na průkaz protilátek a zbylé 2 jsou vždy negativní a pozitivní kontrola. V tabulce 5 jsou vypsány pořizovací ceny jednotlivých diagnostických setů a zaznamenány vypočtené hodnoty 1 testu příslušných metod. Při pozitivitě ANA protilátek se následně u manuálního odečtu provádí titrace, z čehož vyplývá, že náklady jednoho testu jsou ve výsledku trojnásobně vyšší. Každý výkon je ohodnocen bodovým systémem, který se řídí vyhláškou Ministerstva zdravotnictví ČR. Jeden bod je vykázan jako 1,58 Kč.

Pro automatický odečet ANA protilátek laboratoř využívá diagnostický kit, jehož pořizovací cena činí 9347,-. Po následném přepočtu cena jednoho testu vychází na 58,-. Tento výkon je ohodnocen 366 body, a tak po jeho vykázání pojišťovna laboratoři přispívá

578,-. Při mikroskopickém odečtu se používá diagnostický set, jehož náklady jsou 7100,-. Výsledná cena jednoho testu činí 133,- a jelikož se jedná o stejný výkon, laboratoř si může také vykázat 578,-.

Při vyšetření ANCA protilátek automatickým odečtem používá laboratoř kit o hodnotě 33091,-. Jeden test ve výsledku stojí 206,- a jeho výkon je ohodnocen 225 body. V tomto případě lze výkon laboratoře vykázat 2x, a tak může pojišťovna laboratoři přispět až 710,-. U mikroskopického odečtu činí pořizovací cena setu 26368,-. Výsledná cena jednoho testu je 164,- a protože se jedná o stejný výkon, laboratoř si jej může opět vykázat 2x a získat tak od pojišťovny až 710,-.

Závěrem můžeme říct, že mikroskopický odečet je méně nákladnou metodou pro vyhodnocení ANCA protilátek na rozdíl od ANA, kde je ekonomicky výhodnější automatický odečet, který zvládne titraci v rámci jednoho testu.

Tabulka 5: Přehled cen jednotlivých metod stanovení.

	ANA PATTERN	ANA IFM	ANCA PATTERN	ANCA IFM
Cena 1 balení	9349,-	7100,-	33091,-	26368,-
Cena 1 testu	58,-	44,-	206,-	164,-
Cena po titraci	58,-	133,-	-	-
Číslo výkonu	91317	91317	91323	91323
Bodové ohodnocení	366	366	225	225
Výkaz od pojišťovny	578,-	578,-	355,-	355,-

Zdroj: Autor podle dat ÚIA FN Plzeň, 2023.

DISKUZE

Hlavním cílem praktické části bylo zjistit shodu výsledků z automatického a mikroskopického odečtu. To shrnují první dvě výzkumné otázky, které vycházely z detekce ANA a ANCA protilátek. V obou případech lze prohlásit, že data nasbíraná od 20. do 22. února 2023 z automatického odečtu přístroje EUROPattern od výrobce Euroimmun, což činilo 101 výsledků, se neshodují s výsledky při použití fluorescenčního mikroskopu. Pro ANA protilátky platí shoda 63 %, jelikož automatický odečet dokáže rozeznat pouze 9 typů fluorescence a jejich vzájemnou kombinaci. Procentuální shoda je tedy ovlivněna editovanými výsledky, které automatický odečet vyhodnotil správně pozitivní, ale rozšiřující charakteristiky nezvládl určit. Pokud tyto výsledky zahrneme do celkové shody, 88 % vyhodnocených ANA testů z automatického odečtu se shodovalo s mikroskopickým odečtem. Výsledná správnost obou testů je vysoká, jelikož diagnostika ANCA protilátek z automatického odečtu v porovnání s mikroskopickým odečtem je shodná ze 79 %.

Podle studie [33], která je zaměřena na výsledky ANA z automatického i manuálního odečtu za použití přístroje NOVA View od výrobce Inova Diagnostics je prokazatelné, že výsledky jsou porovnatelné. Ve studii pracovali se vzorky s diagnostikovanými onemocněními a známými typy fluorescence, jež mají vykazovat. Téměř shodná specifita a senzitivita obou metod vyjadřuje podobnost s výsledky z EUROPattern, které nevykazovaly rapidní rozdíly. Ve studii [34] jsou porovnány výsledky ze 6 různých analyzátorů automatického odečtu s manuálním odečtem. Tyto parametry mají velmi vysokou shodu. Ze všech zmíněných přístrojů vyšlo pouze 12 falešně negativních vzorků z 92 pozitivních, kdežto v mé práci byly vyhodnoceny 4 falešně pozitivní a 4 falešně negativní vzorky z 67. V porovnání se studií jsou výsledky o poznání méně shodné.

Třetí výzkumná otázka je zaměřena na spolehlivost metody vyšetření ANA protilátek pozitivních proti antigenu DFS-70 nepřímou imunofluorescencí v porovnání s metodou imunoblot. V období od 1.1.2022 do 20.2.2023 bylo vykonáno celkem 6896 ANA testů na pracovišti ÚIA FN Plzeň. Z celkového počtu se u 73 vzorků objevila pozitivita autoprottilátek proti DFS-70. Pomocí nepřímé imunofluorescence identifikujeme obraz jako jemně zrnitý s negativními jádérky a pozitivní chromatinovou ploténkou. Výsledky jsou pak následně verifikovány metodou imunoblot, podle které 73 pozitivních vzorků z nepřímé imunofluorescence následně bylo opravdu pozitivních 43 a 30 vzorků bylo negativních. Nepřímou imunofluorescencí se vyhodnotilo celkem 59 % správně pozitivních a 41 % falešně

pozitivních výsledků. Identifikace protilátek proti DFS-70 nepřímou imunofluorescencí tak není spolehlivou metodou. Je tomu tak uvedeno i v porovnávací studii [35], která je sice zaměřena na porovnávání blotových metod použitých k ověření positivity proti antigenu DFS-70, ale potvrzuje, že hodnocení pomocí imunofluorescence by mělo být verifikováno specifitějšími metodami.

Ve čtvrté výzkumné otázce, ve které se zabývám časovou náročností automatického odečtu, jsem dospěla k závěru, že automatický odečet je z časového hlediska úspornější než mikroskopický odečet zhruba o půl hodiny. Není zde však zahrnuta případná pozitivita vzorku, která v rámci mikroskopického odečtu zapříčiní pozdržení vzorku o 24 hodin, kvůli jeho následné titraci. Při zanedbání této informace, dochází k největšímu časovému rozdílu u přepisování dat, jež jsou z automatického odečtu exportovány do LIS během 2 minut a u mikroskopického odečtu musíme výsledky ručně přepisovat z protokolu do LIS, což může zabrat až 30 minut. Zde může docházet lidské chybovosti. Tu můžeme použitím automatického odečtu minimalizovat a zvýšit tím přesnost a spolehlivost výsledků.

Analýzou rizik pro NIF jsem se zabývala v páté výzkumné otázce, do které jsem také zařadila preventivní opatření. Mezi rizika jsem zahrnula: malé množství materiálu, nefunkčnost analyzátorů, nedostatek reagensů, chybné odečtení výsledku a záměnu výsledků. Všechna rizika dle mého bodového ohodnocení vyšla jako nízká, kdy vliv na provoz laboratoře není nikterak závažný. V rámci analytického problému lze vždy přejít na zpracování skel manuálním pipetováním, které je časově srovnatelné s automatickým zhotovením nebo z automatického odečtu přejít na vyhodnocování pomocí fluorescenčního mikroskopu. V případě manuálního pipetování je třeba brát zřetel na pipetování správného množství reagensů, zamezení vzduchovým bublinkám, dodržení doby inkubace, zabránění světla při inkubaci značených protilátek a dalších faktorů, které mohou ovlivnit výsledek. V postanalytice v případě mikroskopického odečtu, jak už bylo zmíněno, hrozí chybné manuální přepsání výsledků do LIS. Preventivními opatřeními je tedy kontrola výsledků v LIS s laboratorním protokolem. Dále pravidelná edukace personálu, interní kontroly kvality, účast v externí kontrole kvality, stálá údržba analyzátorů a správné hospodaření se skladovými zásobami k zamezení případnému nedostatku reagensů.

Poslední výzkumná otázka sledovala, zdali je automatický odečet z ekonomického hlediska výhodnější. Zhodnotila jsem proto ekonomické charakteristiky jednotlivých diagnostických setů. U automatického odečtu jsou pořizovací ceny jednotlivých kitů o pozná-

ní dražší, jelikož jsou používány dvě značené protilátky na diagnostiku ANA a ANCA. V případě mikroskopického odečtu využíváme jednu značenou protilátku. Pro provoz laboratoře jsou tedy ekonomicky výhodnější kity, které používáme na diagnostiku mikroskopickým odečtem, avšak v případě následné titrace ANA, je výsledný náklad na 1 test 3x dražší, než je tomu tak u automatického odečtu. Pro ANA je tedy výhodnější využití automatického odečtu na rozdíl od ANCA vyšetření, kde se titrace neprovádí a je proto výhodnější manuální odečet, kvůli levnější pořizovací ceně, avšak v praxi je tento postup časově nepříznivý s možnou chybovostí zapříčiněnou lidským faktorem.

ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem dosáhla následujících poznatků. Automatický odečet fluorescenčních obrazů je neshodný s manuálním odečtem, jelikož nedokáže rozeznat všechny ANA typy fluorescence. Pro ANA vychází shoda zdánlivě 88 % a pro ANCA 79 %. Automatický odečet je i přesto v laboratorním provozu přínosný. V případě ANA testů dokáže automatickou titrací ušetřit čas, omezit vliv lidského faktoru na reprodukovatelnost výsledků a z ekonomického hlediska je méně nákladný než při manuálním odečtu. Do budoucna by bylo přínosné zdokonalit automatický odečet tak, aby zvládl rozlišit více-ro typů fluorescence nebo vyvinout takový software, který by nebyl závislý na protilátkách propidium jodid. Umožnil by detekovat fluorescenci na základě jedné protilátky (FITC) a tím by se snížily náklady na provedení metody.

SEZNAM LITERATURY

1. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. Základy imunologie. 3. vydání. Praha: TRITON, 2005. ISBN 80-7254-686-4.
2. BARTUŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK a kolektiv. Vyšetřovací metody v imunologii. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
3. ŠAFARČÍK, Kristián, Vladimír BARTOŠ a Marie KARLÍKOVÁ. Principy imunoanalytických metod. Postudium [online]. Plzeň [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: <https://postudium.cz/mod/book/view.php?id=5374&chapterid=2214>
4. LITZMAN, Jiří, Pavel KUKLÍNEK a Ondřej RYBNÍČEK. Alergologie a klinická imunologie. Brno: Vydavatelství IDVPZ, 2001. ISBN 80-701-3345-7.
5. Polyklonální vs. monoklonální protilátky. Baria [online]. Praha: BARIA, c2022 [cit. 2023-01-28]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc3190821-polyklonalni-vs-monoklonalni-protilatky>
6. Příspěvatelé Wikiskript. Monoklonální protilátka. Wikiskripta [online]. Mefanet, 2018 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Monoklonáln%C3%AD_protilátka
7. HRDÁ, Pavlína a Ivan ŠTERZL. Vyšetření protilátek – současné možnosti. *Solen* [online]. Praha: Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK, 2003 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/08/07.pdf>
8. SHOENFELD, Yehuda, Terezie FUČÍKOVÁ a Jiřina BARTUŇKOVÁ. Autoimunita: Vnitřní nepřítel [online]. Praha: Grada, 2007 [cit. 2023-02-11]. ISBN 978-80-247-6290-6. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/autoimunita-1164624/>
9. Autoprotilátky. Lab tests online [online]. Praha, 2015 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/autoprotlatky.html>

10. Příspěvatelé Wikiskript. Autoprotilátky. *Wikiskripta* [online]. Mefanet, 2023 [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Autoprotilátky#ANA_.E2.80.93_antinukle.C3.A1rn.C3.AD_protil.C3.A1tky
11. BRADWELL, A.R., R.G. HUGHES a E.L. HARDEN. Atlas of HEp-2patterns. 2nd ed. Birmingham (Anglie): The Binding Site, 2003. ISBN 0704424371.
12. Příspěvatelé Wikiskript. Systémový lupus erythematoses. Wikiskripta [online]. Mefanet, 2021 [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Systémový_lupus_erythematoses
13. SVOBODOVÁ, Radka. Systémová onemocnění pojiva a jejich komplikace. Interní medicína pro praxi [online]. Praha: Revmatologický ústav, 2012 [cit. 2023-03-1]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/11/11.pdf>
14. Smíšené onemocnění pojivové tkáně – MCTD (Mixed Connective Tissue Disease). Lupus [online]. 2012 [cit. 2023-03-1]. Dostupné z: <http://www.lupus-sle.cz/clanky/smisene-onemocneni-pojivove-tkane-mctd-mixed-connective-tissue-disease>
15. Příspěvatelé Wikiskript. Systémová sklerodermie. Wikiskripta [online]. Mefanet, 2017 [cit. 2023-03-01]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Systémová_sklerodermie
16. Příspěvatelé Wikiskript. Sjögrenův syndrom. Wikiskripta [online]. Mefanet, 2023 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Sjögrenův_syndrom
17. Metody – ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilů). Ústav imunologie a alergologie [online]. Fakultní nemocnice Plzeň, Lékařská fakulta UK [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: <https://uia.fnplzen.cz/cs/node/653>
18. BRADWELL, A. R., R. P. STOKES a G. D. JOHNSON. *Atlas of Autoantibody Patterns on Tissues*. Birmingham: KNP Group, 1997. ISBN 0704417790.
19. Příspěvatelé Wikiskript. Polyarteriitis nodosa. *Wikiskripta* [online]. Mefanet, 2018 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Polyarteriitis_nodosa

20. Příspěvatelé Wikiskripta. Syndrom Churgův-Straussové. *Wikiskripta* [online]. Mefanet, 2021 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Syndrom_Churgův-Straussové
21. ŽURKOVÁ, Monika, Vítězslav KOLEK a Kateřina MUSILOVÁ. Syndrom Churg-Straussové. *Interní medicína pro praxi* [online]. Olomouc, 209n. 1. [cit. 2023-03-4]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/10/07.pdf>
22. Příspěvatelé Wikipedie. ELISA. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2022 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/ELISA>
23. Příspěvatelé Wikipedie. Western blot. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2021 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot
24. HOFF, Florian. Jak si připravit vzorek na imunofluorescenční mikroskopii. *Baria* [online]. Německo: Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, c2022 [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc3191111-jak-si-pripravit-vzorek-na-imunofluorescencni-mikroskopii>
25. SCHAFFER, J. Luminiscence. Fyzikální seminář [online]. Praha: Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, 2019 [cit. 2023-02-12]. Dostupné z: <http://fyzsem.fjfi.cvut.cz/2019-2020/Zima19/proc/lumin.pdf>
26. AOKI, Valéria, Joaquim X. SOUSA JR, Lígia M. I. FUKUMORI a Alexandre M. PÉRIGO. Direct and indirect immunofluorescence. *Scielo* [online]. Brasil: Anais Brasileiros de Dermatologia, 2010 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/abd/a/MTFwJfDtGwdGSpRgjWG4wty/?lang=en&format=pdf>
27. Příspěvatelé Wikipedie. Fluorescenční mikroskop. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2022 [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescenční%C3%AD_mikroskop

28. EUROIMMUN System solutions for full IIFT automation. Euroimmun [online]. Germany: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, 2022 [cit. 2023-03-01]. Dostupné z: https://www.euroimmun.com/documents/Automation/IFA/YG_0071_I_UK_D.pdf
29. ICAP: International Consensus on ANA Patterns. ANA Patterns [online]. ICAP, 2023 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://www.anapatterns.org>
30. IIFT: ANA Mosaic 1 EUROPattern: Instructions for the indirect immunofluorescence test. *Euroimmun* [online]. Germany: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, 2019 [cit. 2023-03-04]. Dostupné z: <https://www.euroimmun.co.uk>
31. Metody – Antinukleární protilátky. Ústav imunologie a alergologie [online]. Fakultní nemocnice Plzeň, Lékařská fakulta UK [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: <https://uia.fnplzen.cz/cs/node/646>
32. STŘELEČ, Jiří. Analýza rizik. *Vlastní cesta* [online]. Brno [cit. 2023-03-5]. Dostupné z: <https://www.vlastnicesta.cz/metody/analyza-rizik-risk/>
33. DEPINCÉ-BERGER, Anne E., Amelie MOREAU a Virginie BOSSY. Comparison of Screening Dilution and Automated Reading for Antinuclear Antibody Detection on HEP2 Cells in the Monitoring of Connective Tissue Diseases. *National Library of Medicine* [online]. 2016 [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6806706/>
34. BIZZARO, Nicola, Antonio ANTICO a Stefan PLATZGUMMER. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: A comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Science Direct* [online]. Italy, 2013 [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568997213002085>
35. BIZZARO, Nicola, Fiorenza PESENTE a Francesco CUCCHIARO. Anti-DFS70 antibodies detected by immunoblot methods: A reliable tool to confirm the dense fine speckles ANA pattern. *National Library of Medicine* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27374867/>

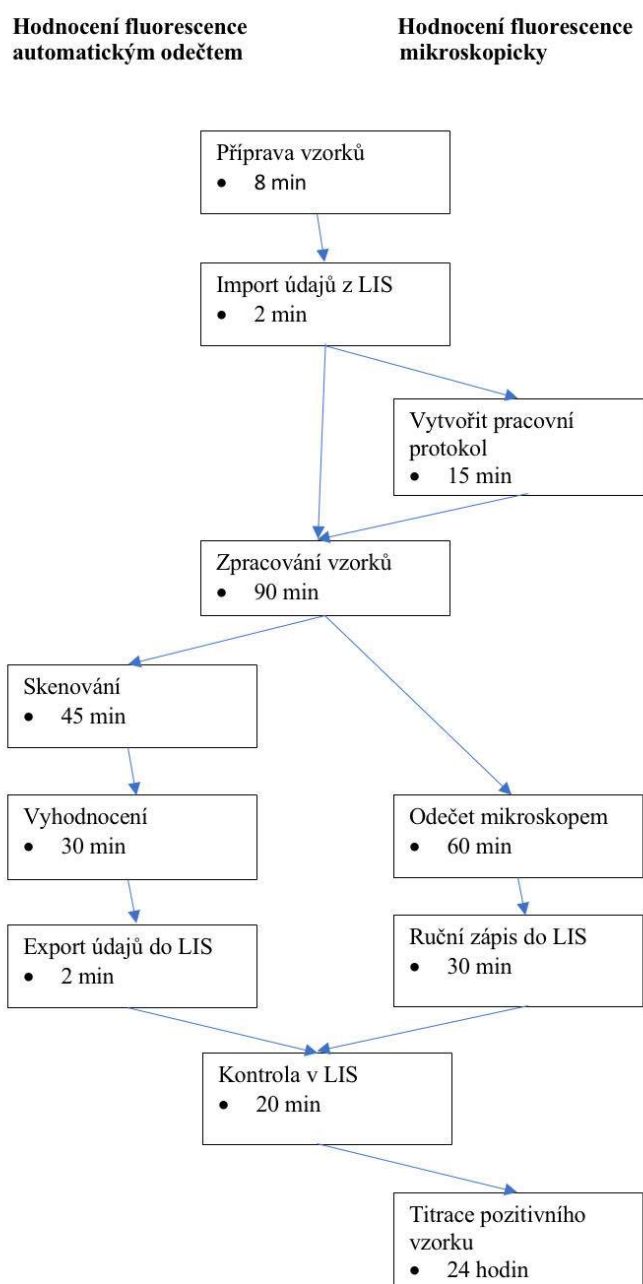
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Schéma procesní mapy vyhodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.

PŘÍLOHY

Příloha A – Schéma procesní mapy vyhodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.

Obrázek 25: Procesní mapa hodnocení fluorescence automatickým a mikroskopickým odečtem.



Zdroj: Autor, podle metodiky ÚIA FN Plzeň, 2023.