

A Laboratóriumi Medicina Intézet hírlevele

7. szám 2015.

Tisztelt Kollégák!

Hírlevelünk hetedik számában egy immunológiai vizsgálatot és egy klinikai kémiai paraméter meghatározását befolyásoló preanalitikai fázis hibaforrásait mutatjuk be részletesen. Reméljük, hasznos információkkal szolgál. Egyúttal szeretnénk sikerekben gazdag, eredményes Új Esztendőt kívánni minden kedves kollégának!

dr. Papp Enikő szerkesztő

Szerző: dr. Lakatos Kinga

Szaklektor: Dr Belezna Zsuzsa részlegvezető

Az ANA és ENA vizsgálatok klinikai jelentősége

Mi az ANA vizsgálat?

Az Anti-Nukleáris Antitest vizsgálat indirekt immunfluoreszcenciával (IIF) történik, a humán gége karcinómából alapított HEp-2 sejt vonal használatával. Ennek az előnye, hogy az intakt sejteken nagyszámú humán autoantigén található meg natív formában. A vizsgálat során a fixált és permeabilizált sejteket lefedik a betegből származó szérummal. Fluoreszcenciával konjugált másodlagos antitest hozzáadása után a kialakult fluoreszcens jelet mikroszkóp alatt vizsgáljuk. Pozitivitás esetén leírjuk a látott egyéni mintázatokat.

Milyen esetekben kérjük ANA vizsgálatot?

Ha a betegnél a klinikai tünetek (arthritis-szerű ízületi fájdalom és duzzanat, izomfájdalom, zsibbadásérzés kézen, lábon, krónikus fáradtság, szubfebrilitás, ismeretlen eredetű bőrtünetek, pillangóerythema, fotoszenzitivitás, hajhullás) és gyulladásra utaló laboratóriumi eredmények (emelkedett CRP, gyorsult vvt- süllyedés, leukocytosis/ leukopenia, thrombocytopenia), vagy a célszerv károsodást jelei (pl. proteinuria) alapján felmerül az autoimmun betegség gyanúja, és az egyéb hasonló tüneteket (fertőzés, malignitás, allergia, gyógyszerreakció) okozó kórképeket sikerült kizárni, az esetleges autoantitestek kimutatásának irányában kérhetünk vizsgálatokat. A vizsgálat eredménye, és annak klinikai értékelése nagyban függ attól, hogy mennyire célzott a vizsgálat, mekkora az autoimmun betegség valószínűsége a beteg tünetei és a látott klinikai kép alapján. A szakirodalom alapján minél kevésbé célzottan rendelik a vizsgálatot, annál alacsonyabb lesz a betegség pre- és poszt-teszt valószínűsége. A „pre-teszt” valószínűség emelkedésével nő a teszt pozitívításának valószínűsége is.

Ha a tesztet, mint „szűrővizsgálatot” akarjuk alkalmazni és klinikailag nem megalapozott az autoimmun betegség gyanúja, a kapott pozitív eredmény nagy valószínűséggel fals pozitív lesz. Meg kell azonban jegyezni, hogy az autoantitest pozitívítás a szérumban megelőzheti a

tünetek kialakulását és a fals pozitív eredmény idővel valódi pozitívvá válhat. A szérumban levő autoantitestek mennyiségének növekedésével nő a vizsgálat pozitivitásának és betegség jelenlétének valószínűsége.

Miután azonban autoimmun betegség diagnosztizálásra került, a betegség aktivitásának követésére az ANA vizsgálat nem alkalmas, tehát ha van biztos diagnózisunk a betegről, nem érdemes újabb és újabb vizsgálatokat kérni. SLE esetében azonban az anti-dsDNA szint időszakos mérése segítséget nyújthat a betegség aktivitásának követésében. Az Amerikai Reumatológus Társaság ajánlása alapján az ANA vizsgálat leghasznosabb SLE és szisztémás szklerózis (SSc) esetén, és mérsékelten hasznos Sjögren szindróma (SjS) illetve polymyositis és dermatomyositis esetén.

Fluoreszcens mintázatok ANA vizsgálatban

Az ANA pozitívításba hagyományosan a sejtmag ellen irányuló autoantitestek tartoznak bele, azonban több, nem szigorúan a sejtmagba lokalizálódó és citoplazmatikus mintázat is fontos információt ad az autoantitestek jelenlétéről. Az antinukleáris mintázatok között elkülönítjük a sejtmag membránjára lokalizálódókat (SLE, SjS, PBC), a sejtmag plazmájára lokalizáltakat (SLE, JCA, MCTD, SjS, SSc, PM, teleangiectasiák), és a nucleolusra lokalizáltakat (SLE, SSc). Az egyéb, nem szigorúan a sejtmagra irányuló mintázatok közé a centriolum mintázat (SSc, de előfordul mycoplasma fertőzésben is), mitotikus orsó komponensei elleni mintázat (*Mycoplasma pneumoniae* fertőzés), „midbody” mintázat (SSc), illetve a CENP-F fehérje elleni autoantitest pozitívítás tartozik. Utóbbit nagyon fontos felismernie a vizsgálónak, mivel különböző klinikai tanulmányok alapján a CENP-F antitest pozitív betegek 50-80%-ban malignus folyamat zajlik.

A citoplazmatikus mintázat diffúz formája polymyositisre és anti-szintetáz szindrómára (alveolitis, arthritis, Raynaud jelenség, interstitiális tüdőbetegség) utal, azonban a betegek körülbelül 50%-ban lesz pozitív a HEp-2 sejtek sajátosságaiból adódóan. A finoman szemcsézett (fine speckled) mintázat antiszintetáz szindrómában, a mitokondriális mintázat primer biliáris cirrózisban (itt diagnosztikus kritérium), a Golgi mintázat SLE-ben, SjS-ban, reumatoid arthritiben és egyes nem autoimmun kórképekben (lymphoma, pulmonális fibrózis) pozitív. A negatív IIF nem zárja ki az autoimmun betegségeket, és még egy erősen pozitív ANA teszt sem jelzi automatikusan az autoimmun- gyulladáshoz és reumás kórképekhez.

ENA vizsgálat

Extrahálható Antinukleáris Antigen kimutatás esetén olyan autoantigének elleni autoantitest kimutatást végzünk, amelyek a sejtmagból sóoldattal kioldhatók. A vizsgálat során antigénként natív tisztított vagy rekombináns fehérjéket használunk, így a látott ANA mintázat alapján, vagy ha ANA-val nem mindig elkülöníthető antitestet keresünk, lehetőség van pontosabb autoantitest meghatározásra, megerősítésre, betegségkövetésre. A kimutatásuk dot blot (egy membránon meghatározott antigének vannak immobilizálva, ezt fedik a beteg szérumával) vagy ELISA módszerrel történik, ez utóbbi kvantitatív eredményt is ad.

Ide tartoznak az anti-Sm, anti-U1RNP, anti- SSA/Ro és az anti SSB/La antitestek, amik gyakran nem mutathatóak ki HEp-2 sejteken. Az anti-SM és az anti-U1RNP antitestek gyakran együtt fordulnak elő SLE betegek szérumában. Az a-U1RNP jellemzően MCTD betegek szérumából mutatható ki magas titerben, illetve alacsony titerben megjelenhetnek még RA és scleroderma betegek szérumában is. Az a-SSA/Ro és az a-SSB/La pozitívítás pedig Sjögren szindrómában diagnosztikus kritérium.

Anti- dsDNS antitest

Az antinukleáris antitestek közül példaként kiemelhetjük a dupla szálú (natív) DNS elleni antitestet, mely systemas lupus erythematosusban alacsony szenzitivitású, de magas specificitású autoantitest, és általában a betegség aktivitásával is korrelál (de nem minden betegben). Ennek kimutatása és kvantifikálása ELISA módszerrel történik.

Felhasznált irodalom:

Wiik AS et al. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. Journal of Autoimmunity (2010) doi.: 10.1016/j.jaut.2010.06.019

Mahler M et al. Current Concepts and Future Directions for the Assessment of Autoantibodies to Cellular Antigens Referred to as Anti-Nuclear Antibodies. Journal of Immunology Research Volume 2014, Article ID 315179. doi: 10.1155/2014/315179

Szerző: dr. Szabó Tamás

Szaklektor: Dr Kocsis Ibolya részlegvezető

A szérum laktát meghatározását befolyásoló preanalitikai tényezők

A tejsav (más néven laktát) a sejtek metabolizmusának terméke, mely piroszőlősavból keletkezik a sejtek citoplazmájában. Megfelelő oxigénellátás mellett szintje igen alacsony, a vérben csupán <2 mMol koncentrációja mérhető. Anaerob körülmények között azonban, amikor a sejtek nem jutnak elegendő oxigénhez, átmenetileg a glikolízis végtermékévé válik és akár 20 mMol-os koncentrációban is felhalmozódhat a vérben. Mivel egy szerves savról van szó, a feleslegben megjelenő tejsav a szervezet sav-bázis háztartására is hatással lehet, megváltoztatja a vér pH értékét is.

A szérum laktát mérése minden olyan esetben fontos lehet, ahol hypoxia lép fel akár akut (szívinfarktus, szepszis, sokk), akár krónikus (krónikus szívelégtelenség, COPD) cardiorespiratorikus elégtelenség esetében. A tejsav szintjének vizsgálata máj- és vesebetegségekben, illetve cukorbetegségben is indokolt. Míg azonban az első esetben az elégtelen oxigénellátás okozta a laktát felhalmozódását (A típusú laktát acidózis), a

metabolikus betegségekben elsősorban a megnövekedett oxigénszükséglet vagy a csökkent elimináció miatt szaporodik fel a tejsav (B típusú laktát acidózis).

A laktát mérés során figyelni kell a preanalitikai tényezőkre, melyek könnyen meghamisíthatják a mérési eredményt. A legnagyobb probléma a laktát mérésével, hogy a glikolízis a levett vérben is folyik tovább, így a vérvételi csőben folyamatosan termelődik laktát. Ez lassítható, ha a laboratóriumba minél gyorsabban és hűtve (akár jégen) szállítják a mintát. Alternatív megoldásként a flourid oxalátot tartalmazó (szürke kupakos) vérvételi cső is ajánlható, mivel ebben a glikolízis gátolt és így nem kell ex vivo laktát képződéssel számolni. Akármelyik módszert választjuk is, fontos, hogy a vér minél hamarabb centrifugálásra kerüljön és a szérumot elválasszuk az alakos elemektől, hogy további laktát keletkezésére ne nyíljon mód. A laktát mérése teljes vérből nem informatív, ennek eredménye nem fogja tükrözni a beteg állapotát, hanem csak a mérésig eltelt időt.

A laktát ex vivo képződésénél is nehezebben kiszűrhető tényező a nem megfelelő vérvételi technika okozta eltérés. Különösen figyelemreméltó a vérvétel szerepe azért, mert a laktát mérését gyakran kritikus állapotú betegek esetében kérik, akiknél nehéz elkerülni a hosszan tartó leszorítást, a kéz ökölbeszorítását, vagy a túvel való „keresgélést”, amelyek mind emelhetik a mért laktát szintet a valós értékhez képest. Fontos tehát, hogy a vizsgálatot kérő orvos tisztában legyen ezekkel a tényezőkkel és mindent megtegyen annak érdekében, hogy a laborba olyan minta érkezzon, aminek lemérése után valóban a beteg állapotáról kaphat képet.

További információ: Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8013108>

Szerző: dr. Szalay Balázs

Szaklektor: Dr Kocsis Ibolya részlegvezető

Módszerváltás a metotrexát szint mérése során. TDx helyett Architect:

A metotrexát bizonyos daganatos és autoimmun kórképekben használt immunszuppresszív készítmény. Toxikus mellékhatásai miatt a terápia alatt szükséges a vérszintjének a kontrollja.

A Laboratóriumi Medicina Intézetben a metotrexátszint meghatározásához korábban az Abbott Laboratories által fejlesztett TDx készüléket használtuk, mely a „gold standard”-nak számító fluoreszcencia polarizációs immunoassay (FPIA) elven működött. A készülék azonban egyre elavultabbnak számított, így a cég egy másik automatára, az Architect-re alkalmas eljárást fejlesztett ki.

Az új metotrexát teszt alapja a kemilumineszcens mikropartikulumos immunoassay (CMIA). A módszereket összemértük és jó korreláció mutatkozott az értékekben (szérumból és liquorból egyaránt), így laboratóriumunkban a napjainkban már csak az Architect-en történik a metotrexát mérése. A mérési tartomány a korábbi eljárással 0-1 $\mu\text{mol/L}$ között volt, az új eljárással azonban 0-1,5 $\mu\text{mol/L}$ -re növekedett. Az ennél magasabb értékek meghatározásához továbbra is hígítjuk a mintát. Szükség esetén 10-szeres, 100-szoros vagy 1000-szeres hígítást is alkalmazunk. A metotrexát szint nagymértékben függ attól, hogy mikor kapta a beteg az utolsó adagot. Ha röviddel a gyógyszer beadása után kéri a mérést, akkor a laborban rögtön hígított mintával indul a mérés (így hamarabb lesz eredmény, illetve kevesebbe kerül a mérés is.) Ezért nagyon fontos a labor számára, hogy a vizsgálatot kérő orvos feltüntesse ezt az időpontot.

A klinikai döntésekben szerepet játszó, 'negatív'-nak tekintett vágó érték az új módszerrel nem változott, továbbra is a 0,2 $\mu\text{mol/L}$.