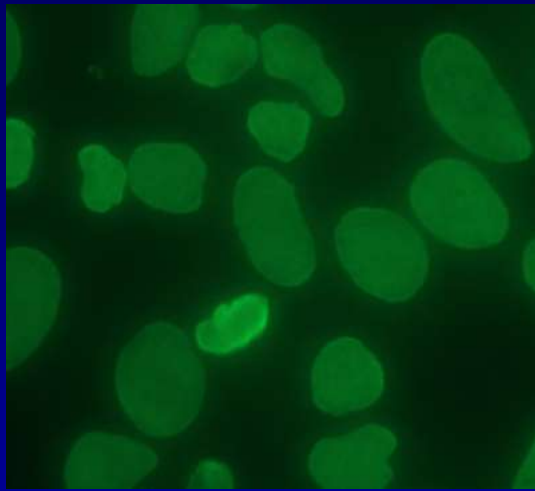




Laboratuvar sonuçları ve sorunlar: IFA

Dr. Derya Mutlu

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Testin çalışılacağı kitin belirlenmesi



Testin çalışılması



Lamların mikroskopta değerlendirilmesi



Sonucun klinisyene raporlanması

IFA: İndirek floresan antikor testleri

- Kullanılan hücre hatlarında 100'den fazla farklı proteinin ekspresyonu
- Floresan mikroskopun sık ihtiyaç duyulan teknik bakımları
 - Floresan ile çalışmanın zorlukları



- Otoantikorların adlandırılmalarında ortak bir dil oluşması
 - Sonuçların güvenilirliğini etkilenmesi

Sunum ana başlıkları

- Sonuçların güvenilirliğini etkileyebilecek teknik sorunlar nelerdir?
- Substrat seçiminde dikkat edilmesi gerekenler nelerdir?
- Kaba granüler, ince granüler gibi alt gruplar da raporlanmalı mıdır? Bu paternlerin temel özellikleri nelerdir?
- Herhangi bir hastalıkla ilişkisi kanıtlanmamış otoantikolar da rapor edilmeli midir?
- Bildirimde pozitiflik 1-2-3-4 pozitif diye mi yoksa dilüsyonlarla mı yapılmalıdır? Hangi dilüsyonla başlanmalıdır?
- IFA testi diğer otoantikör testleri (ELİSA, immunblot) ile birlikte nasıl kullanılmalıdır?

Sonuçların güvenilirliğini etkileyebilecek teknik sorunlar

- Lamba (foton kaynağı) kullanım süresi (100-200 saat) sonunda değiştirilmeli.
- Foton kaynağı doğru olarak konumlanmalı
- Doğru eksitasyon ve emisyon filtreleri seçilmeli.

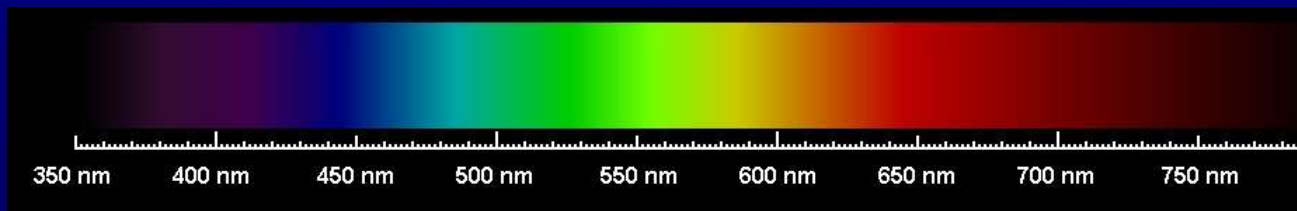
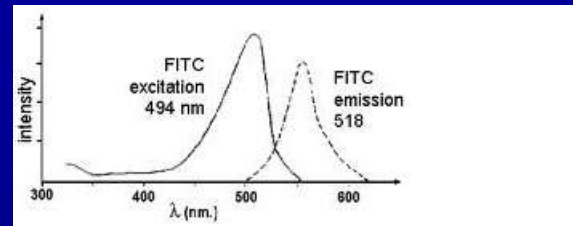
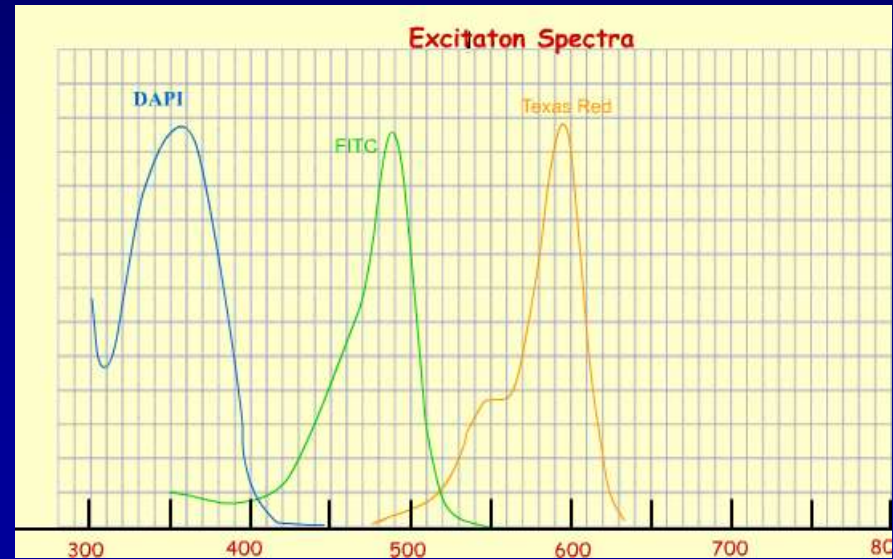


Foton kaynağı doğru olarak konumlanmalı

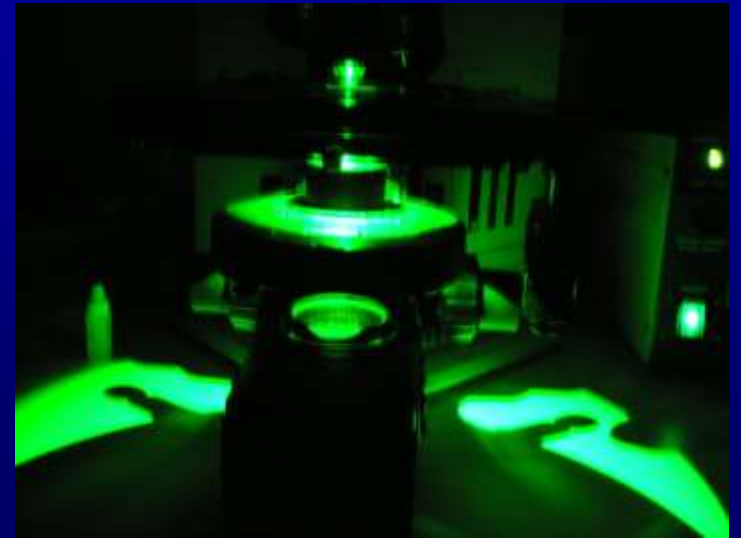


Civalı lamba

- Geniş spektrumda fotonlar oluşturur.
- Her floresan maddenin eksitasyonu için belli aralıkta fotonlar gerekli



Eksitasyon ve emisyon filtrelerinin seçimi



Sonuçların doğruluğunun kontrolü

- Üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışmak
- Her çalışmada pozitif ve negatif kontroller ve pozitif hasta örneği
- Dış kalite kontrol programına dahil olmak (Euroimmun, yılda 2 kez örnek gönderimi)

Institute of Quality Assurance



An institution of the EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG

[Logout](#) [back to main page](#)

Dear Dr. Öngüt

the following quality assessment programs, in which you participated, have been finished:

Program	End of program	
ANA September 2010	Oct 13, 2010	Access evaluation
ANA April 2010	Apr 21, 2010	Access evaluation
ANA April 2009	May 14, 2009	Access evaluation

Dear Mr. Öngüt,

we thank you for your participation in the interlaboratory test. The rate of correct results was 98% (424 laboratories, all test systems taken together).

Characterisation of samples

Sample	Clinical expression	Target: ANA	IFA-pattern
1	Healthy blood donor	negative	negative
2	Lupusnephritis type IV	positive	granular
3	SLE	positive	homogeneous

Sample 2: Besides antibodies against RNP/Sm and Sm, the sample contains also antibodies against Ku (not evaluated in the quality assessment).

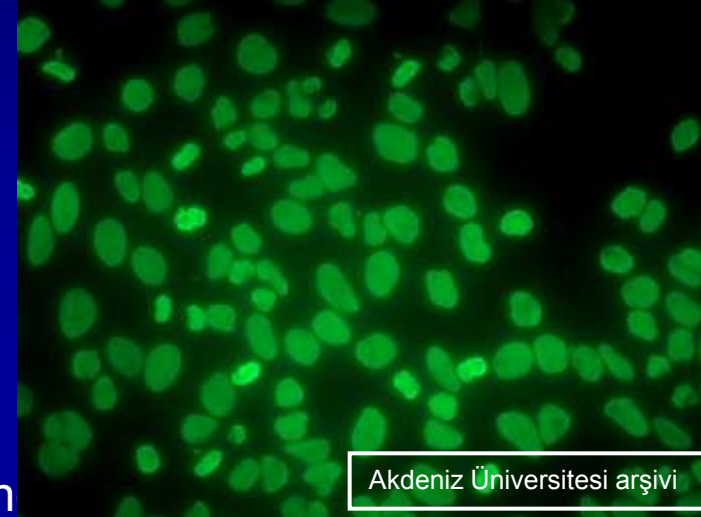
Sample 3: Besides antibodies against dsDNA, nucleosomes, RNP/Sm and Sm, antibodies against histones could also be detected in this sample (not evaluated in the quality assessment).

Target values

Sample	Antibodies against									
	RNP/Sm	Sm	SS-A	SS-B	Scl-70	Jo-1	PM-Scl	CENP B	dsDNA	Nucleosomes
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos/bord.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos

Substrat seçiminde dikkat edilmesi gerekenler; ANA

- İlk kez kullanılan: sıçan karaciğeri¹
- HEp2 epitelyal hücre hattı
 - Duyarlılık↑
 - Standardizasyon sağlandı.
 - HEp2 epitelyal hücre hattı özellikleri:
 - yüksek çekirdek / sitoplazma oranı
 - büyük çekirdekçikler
 - yüksek mitotik aktivitesi ile mitoz sırasında yönelik otoantikörlerin saptanması (Anti-sentrozomal antikörler, iğsi cisim kutbu [spindle pole] antikörleri, iğsi cisim iplikleri [spindle fibre] antikörleri, orta cisim [mid-body] antikörleri, anti-CENP-F proteini antikörleri)
- HEp-20-10 hücre hattı: mitotik aktivitesi HEp2 hücrelerine kıyasla 10 kat daha fazla
- ANA'da HEp2 ve primat karaciğeri kullanımı



Substrat seçiminde dikkat edilmesi gerekenler; ANCA

- Otoantikorlar oluşabilecek nötrofil sitoplazmik proteinleri

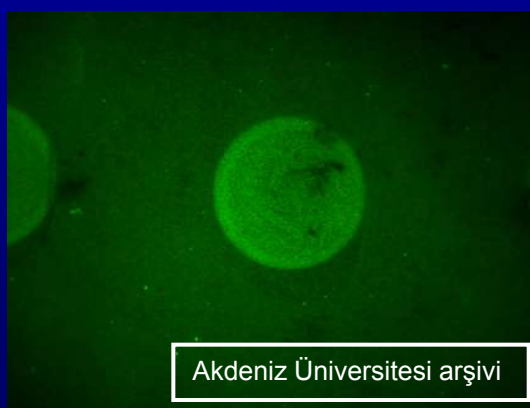
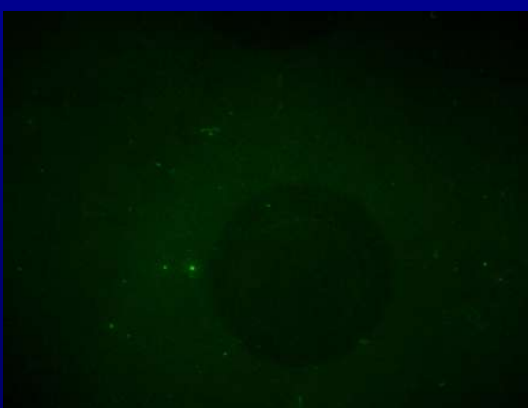
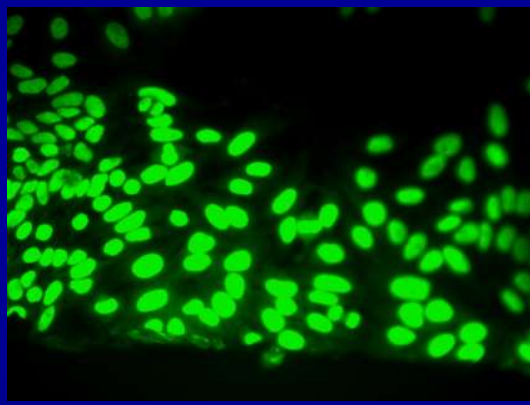
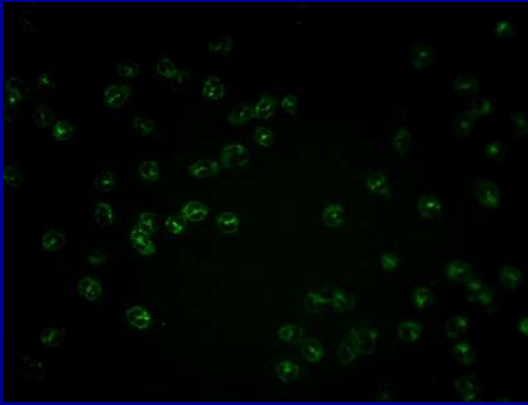
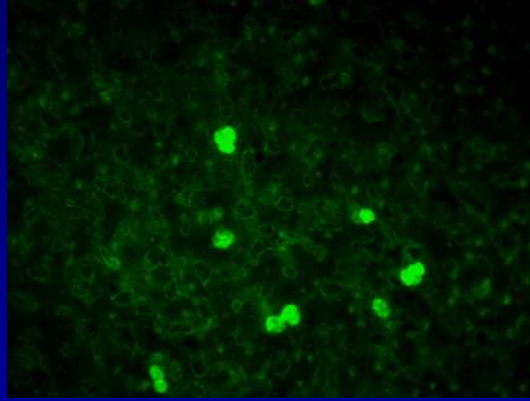
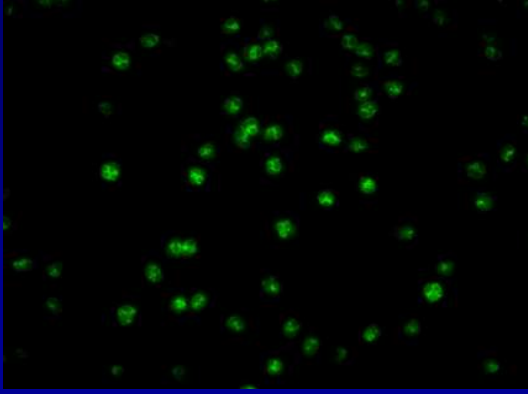
- proteinaz 3
- bakterisidal permeabilite artırıcı protein (BPI)

cANCA

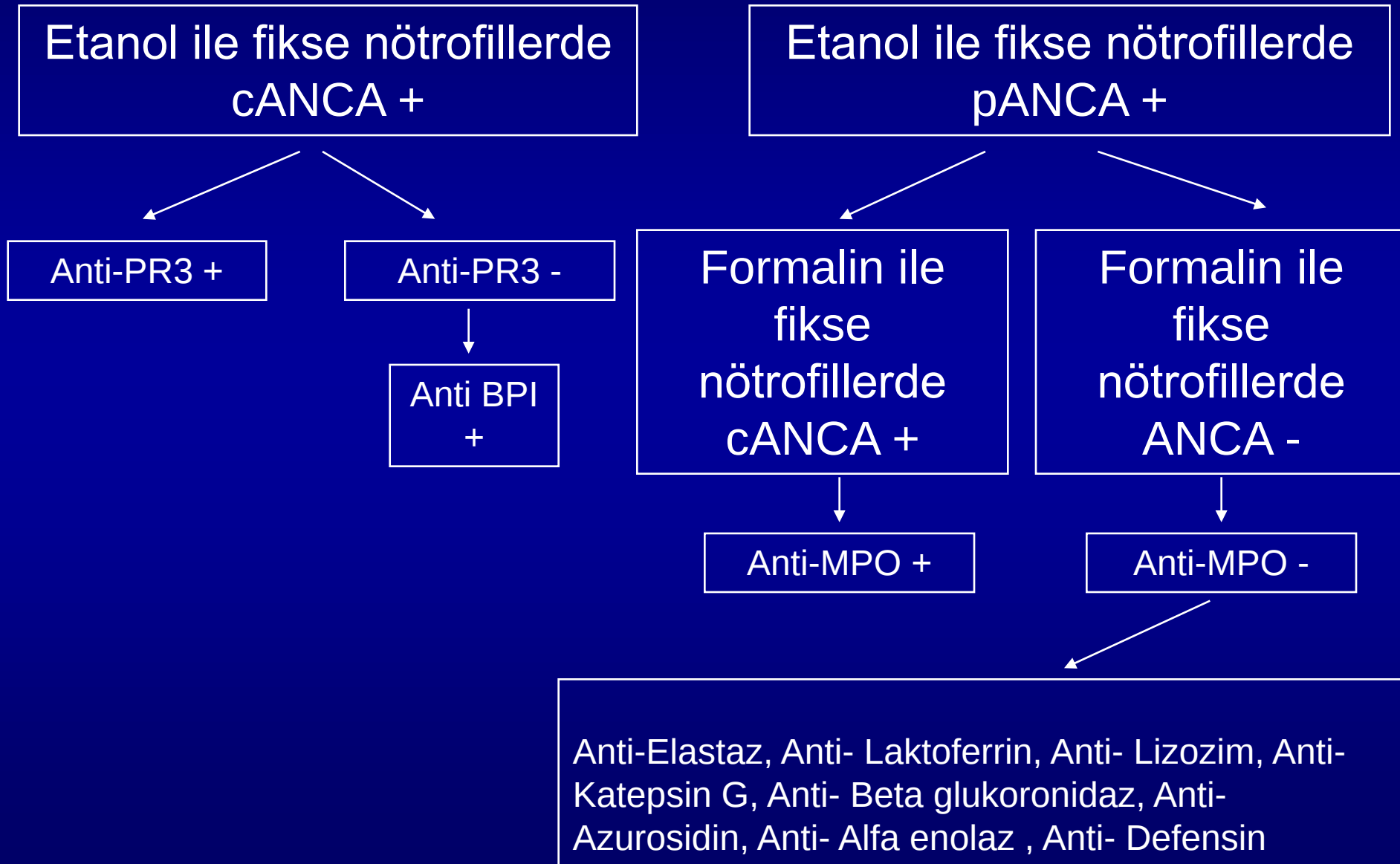
- MPO
- Elastaz
- Laktoferrin
- Lizozim
- Katepsin G
- Beta glukoronidaz
- Azurosidin
- Alfa enolaz
- Defensin

pANCA

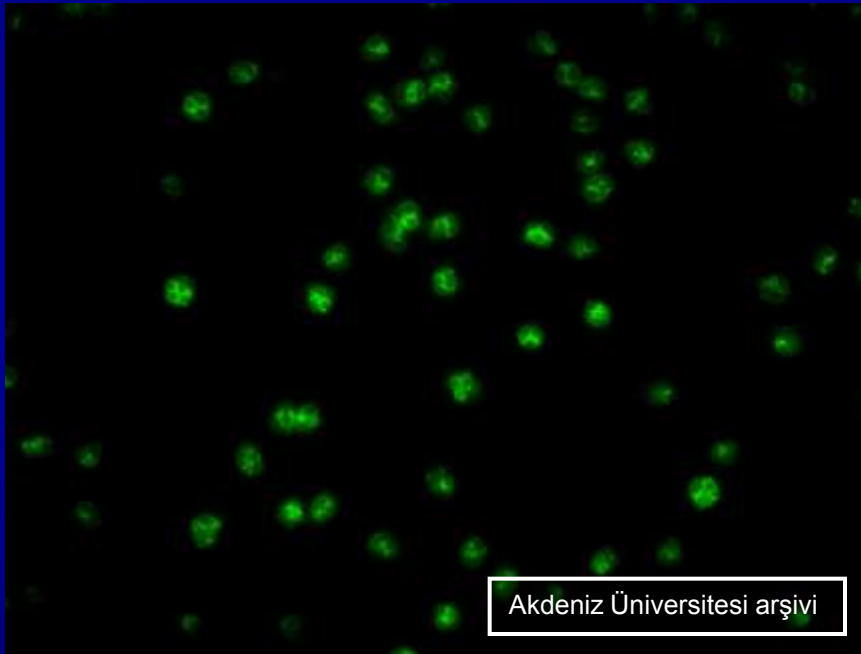
A N C A



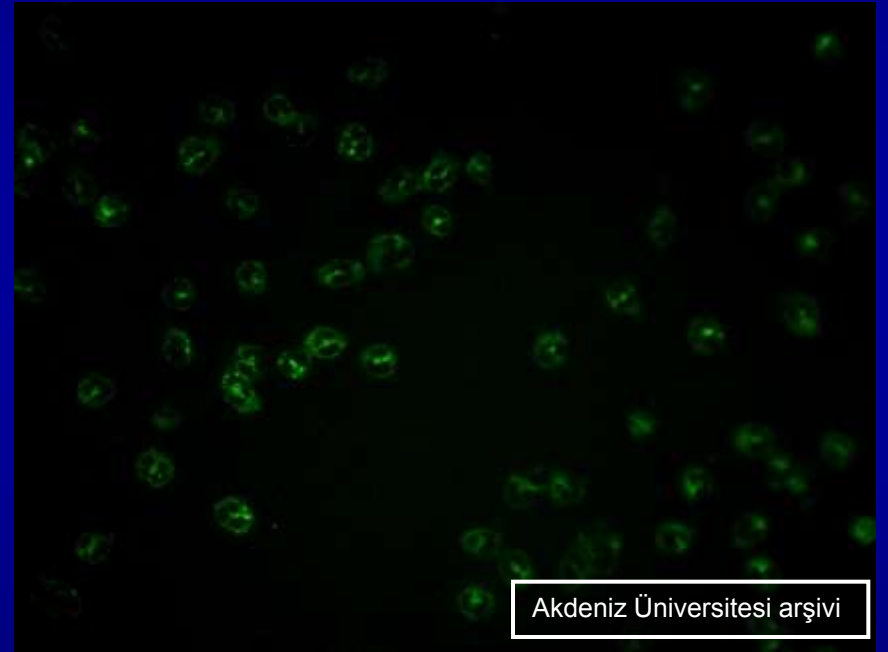
ANCA pozitifliği tanımlama algoritması



ANCA



Etanol ile fikse nötrofiller



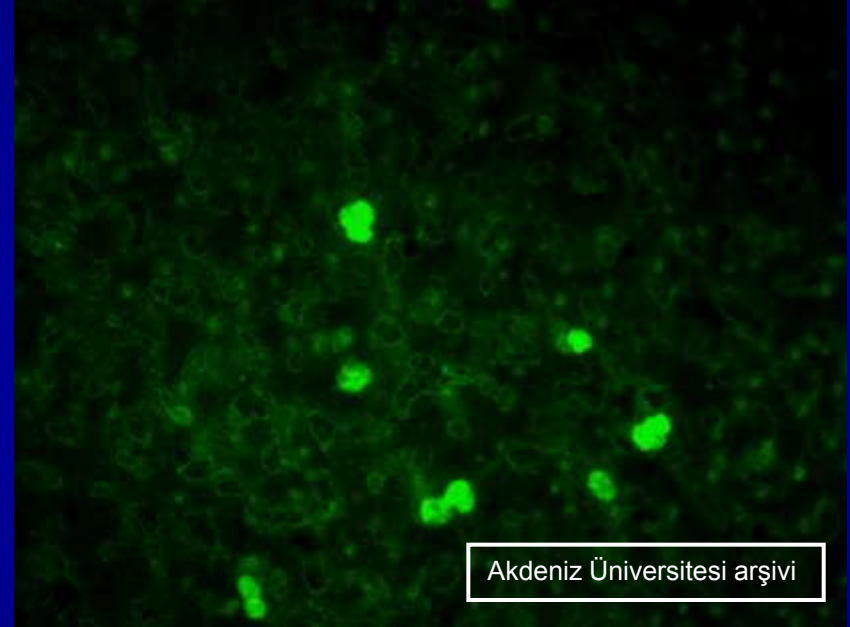
Formalin ile fikse nötrofiller

ANCA



Akdeniz Üniversitesi arşivi

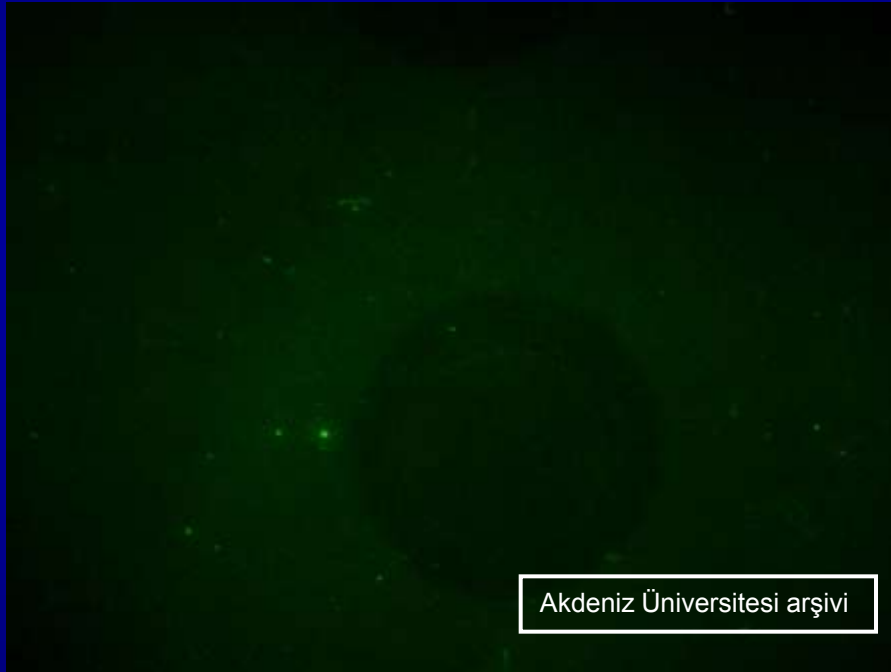
HEp2 hücre hattı



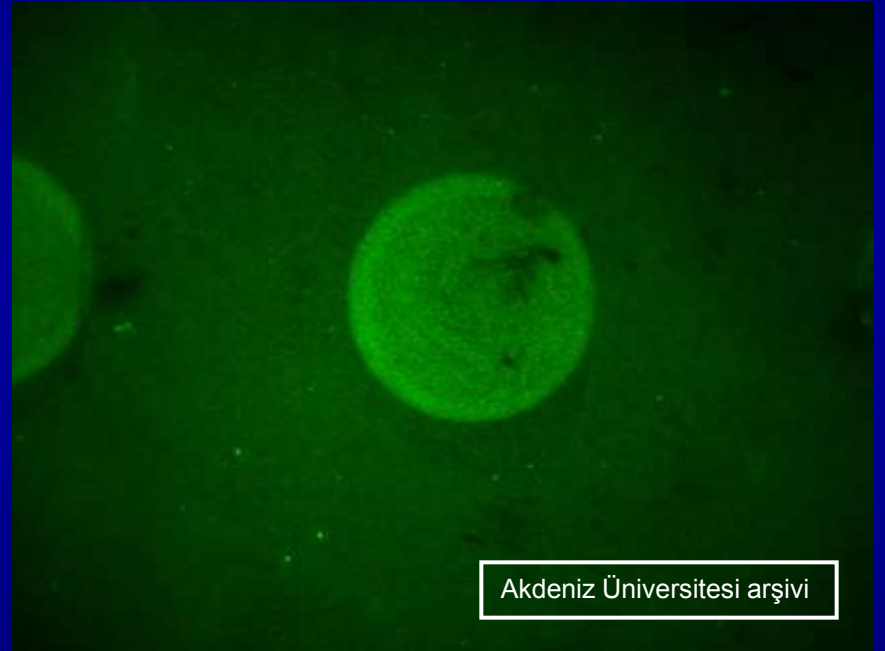
Akdeniz Üniversitesi arşivi

Primat karaciğeri

ANCA



Proteinaz 3 proteini



Miyeloperoksidaz proteini

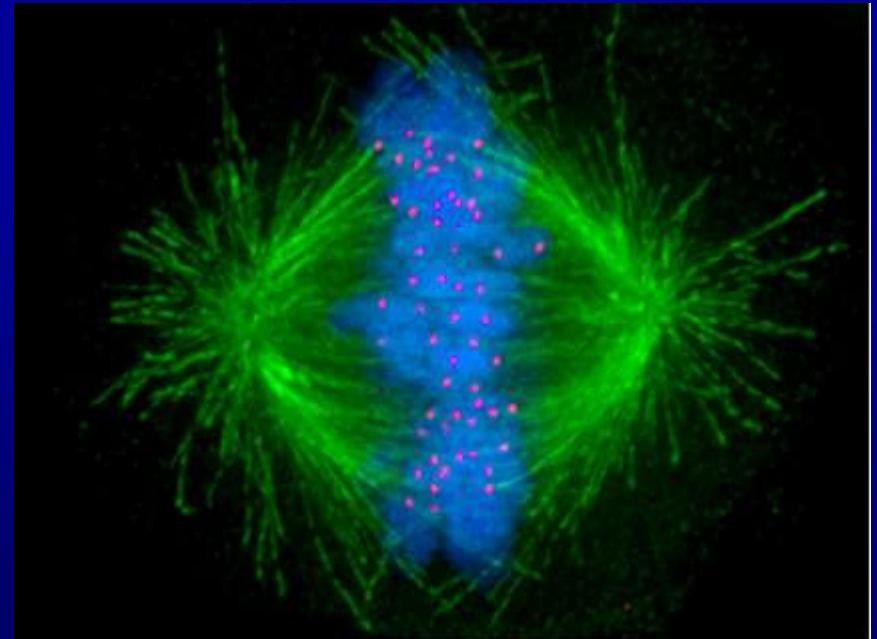
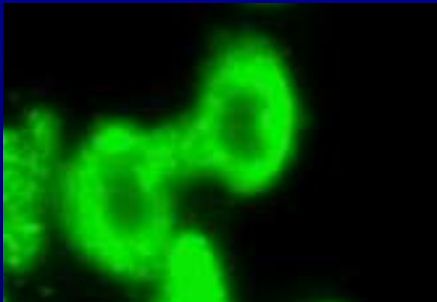
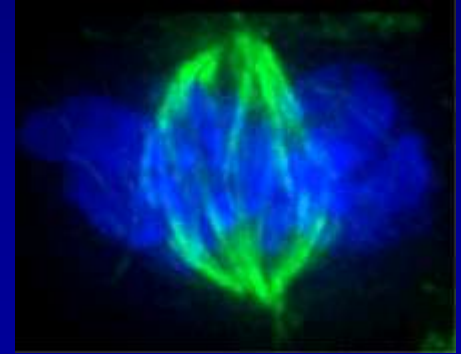
Anti-nükleer antikörlerin sınıflandırılması

Alt tipler raporlanmalı mı

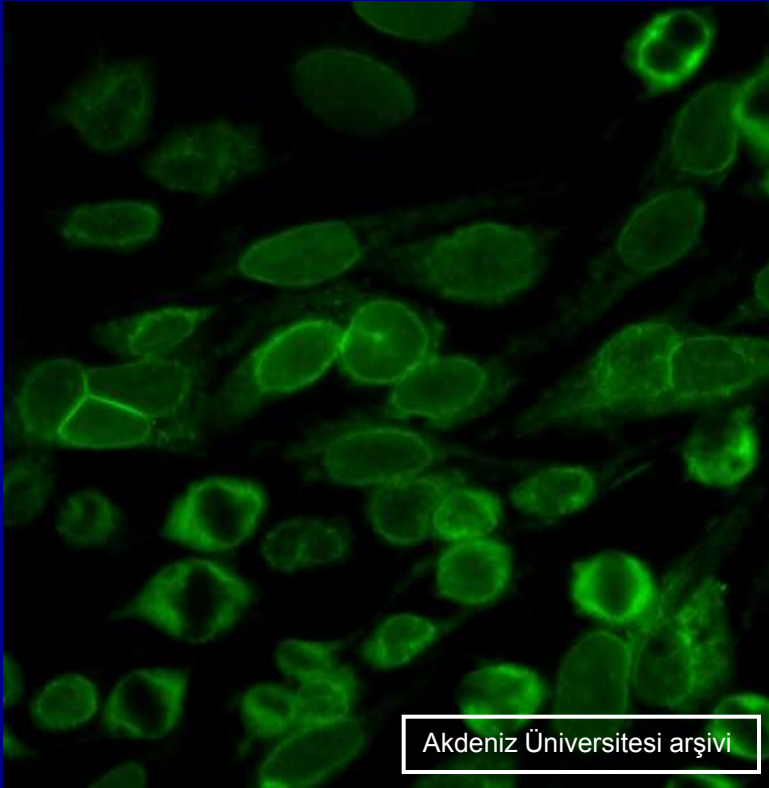
1. Nükleer membrana yönelik otoantikörler
2. Nükleoplazmaya yönelik otoantikörler
3. Çekirdekçiğe (nucleolus) yönelik otoantikörler
4. Mitotik iğsi cisim aparatına yönelik otoantikörler
5. Sitoplazmaya yönelik otoantikörler

Hücre siklusu aşamaları

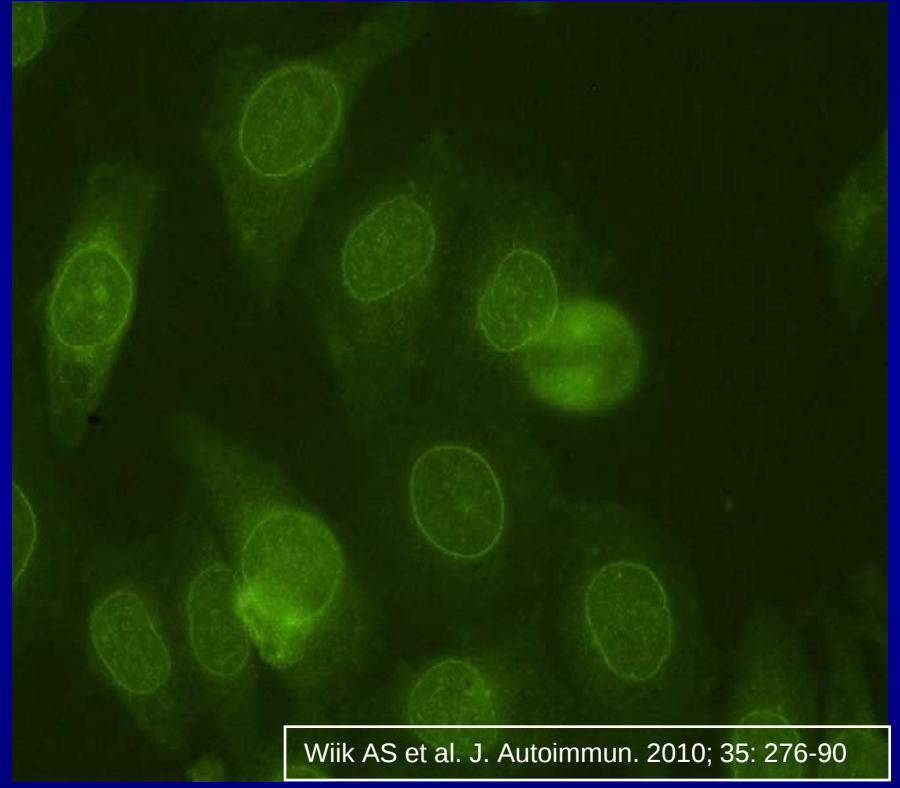
- İnterfaz
- Profaz
- Metafaz
- Anafaz
- Telofaz



Nükleer membrana yönelik otoantikolar

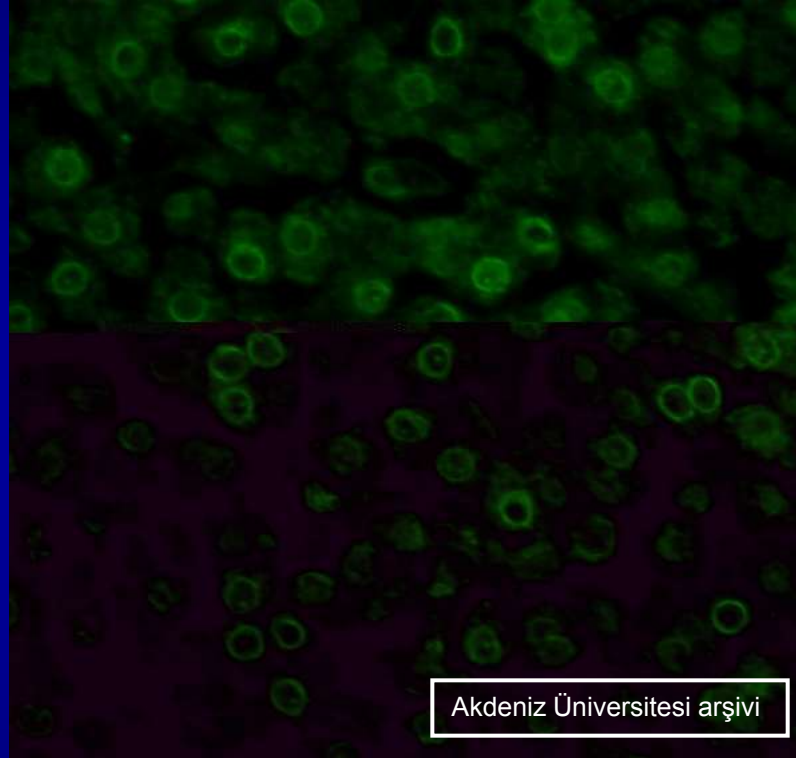


Düzgün nükleer membran
antikoları



Noktalı nükleer membran
antikoları

Nükleer membrana yönelik otoantikorlar



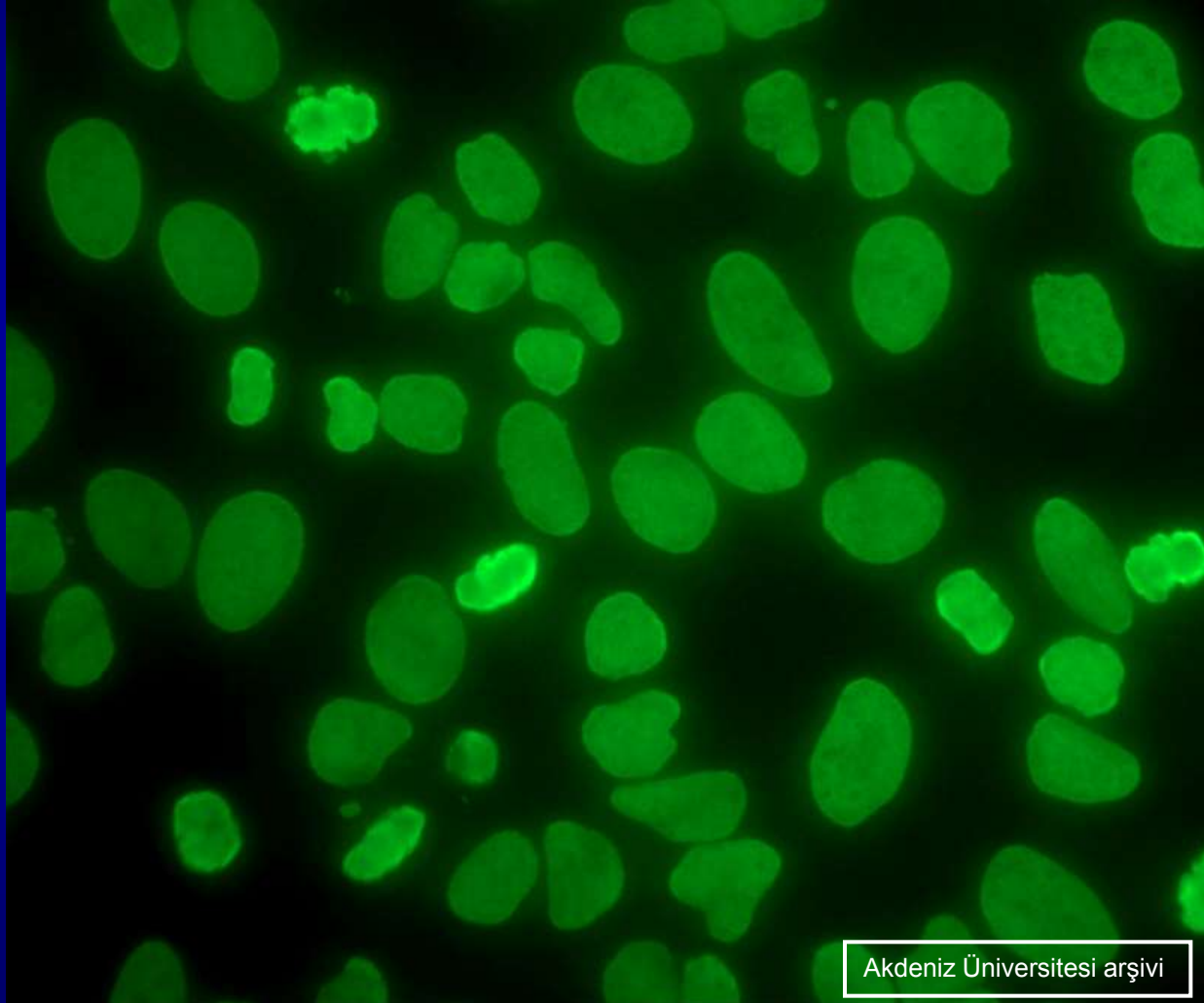
Akdeniz Üniversitesi arşivi

Nükleer membran antikorları,
primat karaciğeri görüntüsü

Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar

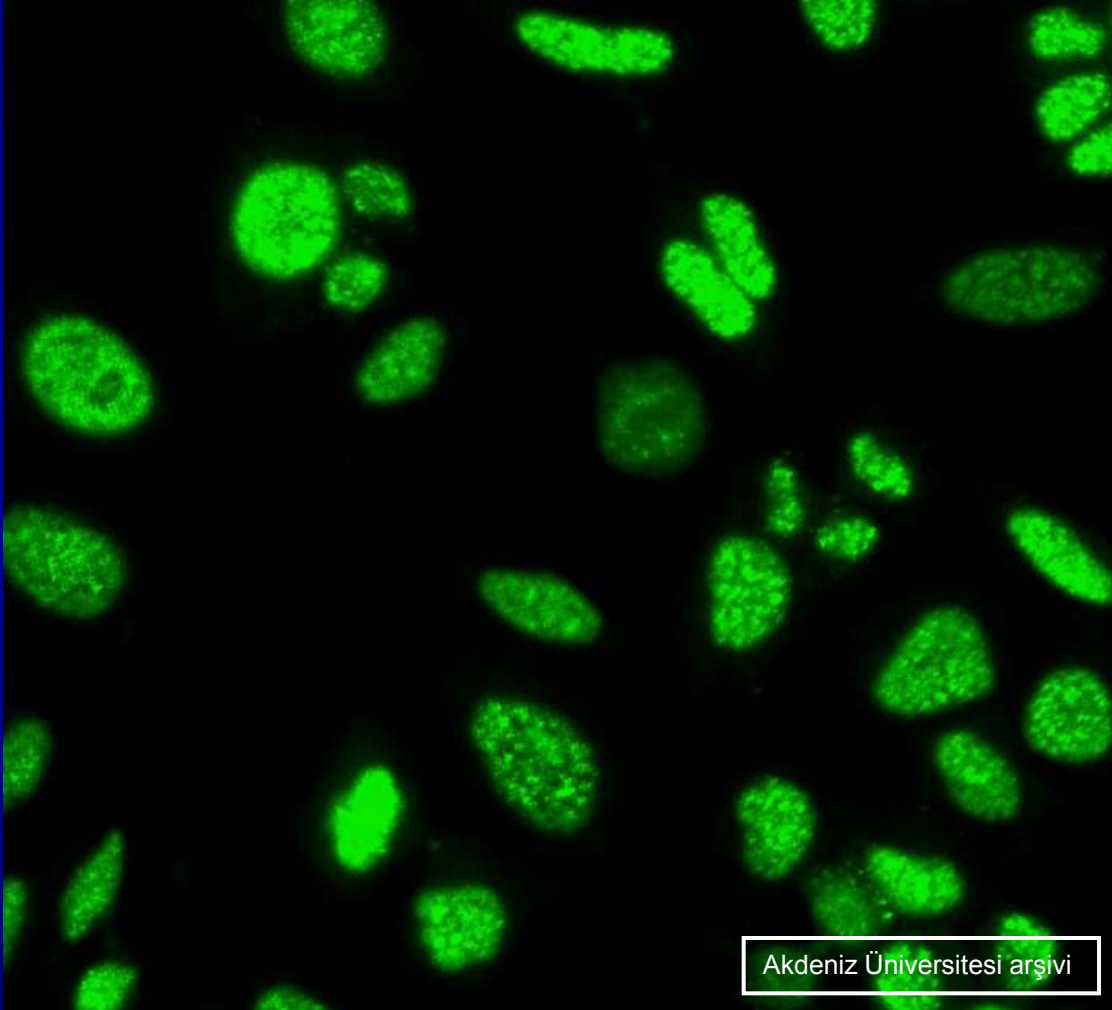
- Homojen nükleoplazmik patern
- Kaba granüler nükleoplazmik patern
- İnce lekeli (fine speckled) nükleoplazmik patern
- İnce taneli (fine grainy) scl-70 benzeri patern
- Pleomorfik nükleer patern
- Sentromerik patern
- Çoklu nükleer nokta paterni
- Az nükleer nokta paterni

Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar



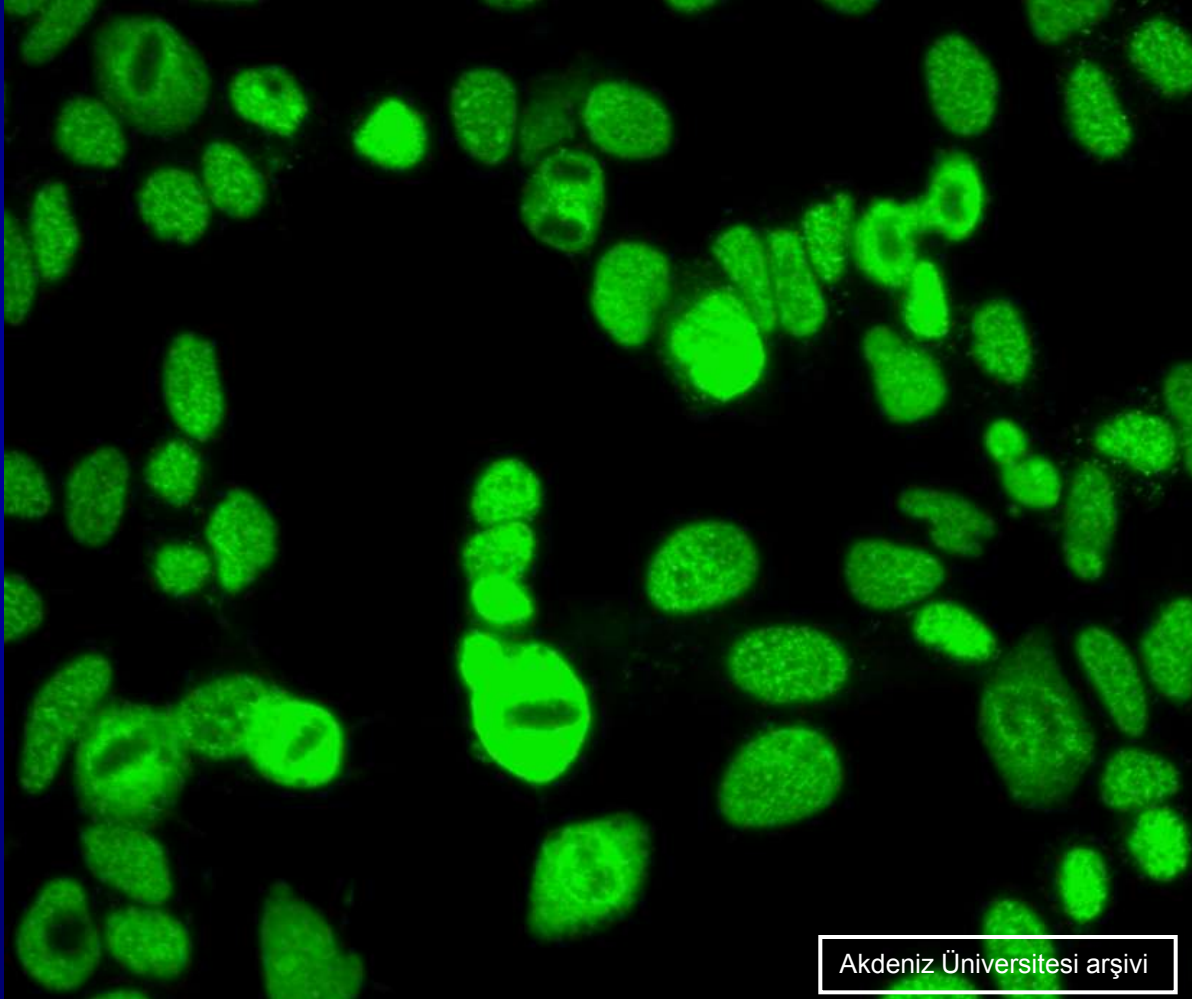
Homojen nükleoplazmik patern

Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar



Kaba granüler nükleoplazmik
patern

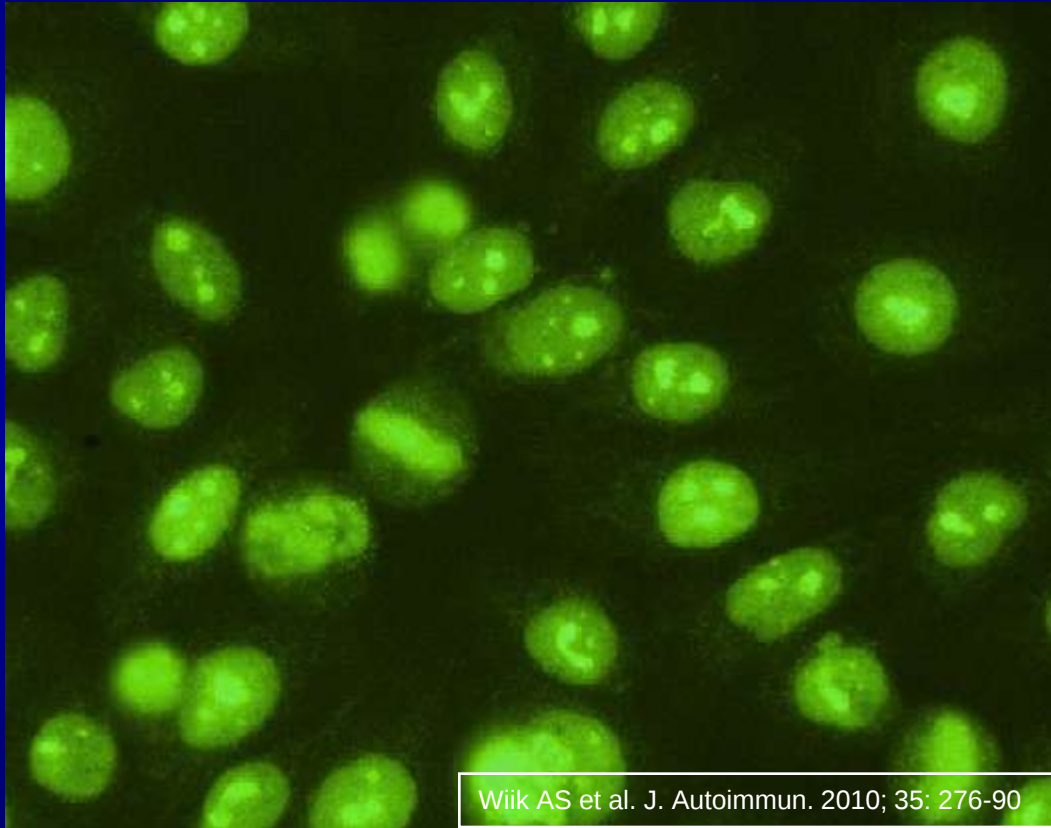
Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar



Akdeniz  niversitesi arşivi

İnce granüler nükleoplazmik
patern

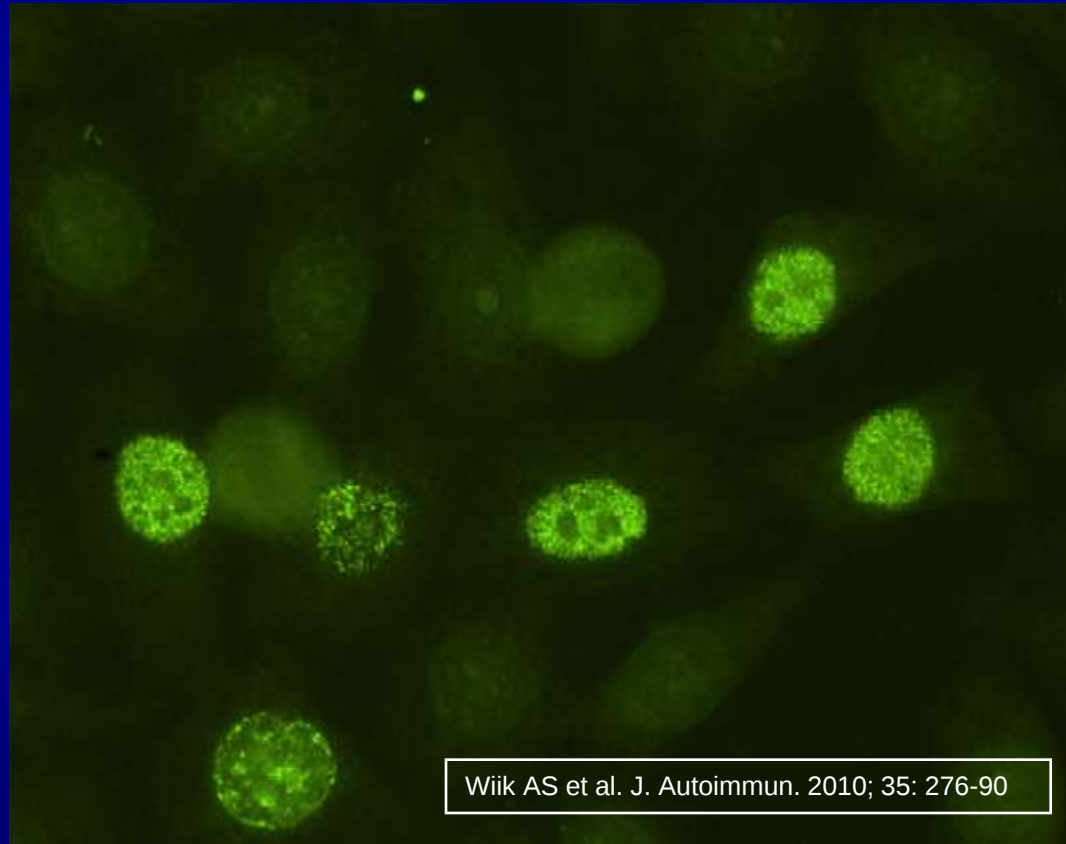
Nükleoplazma ile ilişkili otoantikörler



Wiik AS et al. J. Autoimmun. 2010; 35: 276-90

İnce taneli (fine grainy) scl-70
benzeri patern

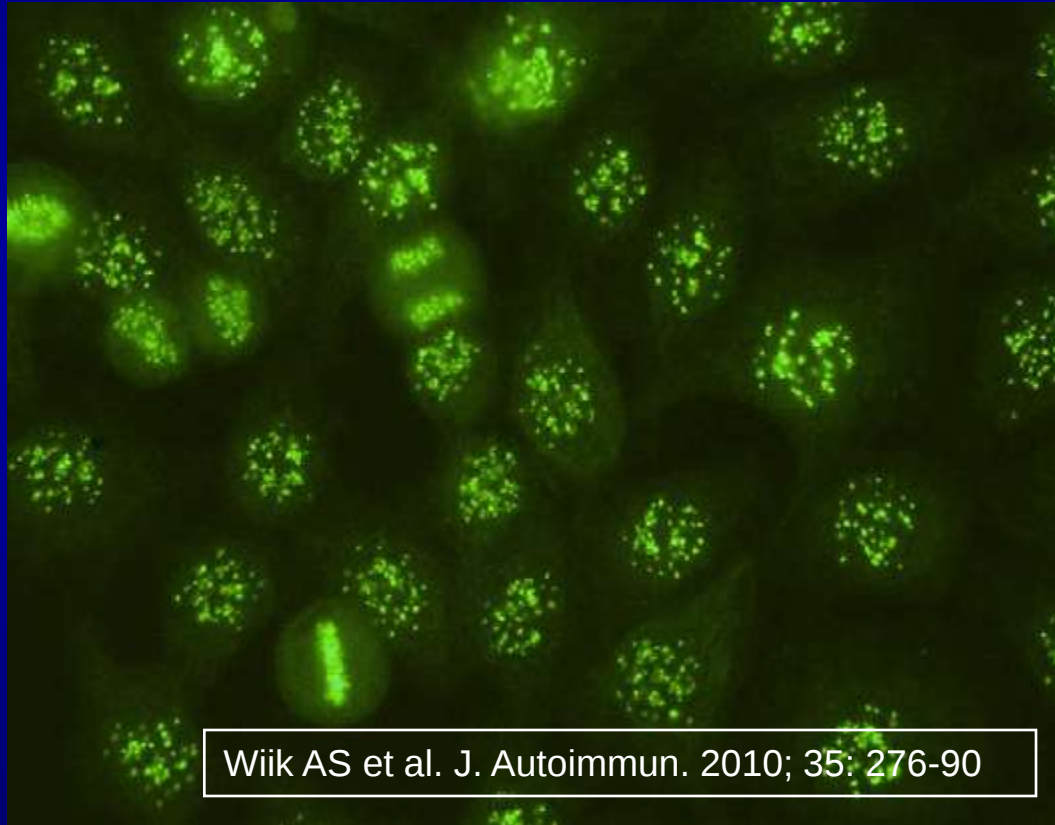
Nükleoplazma ile ilişkili otoantikörler



Wiik AS et al. J. Autoimmun. 2010; 35: 276-90

Pleomorfik nükleer patern

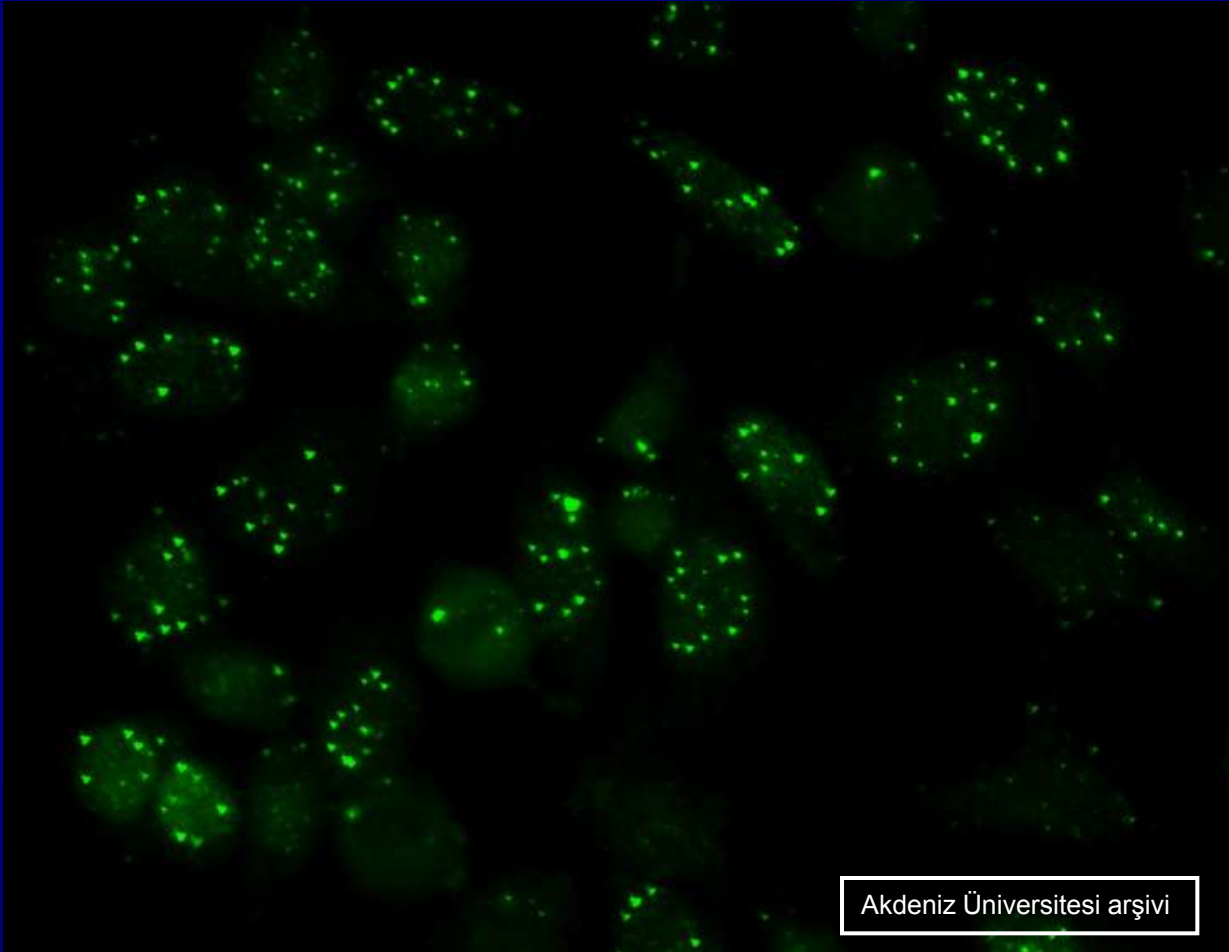
Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar



Wiik AS et al. J. Autoimmun. 2010; 35: 276-90

Sentromerik patern

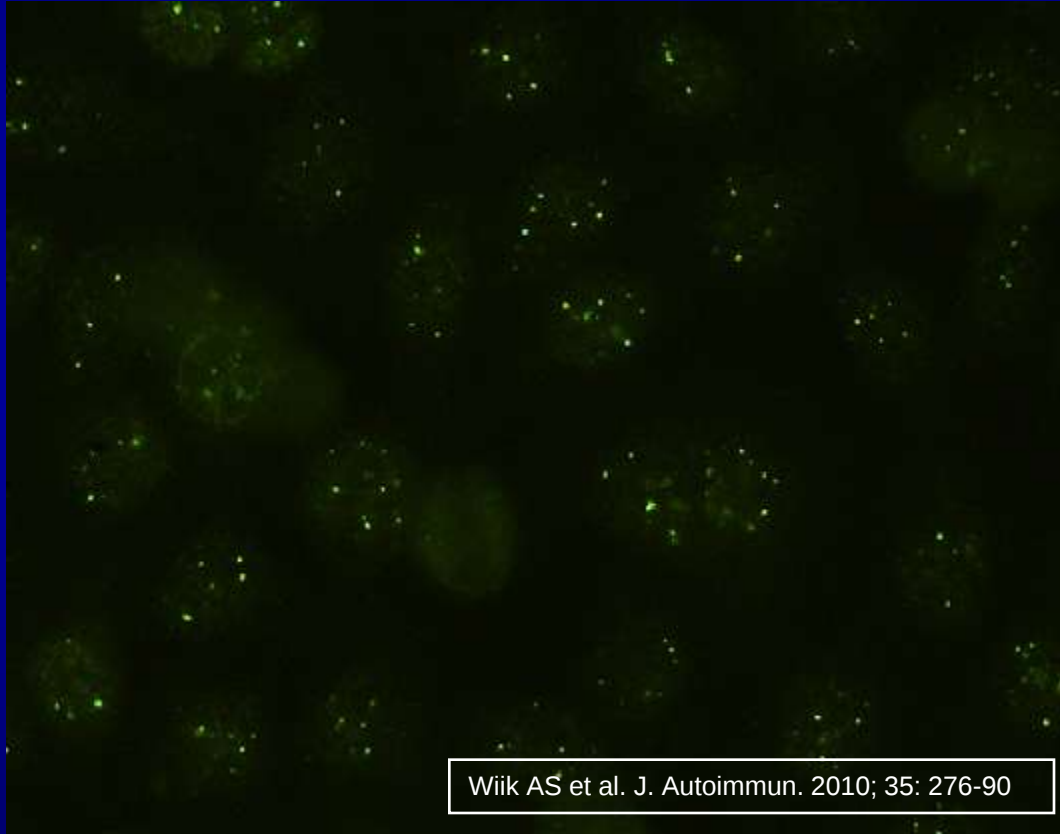
Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar



Akdeniz  niversitesi arşivi

Çoklu nükleer nokta paterni

Nükleoplazma ile ilişkili otoantikorlar



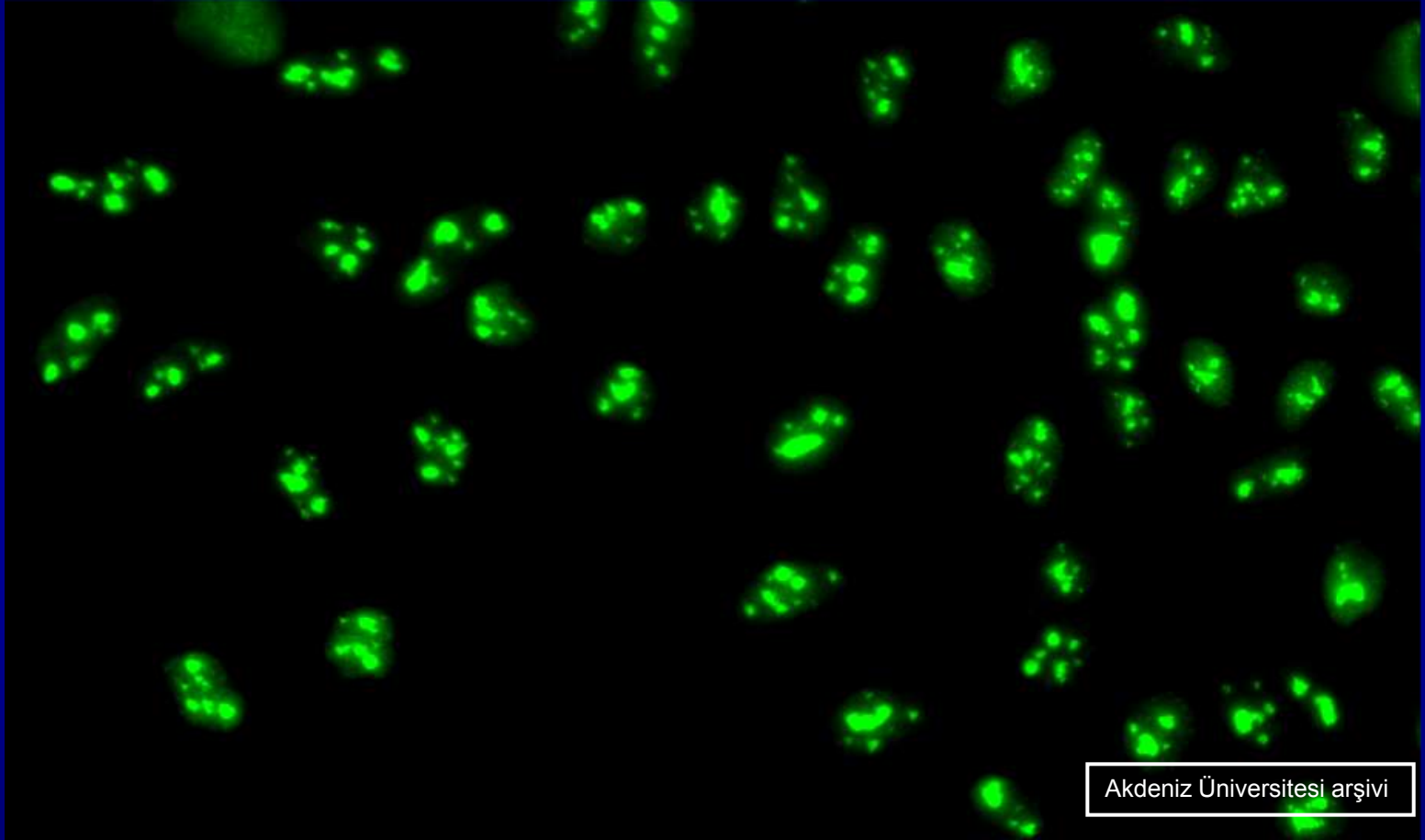
Wiik AS et al. J. Autoimmun. 2010; 35: 276-90

Az nükleer nokta paterni

Çekirdekçikle ilişkili otoantikorlar

- Homojen çekirdekçik paterni
- Granüler çekirdekçik paterni

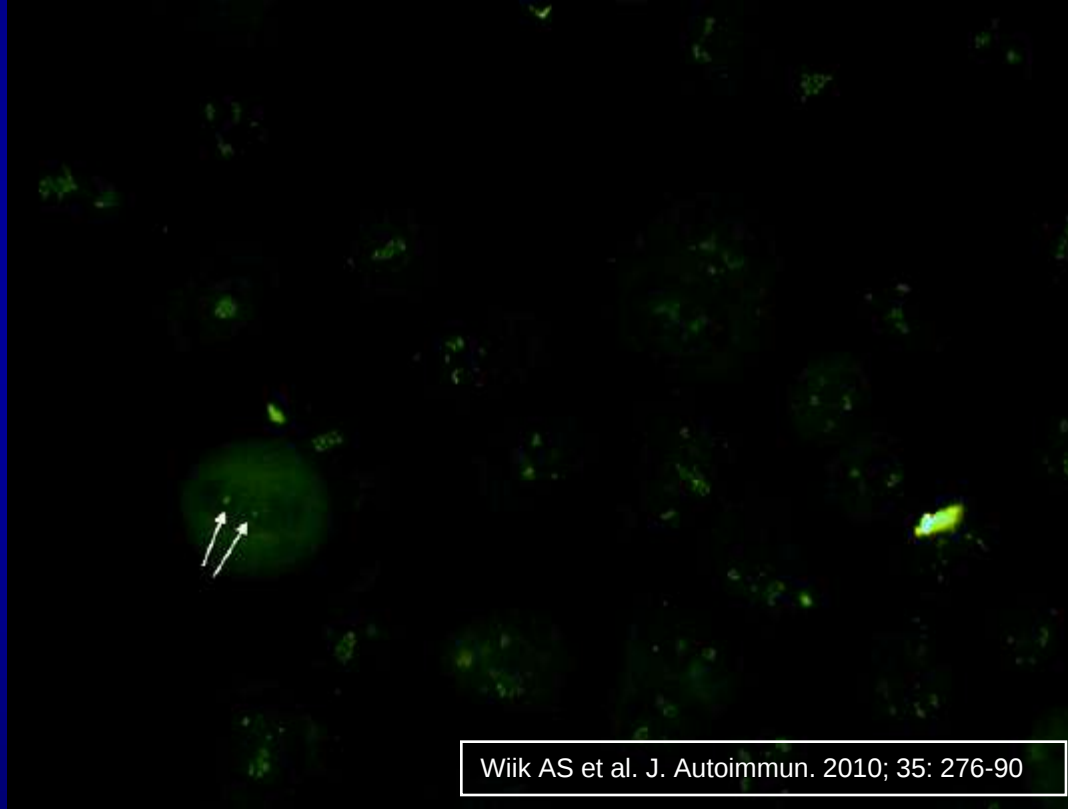
Çekirdekçikle ilişkili otoantikorlar



Akdeniz Üniversitesi arşivi

Homojen çekirdekçik paterni

Çekirdekçikle ilişkili otoantikorlar

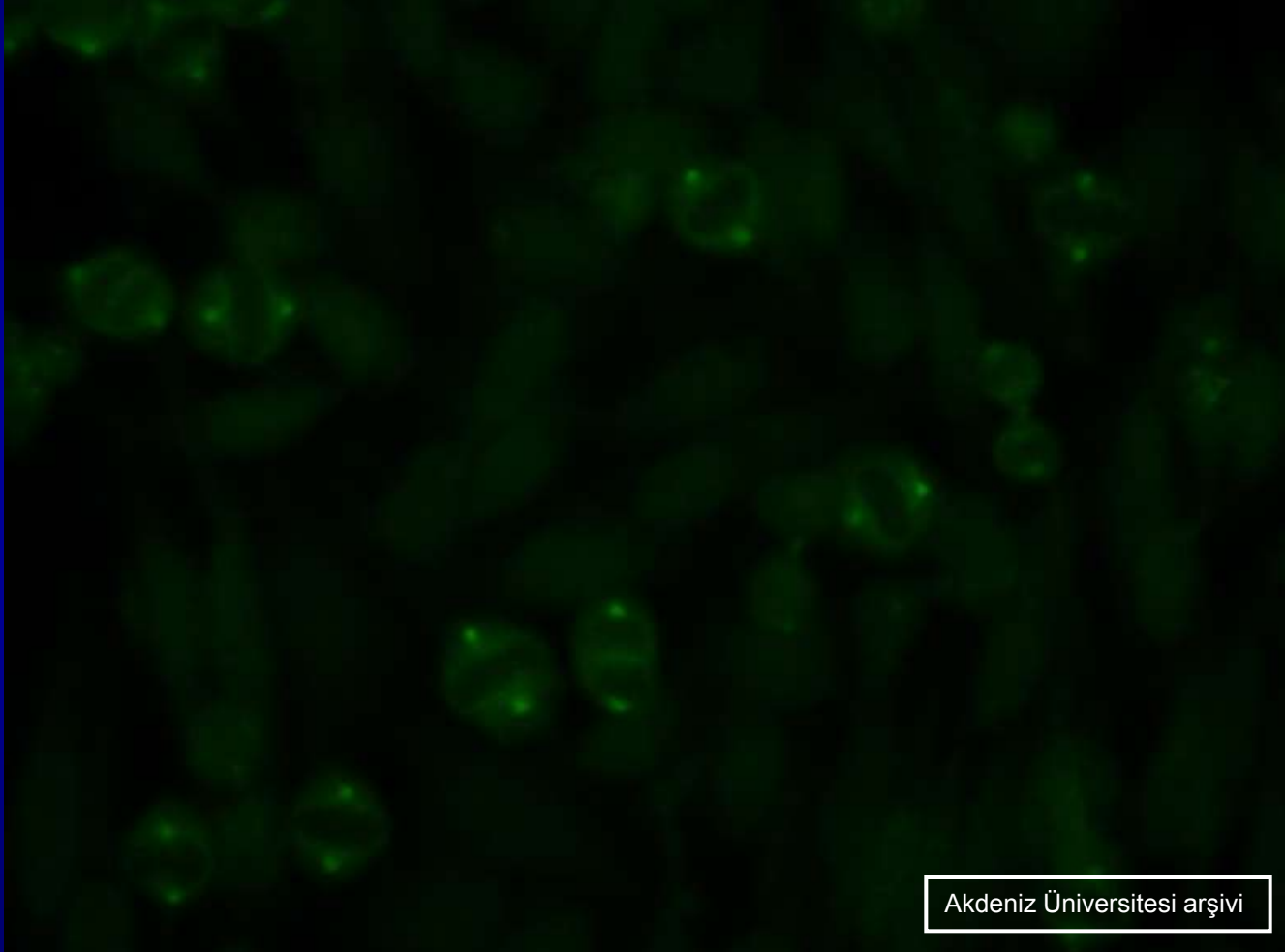


Granüler çekirdekçik paterni

Mitotik iğsi cisimle ilişkili otoantikorlar

- Sentrozomal (sentrîol) patern
- İğsi cisim kutbu (spindle pole) paterni
- İğsi cisim iplikleri (Spindle fibre) paterni
- Orta cisim (mid-body) paterni
- CENP-F paterni

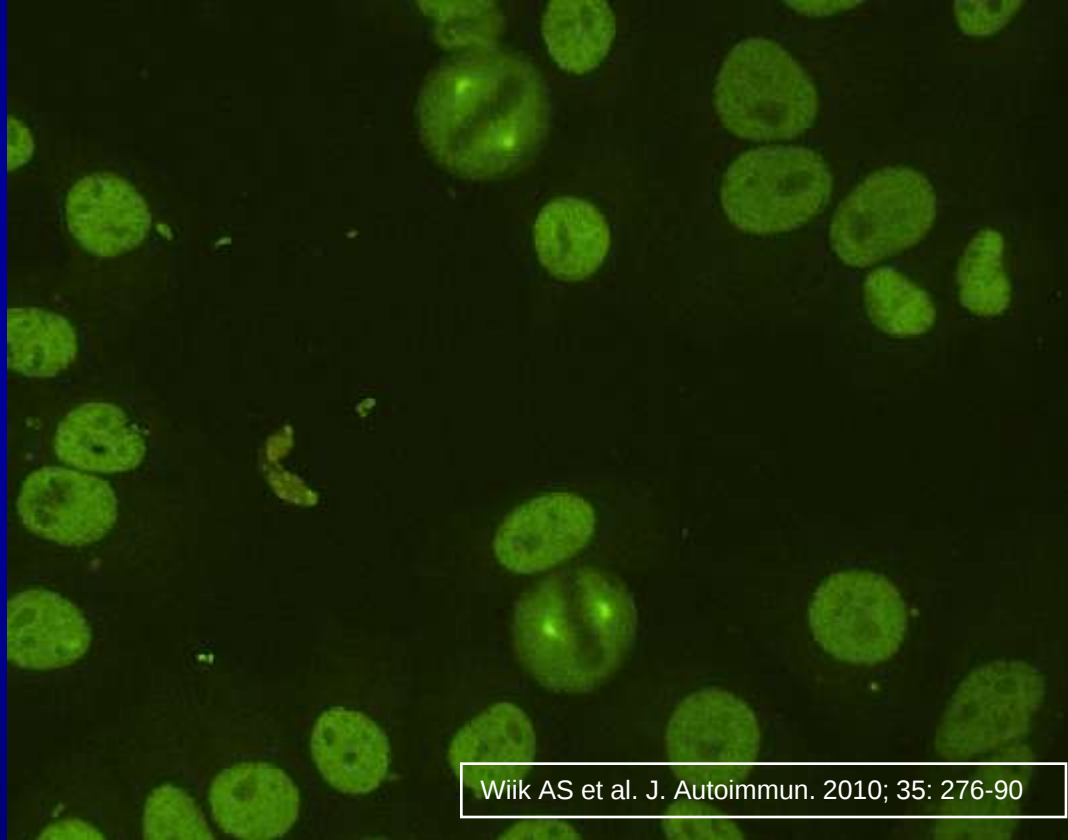
Mitotik iğsi cisimle ilişkili otoantikörler



Akdeniz Üniversitesi arşivi

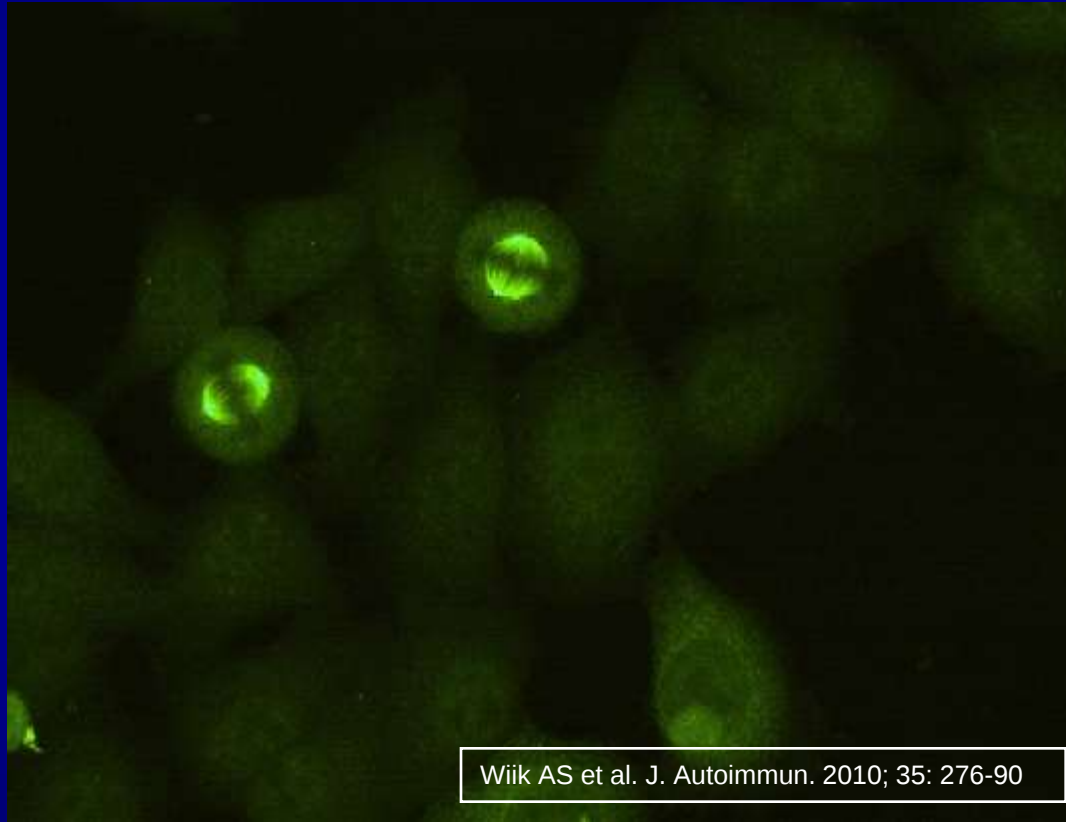
Sentrozomal (sentrîol) patern

Mitotik iğsi cisimle ilişkili otoantikorlar



İğsi cisim kutbu (spindle pole)
paterni

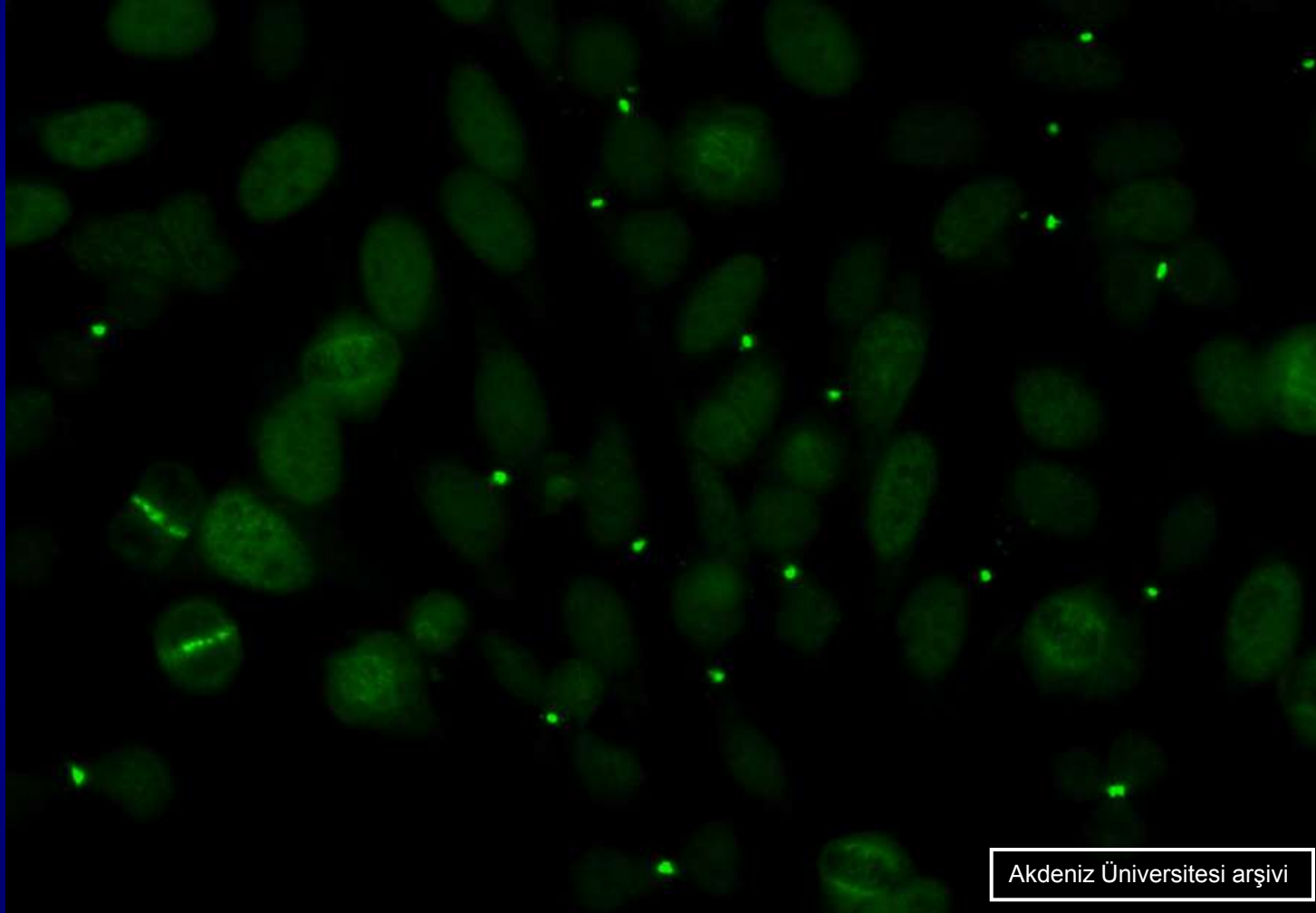
Mitotik iğsi cisimle ilişkili otoantikorlar



Wiik AS et al. J. Autoimmun. 2010; 35: 276-90

İğsi cisim iplikleri (Spindle fibre)
paterni

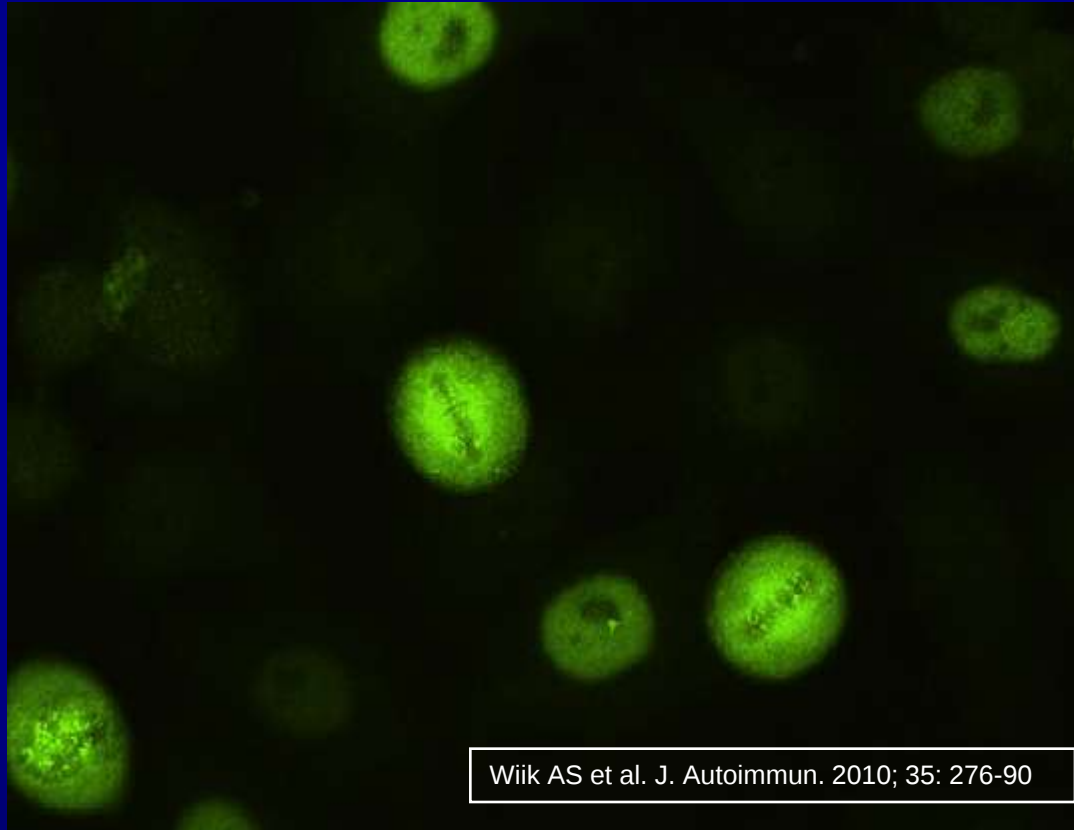
Mitotik iğsi cisimle ilişkili otoantikorlar



Akdeniz Üniversitesi arşivi

Orta cisim (mid-body) paterni

Mitotik iğsi cisimle ilişkili otoantikörler



CENP-F proteini paterni

Sitoplazma ile ilişkili otoantikorlar

- Diffüz sitoplazmik patern
- İnce noktalı (fine speckled) sitoplazmik patern
- Mitokondri benzeri sitoplazmik patern
- Lizozom benzeri sitoplazmik patern
- Golgi benzeri sitoplazmik patern
- Kontakt protein paterni
- Vimentin paterni

Klinikle ilişkisiz otoantikörler rapor edilmeli midir?

- Otoimmün hastalıklar dışındaki hastalıklarla ilişkili otoantikörler
 - Anti-CENP-F antikorları: Akciğer ve göğüs kanseri
- Hastalıklarla ilişkilendirilmeyen otoantikörler
 - Anti-sentriol antikorları
 - Anti-vimentin antikorları
 - Anti-lizozomal antikorlar

Klinikle ilişkisiz otoantikorlar rapor edilmeli midir?

- Hastalıklarla ilişkilendirilmeyen otoantikorlar: laboratuvar arşivinde sonuçları sakla, klinisyene bildirme
- Otoimmün hastalıklar dışındaki hastalıklarla ilişkili otoantikorlar: klinisyene bildir.

Pozitif sonuçların bildirimi

- Dilüsyonla sonuçların raporlanması
 - Özgüllük ↑
 - Bileşik paternlerin tanımlanması
 - Sonuç verme süresi ↑
 - Maliyet ↑
- +, ++, +++, +++++ olarak sonuçların raporlanması

IFA testi diğer otoantikör testleri (ELİSA, immunblot) ile birlikte kullanımı

- IFA ANA testi: tarama testi
- Pozitif sonuçlar diğer yöntemlerle mutlaka doğrulanmalıdırlar.
- Doğrulama yöntemlerinden en sık kullanılanları ve ticari kitleri kullanımda bulunanları
 - ELISA
 - İmmunblot:
 - yaklaşık 15 farklı proteine yönelik otoantikörler
 - maliteyler ELISA'dan 5-6 kat fazla
- IFA ANA yöntemi ile saptanan paterni oluşturabilecek birkaç otoantikörün doğrulanması amaçlı ELISA yöntemlerinin uygulanması
- IFA ANA - , klinik süphenin çok güçlü, IFA ANA negatif, doğrulama testlerini uygula. (SS-A/Ro antijeni)*.
- IFA ANA +, immunblot -. IFA yönteminde 25'den fazla paterne neden olacak otoantikörlerin saptanabiliyor.

Özet

- Kitlerin satın alınması aşamasında gerekli özenin gösterilmesi,
- Hasta örneklerinin çalışılması aşamasında üretici firmanın önerilerine sadık kalınması,
- Dış kalite kontrol programına üye olunması, Karşılaşılan paternlerin mümkün olduğunca ayrıntılı tanımlanması
- IFA ANA testlerinin diğer otoantikör saptama yöntemleri ile uygun kullanımları,
- En doğru sonuçların klinisyenlere ulaştırılmasını sağlayacaktır.

20

H03 445935

TÜRKİYE CUMHURİYETİ MERKEZ BANKASI
TÜRKİYE CUMHURİYETİ MERKEZ BANKASI

20



ELLİ

YENİ TÜRK LİRASI



65

H03 445935

ELLİ YENİ TÜRK LİRASI

65