

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Új eljárások az indirekt immunfluoreszcens elvű autoantitest tesztek
kiértékelésében: a számítógéppel támogatott mintázatfelismerés
lehetőségei és korlátai**

Dr. Nagy Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter

MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM
PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS
ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2024**

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
3.1. AUTOIMMUNITÁS, AUTOIMMUN BETEGSÉGEK.....	6
3.2. AZ AUTOANTITEST KIMUTATÁS KLINIKAI JELENTŐSÉGE	6
3.3. AUTOANTITEST KIMUTATÁSI MÓDSZEREK	7
3.3.1. Indirekt immunfluoreszcens teszt (IIFT)	8
3.3.2. Enzimkapcsolt immunszorbens esszé (ELISA)	9
3.3.3. Immunblot vizsgálat.....	9
3.4. AZ INDIREKT IMMUNFLUORESZCENS TESZT ELVE, KIVITELEZÉSE	10
3.4.1. Az IIF teszt elve, manuális tárgylemez-előkészítés	10
3.4.2. Biochip alapú IIF tárgylemez	11
3.4.3. A 'titerplane' kivitelezési mód	11
3.5. AZ INDIREKT IMMUNFLUORESZCENS TESZT KIÉRTÉKELÉSE.....	12
3.5.1. Fluoreszcens mikroszkópia	12
3.5.2. Hagyományos mikroszkópos leolvasás	12
3.5.2.1. Mintázatfelismerés	13
3.5.2.2. Titrálás: a végponti titer meghatározása.....	13
3.5.3. Számítógéppel támogatott kiértékelés.....	13
3.5.3.1. Képdigitalizálás automatizált fluoreszcens mikroszkóppal.....	13
3.5.3.2. Fluoreszcenciaintenzitás, a becsült végponti titer meghatározása.....	14
3.5.3.3. Mintázatfelismerés számítógépes képelemzés segítségével.....	14
3.5.3.4. Képernyőn végzett mintázatfelismerés és titrálás	14
3.5.3.5. Autoantitest kimutatásra alkalmas fluoreszcens mikroszkóp és képelemző rendszerek	15
3.6. ANTI-NEUTROFIL CITOPLAZMATIKUS ANTITESTEK (ANCA) KIMUTATÁSA	17
3.6.1. Az ANCA kimutatás jelentősége kísér-gyulladással járó és más betegségekben	17
3.6.2. Az ANCA kimutatás vizsgálati módszerei	18
3.6.3. Az indirekt immunfluoreszcens ANCA teszt	18
3.6.3.1. Előnyök és hátrányok.....	19
3.6.3.2. Automatizáció, számítógéppel támogatott eljárások.....	19
3.7. ANTINUKLEÁRIS ANTITESTEK (ANA) KIMUTATÁSA.....	19
3.7.1. Az ANA kimutatás jelentősége autoimmun betegségekben	19
3.7.2. Az ANA kimutatás módszerei	20
3.7.3. A HEp-2 indirekt immunfluoreszcens ANA teszt.....	20

3.7.3.1	Előnyök és hátrányok.....	20
3.7.3.2	Standardizáció, harmonizáció	21
3.7.3.3	Automatizáció, számítógéppel támogatott eljárások.....	24
3.7.3.4	Összetett, többszörös és kevert ANA mintázatok	25
4.	CÉLKITŰZÉS	27
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	28
5.1.	A RUTIN ANCA ÉS ANA VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGYŰJTÉSE ÉS ELEMZÉSE.....	28
5.1.1.	<i>Az egy vagy több ANA mintázattal rendelkező minták gyakoriságának meghatározása</i>	<i>28</i>
5.2.	BETEGEK ÉS MINTÁK.....	28
5.2.1.	<i>Az ANCA IIFT összehasonlító vizsgálathoz felhasznált minták</i>	<i>28</i>
5.2.2.	<i>A kevert antinukleáris mintázatok vizsgálatához felhasznált minták</i>	<i>28</i>
5.2.2.1	<i>A kevert ANA mintázatok előállítása</i>	<i>29</i>
5.3.	AZ INDIREKT IMMUNFLUORESZCENS VIZSGÁLATOK KIVITELEZÉSE	29
5.3.1.	<i>Az ANCA IIFT kivitelezése.....</i>	<i>30</i>
5.3.2.	<i>Az ANA IIFT kivitelezése</i>	<i>30</i>
5.4.	A FLUORESZCENS LEMEZEK KIÉRTÉKELÉSE, A MINTÁZATLEOLVASÁS MÓDJAI.....	30
5.4.1.	<i>Az ANCA lemezek értékelése.....</i>	<i>30</i>
5.4.2.	<i>Az ANA lemezek értékelése</i>	<i>32</i>
5.5.	AZ ANCA MINTÁZATOK FELISMERÉSÉNEK ÉS ERŐSSÉGÉNEK REPRODUKÁLHATÓSÁGI VIZSGÁLATA	33
5.6.	A BECSÜLT VÉGPONTI TITER LINEARITÁSÁNAK VIZSGÁLATA ANCA MEGHATÁROZÁS ESETÉN	33
5.7.	A SZÁMÍTOTT TITER ÉS A HAGYOMÁNYOS MÓDON MEGHATÁROZOTT VÉGPONTI TITER KORRELÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ANCA TESZT ESETÉN	33
5.8.	AZ ANCA LEMEZEK KIÉRTÉKELÉSI IDEJÉNEK SZÁMÍTÁSA.....	33
5.9.	A MYELOPEROXIDÁZ ÉS PROTEINÁZ 3 ELLENI ANTITESTEK MEGHATÁROZÁSA ELISA VIZSGÁLATTAL.....	33
5.10.	A STATISZTIKAI ELEMZÉS MÓDSZEREI.....	34
6.	EREDMÉNYEK	35
6.1.	AZ ANCA VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	35
6.1.1.	<i>A mintázat felismerésének és erősségének reprodukálhatósága.....</i>	<i>35</i>
6.1.2.	<i>A becsült titer dinamikus tartományának és linearitásának vizsgálata</i>	<i>35</i>
6.1.3.	<i>Az EPa becsült titer és a hagyományos végponti titer korrelációjának vizsgálata.....</i>	<i>36</i>
6.1.4.	<i>A negatív és nemnegatív minták elkülönítése.....</i>	<i>37</i>
6.1.5.	<i>A minták osztályozása mintázatfelismerés alapján</i>	<i>39</i>
6.1.6.	<i>Az antinukleáris és anti-citoplazmatikus antitestek hatása a mintázatfelismerésre.....</i>	<i>41</i>
6.1.7.	<i>A gépi és képernyő előtti kiértékelés hatása a leolvasási időre</i>	<i>42</i>
6.2.	A KEVERT ANA MINTÁZATOK VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI	42
6.2.1.	<i>Az egy vagy több ANA mintázattal rendelkező minták gyakorisága</i>	<i>42</i>

6.2.2.	<i>Az elvárt mintázattal való egyezés a zavaró második mintázat jelenlétében</i>	44
6.2.2.1	A szemcsés magmintázat hatása a homogén magmintázat felismerésére	44
6.2.2.2	A homogén magmintázat hatása a szemcsés magmintázat felismerésére	45
6.2.3.	<i>A megfigyelt és a várt fluoreszcencia intenzitás/titer korrelációja</i>	46
6.2.3.1	Vizsgált mintázat: homogén magmintázat, zavaró mintázat: finomszemcsés magmintázat	46
6.2.3.2	Vizsgált mintázat: finomszemcsés magmintázat, zavaró mintázat: homogén magmintázat	47
6.2.4.	<i>A szemcsés magmintázat homogén magmintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése.</i> ..	48
6.2.5.	<i>A homogén magmintázat szemcsés magmintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése.</i> ..	51
7.	MEGBESZÉLÉS	53
7.1.	AZ ANCA VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	53
7.2.	A KEVERT ANA MINTÁZATOK VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI	56
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	62
9.	SUMMARY	64
10.	AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	66
11.	TÁRGYSZAVAK	67
12.	IRODALOMJEGYZÉK	68
12.1.	HIVATKOZÁSOK	68
12.2.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	82
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
14.	FÜGGELÉK	87

1. Rövidítések jegyzéke

AC: anti-cell pattern, sejt elleni mintázat

ACyA: anti-citoplazmatikus antitest

ANA: antinukleáris antitest

ANCA: anti-neutrofil citoplazmatikus antitest

CI: konfidencia intervallum

DFS: dense fine speckled, sűrű finomszemcsés

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálat

ENA: extrahálható nukleáris antigén

EPa: EUROPattern automatizált fluoreszcens mikroszkóp

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

GBM: glomerulus bazálmembrán

HEp-2: Humán epithelioma 2 sejtvonat

ICAP: International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns

IgG: immunglobulin G; IgA: immunglobulin A; IgM: immunglobulin M

IIF: indirekt immunfluoreszcens

IIFT: indirekt immunfluoreszcens teszt

FI: fluoreszcencia intenzitás

LC: liver cytosol, máj citoszol

LKM: liver-kidney microsome, máj-vese mikroszóma

MPO: myeloperoxidáz

PR3: proteináz-3

SS-A, SS-B: Sjögren-szindróma A antigén, Sjögren-szindróma B antigén

RNP: ribonukleoprotein

dsDNS: dupla szálú dezoxiribonukleinsav

CENP-A, CENP-B: centromer protein A, centromer protein B

RNS: ribonukleinsav

NOR: nucleolus organizer region, sejtmagvacskaszervező régió

PM: polymyositis

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor, vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor

2. Bevezetés

Az indirekt immunfluoreszcens technika több évtizede jelen van az autoimmun diagnosztikában. Számos új antitest felfedezéséhez vezetett ez a módszer: szövetszeten vagy sejtrétegen sikerült kimutatni a beteg vérében keringő még ismeretlen autoantitestet. Ennek megfelelően, más módszerekkel szemben előnye, hogy képes egy lépésben számos, akár ismeretlen antitestet is detektálni. Hátránya viszont, hogy a hagyományos mikroszkópos leolvasás a sötétszobában fárasztó, időigényes folyamat, miközben nagy szakértelmet kíván. Ugyanakkor, más vizsgálati típussal nem váltható ki, elsősorban annak köszönhetően, hogy a szöveti vagy sejtes közegben az antigén konformációja megtartott, ráadásul a teszt előállításának költsége is alacsony. Az autoimmun betegségek emelkedő incidenciájának és prevalenciájának köszönhetően az autoantitest, köztük az indirekt immunfluoreszcens elvű vizsgálatok száma folyamatosan növekszik, szükségessé téve az automatizációt. Az elmúlt években olyan számítógéppel vezérelt fluoreszcens mikroszkópos rendszerek jelentek meg, melyek a látótérrel digitális képet tudnak készíteni, majd azt képernyőn megjelenítik az értékelőnek, sőt képelemző algoritmus segítségével elemzik is azokat. Természetesen az ilyen számítógéppel támogatott eljárások rutin diagnosztikai alkalmazása előtt ellenőrizni kell, hogy az új értékelési módok milyen sajátosságokkal rendelkeznek és a hagyományos leolvasással összevethető eredményeket szolgáltatnak-e.

Az értekezés alapjául szolgáló tanulmányokban az anti-neutrofil citoplazmatikus és az antinukleáris antitest diagnosztika területén vizsgáltuk egy ilyen automatizált mikroszkópos és képelemző rendszer lehetőségeit és korlátait, összehasonlítva a konvencionális kiértékeléssel.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Autoimmunitás, autoimmun betegségek

Az autoimmun folyamatokban az immunrendszer a szervezet saját összetevőit ellen indít immunválaszt. Korábban ezt önmagában kórosnak tartottuk, ma már tudjuk, hogy korlátozott formában az egészséges szervezetben is zajlik, ami egyáltalán nem káros, sőt élettani szerepe van. Többek között biztosítja, hogy az immunsejtek folyamatosan rendelkezésre álljanak, illetve részt vesz a sejtörmelék eltakarításában [1, 2].

Bizonyos körülmények mellett azonban patológiás autoimmunitás is kialakulhat, mely rövidebb vagy hosszabb fennállás után a szervek, szövetek, sejtek károsításával autoimmun betegségek kialakulásához vezethet. Az autoimmun kórállapotokat általában hajlamosító genetikai háttérrel rendelkező egyéneknél külső, környezeti tényezők indítják el, de belső, például hormonális hatásoknak is szerepe van. A kórfolyamat főként az adaptív immunrendszert érinti, mely az immuntolerancia zavarához, ennek következményeként pedig autoreaktív T- és B-limfociták megjelenéséhez vezet. Az autoreaktív B-sejtek plazmasejteké differenciálódnak, melyek autoantitesteket, azaz a szervezet saját anyagával, molekuláival reagáló ellenanyagokat termelnek [1-8].

Az autoimmun betegségek a lakosság 5-7%-át, egy újabb epidemiológiai tanulmány szerint akár minden tizedik embert érintik, mind az előfordulásuk (prevalencia), mind az új esetek száma (incidencia) emelkedést mutatott az elmúlt évtizedekben [2, 9-11].

3.2. Az autoantitest kimutatás klinikai jelentősége

Az autoimmun betegségek többsége krónikus lefolyású, hosszú preklinikai időszakkal kezdődhet, amikor nem vagy alig észlelhetők a betegség jelei, melyet a nem differenciált fázis követhet, amely alatt még nem egyértelmű, hogy pontosan melyik betegség kialakulása várható. A szimptomás szakasz alatt a tünetek változatosak, sok esetben nem specifikusak, a betegség hullámzó lefolyása miatt nem észlelhetők folyamatosan. A kóros immunválasz gyakran már csak akkor okoz a beteg vagy a kezelőorvos által észlelhető elváltozást, amikor már maradandó károsodás alakult ki. Emiatt hasznosak az olyan biomarkerek, amelyek a háttérben zajló autoimmun folyamatról objektív adatot szolgáltatnak [12, 13].

Az autoimmunitás sok eleme vizsgálható laboratóriumi tesztekkel, de gyakorlati szempontból kiemelkedik az autoantitestek kimutatása. Ennek okai az alábbiak:

- az autoimmun betegségek többségében specifikus, az adott kórállapotra jellemző autoantitest mutatható ki,
- a hosszú életű plazmasejtek folyamatosan termelik,
- a vérkeringésben magas koncentrációban van jelen, vénás mintavétellel könnyen vehető minta,
- az immunglobulin molekula relatíve stabil *in vitro*, 5 °C-on napokig, fagyasztva hetekig-hónapokig, mélyfagyasztva évekig tárolható,
- számos módszer áll rendelkezésre a kimutatásukhoz.

A kóros autoimmunitás esetén megjelenő patológiás ellenanyagok lehetnek kórjelzőek, ezek csak jelzik a betegség fennállását, de nem vesznek részt a betegség kialakításában. Másik csoportjuk patogén, azaz a betegség kialakításában, a sejt-, szövet- és szervkárosításban közvetlenül van szerepük [12-15]. Néhány annyira erősen köthető egy kórfolyamathoz, hogy a betegség elnevezése is az ellenanyag nevéből származik (pl. anti-glomerulus bazál membrán betegség, anti-foszfolipid szindróma, anti-szintetáz szindróma, stb.), de ennél gyengébb asszociáció esetén is használható a diagnózis felállításához, a diagnózis megerősítéséhez. Számos klasszifikációs kritériumban szerepel autoantitest, ezek mérése a tanulmányokban a homogén betegcsoportok kialakításához is hozzájárul [16-18]. A teljessége igénye nélkül néhány klasszifikációs kritériumrendszerben megtalálható autoantitest: anti-CCP, reumatoid faktor (rheumatoid arthritis), antinukleáris antitest, anti-Sm, anti-dsDNS (SLE), anti-U1-RNP (MCTD), anti-Jo-1 (autoimmun myositis), anti-centromer, anti-Scl-70, anti-RNS polimeráz III (szisztémás sclerosis), anti-SS-A/SS-B (Sjögren-szindróma), anti-kardiolipin, β 2-glikoprotein I (anti-foszfolipid-szindróma, SLE). Segítik a korai diagnózist, sőt több antitest már a tünetmentes időszakban jelzi a betegség kialakulásának kockázatát. Ezenkívül al csoportba történő besoroláshoz, a terápiás válasz előrejelzésére, a terápia követésére, a betegség aktivitás megítélésére, rizikócsoportokban akár szűrésre is alkalmazható [12, 13].

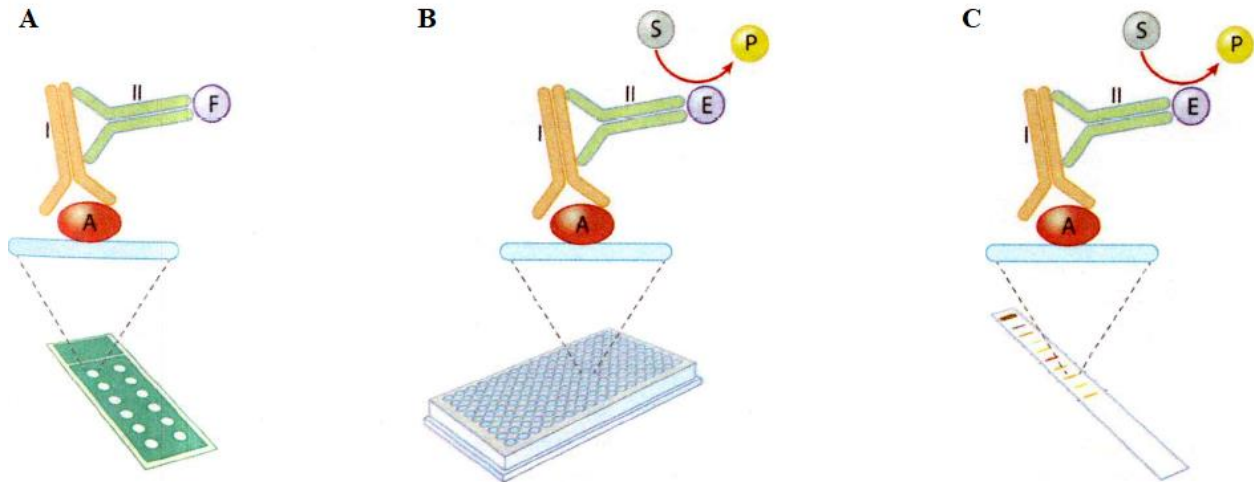
3.3. Autoantitest kimutatási módszerek

A patológiás antitestek szerencsére több jellemzőjükben elkülönülnek az élettani szerepet betöltő természetes autoantitestektől: magasabb koncentrációban fordulnak elő, erősebb affinitással rendelkeznek, jellegzetesen IgG (ritkábban IgM vagy IgA) izotípusúak, valamint az antigéncélpontjuk is gyakran más. Ezek alapján több módszer is alkalmas arra, hogy kellően szenzitív és specifikus módon határozzunk meg kóros autoimmun ellenanyagokat.

A rutin laboratóriumi gyakorlatban ezek közül az indirekt immunfluoreszcens teszt (IIFT), az enzimkapcsolt immunszorbens esszé (ELISA), valamint az immunblot vizsgálat a meghatározó, amelyek mellé az elmúlt évtizedben felzárkózott negyediknek a lumineszcens jelzésű immunesszé. Mind a négy gyakori módszerben közös elv, hogy az antitestet egy szilárd fázishoz rögzített autoantigénhez való kötődése után, a nem specifikus ellenanyagok mosással történő eltávolítását követően, egy második, jelzett antitesttel (konjugátum) mutatjuk ki (heterogén, jelzéses immunanalitikai módszer). A szilárd fázison detektált jelzés erőssége általában arányos az autoantitest koncentrációjával (immunometrikus), de ritkán kompetitív elvű teszt is előfordul, ebben az esetben a jel fordítottan arányos az analit mennyiségével [13, 19, 20].

3.3.1. Indirekt immunfluoreszcens teszt (IIFT)

IIFT esetén az antigént szövetmetszet vagy sejtréteg (szubsztrát) tartalmazza, amelyet mikroszkópos tárgylemez felületére rögzítenek (1. ábra A). Előnye, hogy a kimutatáshoz nem kell ismerni az antitest pontos célpontját, így új, ismeretlen autoantitesteket is detektálni tudunk. Sok antitest felfedezését, első kimutatását köszönheti ennek a módszernek az orvostudomány. Az antitest az autoantigén elhelyezkedésének megfelelően kötődik a szubsztráton, annak megfelelő fluoreszcens mintázat ismerhető fel, amelyből következtethetünk az autoantitest célpontjára. Hátránya, hogy az azonos elhelyezkedésű antigének elleni antitesteket nem tudjuk elkülöníteni, azok azonos mintázatot adnak, illetve néhány fehérje nem fejeződik ki olyan mennyiségben a szubsztrátban, hogy az ellene termelődött ellenanyag kimutatható legyen. Ezekben az esetekben antigén monospecifikus tesztet (pl. ELISA, immunblot) kell használnunk, amelyben tisztított vagy rekombináns formában előállított antigén köti meg az autoantitestet. Az előállításnak természetesen előfeltétele az autoantigén előzetes azonosítása, karakterizálása [19-23].



1. ábra Az indirekt immunfluoreszcens (A), ELISA (B) és immunblot (C) vizsgálatok elve. A: autoantigén, I: autoantitest a beteg mintájából, II: jelölt másodlagos antitest, F: fluoreszcens festék, E: enzim, S: színtelen enzimszubsztrát, P: színes termék [19]

3.3.2. Enzimkapcsolt immunszorbens esszé (ELISA)

Az ELISA tesztben 8x12 vájulattal rendelkező műanyag hordozó szolgál szilárd fázisként, ehhez rögzítik az ismert autoantigént (1. ábra B). A megfelelően hígított betegmintából az első inkubáció alatt kötődik ki az autoantitest. A nem specifikus ellenanyagok eltávolítása után a második inkubációs lépésben a humán immunglobulin elleni enzimmel jelölt másodlagos antitest kapcsolódik. A mért jelet az enzim által katalizált színváltozás jelenti, mely arányos az autoantitest mennyiségével. Öt-hét pontos kalibráció segítségével mennyiségi eredmény kiadását teszi lehetővé [19].

3.3.3. Immunblot vizsgálat

Az ELISA-hoz hasonlóan enzimes jelölést alkalmazunk, ellenanyag jelenlétében a színreakció a membráncsík körülhatárolt, antigénnel fedett területén jön létre, melyet szemikvantitatív skálán értékelünk (1. ábra C). Előnye, hogy egy tesztsíkra egyszerre több, akár 20 különböző, előzetesen azonosított autoantigén is rögzíthető, így betegség specifikus, multiplex esszék is kialakíthatók. Az ELISA és immunblot vizsgálatok közös gyenge pontja, hogy a tisztítás, előállítás és a szilárd fázishoz történő rögzítés során az antigén építésszerkezete megváltozhat, ami fals pozitív/negatív eredményekhez vezethet [19].

3.4. Az indirekt immunfluoreszcens teszt elve, kivitelezése

3.4.1. Az IIF teszt elve, manuális tárgylemez-előkészítés

Mikroszkópos tárgylemezen akár húsz, egymástól hidrofób bevonattal elválasztott területet hoznak létre, majd ide rögzítik a szövetszövetet vagy a sejtréteget. Néhány gyártó a tárgylemezre rögzített antigéntartalmú microdotot, antigénnel fedett mikrogyöngyöket, illetve autoantigénnel transzfektált sejteket is használ mint szubsztrát. A leggyakrabban IIF módszerrel kimutatott antitesteket és szubsztrátjaikat az 1. táblázat tartalmazza [24].

Antitest	Szubsztrát típusa	Szubsztrát
ANA	sejtréteg	HEp-2
dsDNS	sejtréteg	Crithidia luciliae
neutrofil granulocita citoplazma (ANCA)	sejtréteg	humán neutrofil granulocita
myeloperoxidáz	microdot	MPO antigén speciális mátrixban
proteináz-3	gyöngy	PR3-mal fedett gyöngy
mitokondrium	szövetszövet	patkány/egér máj/vese/gyomor
gyomor parietális sejt	szövetszövet	patkány gyomor
simaizom, LKM, LC	szövetszövet	patkány/egér máj/vese/gyomor
mellékvese kéreg	szövetszövet	majom mellékvese
hypophysis	szövetszövet	majom, egér hypophysis
szívizom	szövetszövet	majom szívizom
endomysium	szövetszövet	majom oesophagus, humán köldökzsínór artéria
pancreas szigetsejt	szövetszövet	majom pancreas
bőr	szövetszövet	majom oesophagus
élesztősejt	sejtréteg	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ovárium	szövetszövet	majom ovárium
Purkinje-sejt	szövetszövet	majom kisagy
aquaporin-4	sejtréteg	transzfektált HEK sejt

1. táblázat A leggyakrabban IIF módszerrel kimutatott antitestek és szubsztrátjaik. ANA: antinukleáris antitest, HEK: human embryonic kidney, LC: liver cytosol, LKM: liver-kidney microsome

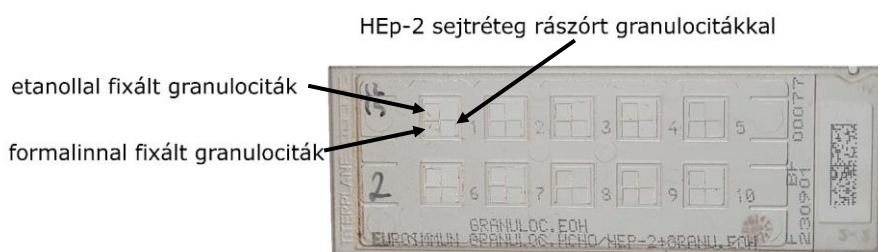
A fixálás mellett a sejtmembránok permeabilizálása is megtörténik, ami az ellenanyagok számára hozzáférhetővé teszi akár a sejtmagban található antigéneket is. A módszerbeállítás során meghatározott arányban hígított – általában szérum – mintában található autoantitest az első inkubációs idő alatt bekötődik, ha a szubsztrátban a megfelelő antigén jelen van. Az első mosási lépés alatt eltávolítjuk a nem specifikus antitesteket. A második inkubációs idő alatt a humán immunglobulin elleni, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt másodlagos antitest (konjugátum)

kapcsolódik az autoantitesthez. A fluoreszcens festék érzékenysége miatt a lemezeket ettől a ponttól kezdve fénytől védeni kell, amennyire az lehetséges. A konjugátum határozza meg, hogy milyen izotípusú ellenanyagot mutat ki a teszt. Ha a célunk IgG autoantitest kimutatása, akkor gamma nehézlánc elleni antitestet használunk. A be nem kötődött konjugátumot a második mosással távolítjuk el. Utolsó lépésként fedőmédiomot, majd fedőlemezt helyezünk a tárgylemezre [19-23].

A tárgylemez előkészítést manuálisan és automatizáltan is el lehet végezni. Előbbi esetében a minta előhígítása, a minta és a konjugátum felvitele kézi pipetázással történik, míg a mosást mosókádban végezzük [20].

3.4.2. Biochip alapú IIF tárgylemez

Az Euroimmun cégnél az IIF tesztek gyártása során a szubsztrátot nem hagyományos tárgylemezre, hanem vékony üveglapra rögzítik, melyet aztán 2x2 mm-es négyzetekre darabolnak fel. Ezekből a különböző szubsztráttal fedett 'biochip'-ekből maximum hatfelét közvetlenül egymás mellé tudnak helyezni egy speciális műanyag tárgylemezre, akár tíz ilyen összetett reakciómezőt alakítva ki egy lemezen. A több biochipből álló reakciómezőre egy pipetázással lehet a mintát felvinni, így egy lépésben többféle szubsztáttal lehet a mintát inkubálni, majd a fluoreszcens mintázatokat egymás mellett, egymással összevetve kiértékelni.

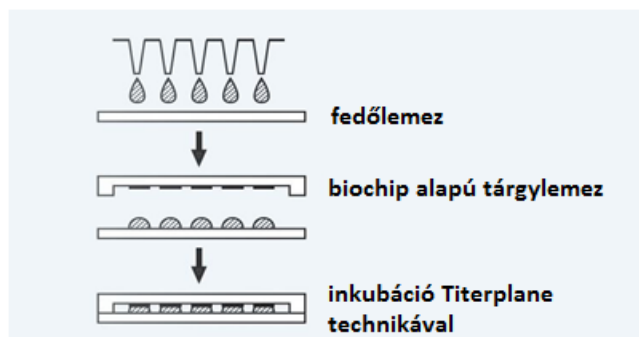


2. ábra Biochip alapú tárgylemez anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek kimutatására. A lemezen 10 reakciómező, mindegyikben 3 biochip található.

3.4.3. A 'titerplane' kivitelezési mód

Az Euroimmun speciális tárgylemezének kialakítása azt is lehetővé teszi, hogy a hagyományos kivitelezéssel szemben a mintát és a konjugátumot ne a tárgylemez reakciómezőire pipetázzuk fel, hanem egy megfelelően kialakított tartó mélyedéseibe, amibe aztán a biochip tárgylemezt reakciómezőkkel lefelé helyezzük be. Ennek az eljárásnak az előnye, hogy a mintainkubáció minden reakciómezőn pontosan egy időben indul el, szemben a hagyományos kivitelezéssel, ahol

a pipettázás időigénye miatt ez kis csúszással történik. Emellett előnye az is, hogy használatával nem szükséges a lemezeket nedveskamrában inkubálni.



3. ábra A 'Titerplane' indirekt immunfluoreszcens teszt kivitelezési mód.

3.5. Az indirekt immunfluoreszcens teszt kiértékelése

3.5.1. Fluoreszcens mikroszkópia

Az elkészített IIFT lemezeket fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeljük. A használt fluoreszcens festék elnyelési spektrumának megfelelő gerjesztő fényt a modern fluoreszcens mikroszkópokban LED (light emitting diode) biztosítja, a megvilágítás episzkopikus, a gerjesztő fény az objektíven keresztül éri el készítményt. Specifikus autoantitest hiányában fénykibocsátás nem jön létre, a látótér sötét marad. Pozitivitás esetén a gerjesztő fénynél hosszabb hullámhosszú (más színű) fotonok keletkeznek, melyet a fluoreszcens festéknek megfelelő dikroikus szűrő elválaszt a gerjesztő fotonoktól. A sötét háttéren megjelenő, könnyen észlelhető fluoreszcens jel biztosítja az IIFT nagy analitikai érzékenységét. A fluoreszcencia kioltás miatt a megvilágítás hatására a jel intenzitása idővel csökken (photobleaching vagy fading) [20, 23, 25].

3.5.2. Hagyományos mikroszkópos leolvasás

Az IIF lemezek tradicionális értékelési módja a szemmel történő leolvasás a mikroszkópban, amit a konjugátum fényérzékenysége miatt sötétszobában végzünk. A nagyítás a szubsztráttól függően 100x, 200x vagy 400x. A lemezek cseréje, a ráállás a következő reakciómezőre, a fókuszálás és a megfelelő látótér kiválasztása megelőzi a tényleges értékelést. Az eredményeket munkalistára írjuk fel, majd az értékelés befejezése után átvezetjük a laboratóriumi informatikai rendszerbe [20, 23].

3.5.2.1 *Mintázatfelismerés*

A másodlagos ellenanyaggal megjelölt autoantitest a szubsztrátban elérhető antigén elhelyezkedésének megfelelően ad jelet, jellegzetes fluoreszcens mintázatot hozva létre. Ideális körülmények között negatív minta esetén egyáltalán nem látható fluoreszcens szignál, de a gyakorlatban a negatív és pozitív eredmény elkülönítését zavarhatja a konjugátum aspecifikus bekötődése, a szubsztrát vagy a minta autofluoreszcenciája. A mintázat felismerésének előfeltétele a szubsztrát szövettani és sejtmorfológiai ismerete. A fluoreszcens jel arányos a mintában található autoantitest mennyiségével, így a fényintenzitás megítélésével a mintázat erőssége szemikvantitív skálán rögzíthető. Mind a mintázat felismerése, mind az erősségének megítélése függ a mikroszkóp optikai tulajdonságaitól, a leolvasó személytől, főként képzettségétől, tapasztalatától, de még egy értékelő esetén is maradnak szubjektív elemek, emiatt a leolvasás variabilitása jelentős [20, 23].

3.5.2.2 *Titrálás: a végponti titer meghatározása*

Ha a kvalitatív eredmény vagy a mintázat erősségének közlése nem elegendő, akkor az ún. végponti titer meghatározására is lehetőség van. Ennek standard kivitelezési módja az, hogy a szűrőhígítási fokból kiindulva a minta sorozathígítását készítjük el (általában kétszeres vagy négyszeres tova futó hígítás), majd meghatározzuk azt a legnagyobb hígítást, ahol az adott mintázat még pozitív. A végponti titer értékét a hígítási arány (pl. 1:80 titer) vagy annak reciproka (pl. 80 1/titer) formájában adjuk meg a leleten.

3.5.3. Számítógéppel támogatott kiértékelés

Az autoimmun betegek számának emelkedése miatt növekszik az igény az autoantitest vizsgálatok, ezen belül az IIF tesztek iránt is. Az IIFT értékelése időigényes, nagy tapasztalatot igényel, számos szubjektív tényezőtől függ, emiatt az elmúlt egy-két évtizedben több gyártó számítógéppel támogatott rendszerek kifejlesztésébe kezdett.

3.5.3.1 *Képdigitalizálás automatizált fluoreszcens mikroszkóppal*

Első lépésként a tárgylemezek mozgatása szükséges, melyet számítógép-vezérelt, motorizált mikroszkóp végez el, kiemeli a tárgylemezt a lemeztároló egységből, majd a reakciómezőket egymás után az objektív alá helyezi. Autofókusz eljárás segítségével a szubsztrátot a fókusz síkba mozgatja, majd legalább egy látótérrel a beépített 2-5 Mpixel felbontású kamerával digitális képet készít, majd elmenti. A kép színmélysége általában 24 bit, de ebből a leggyakrabban használt FITC fluorokróm fluoreszcencia erősségét csak a zöld csatorna tárolja 8 biten.

3.5.3.2 Fluoreszcenciaintenzitás, a becsült végponti titer meghatározása

A digitális kép egyes pixeleinek fényerősségéből különböző számértékek, fluoreszcencia intenzitásértékek származtathatók. Ezek az értékek felhasználhatók például a pozitív és negatív kontroll erősségének követésére, mint a módszer belső minőségellenőrzési paramétere.

Mivel az IIFT esetén a fluoreszcenciaintenzitás arányos az autoantitest koncentrációval és a digitális képen a fényerősség pontosan meghatározható, lehetséges a szűrőhígításban látható fluoreszcencia erőssége alapján megbecsülni, hogy mennyi lenne a minta végponti titere, ha azt hagyományos titrálással, sorozathígítás készítésével határoznánk meg.

3.5.3.3 Mintázatfelismerés számítógépes képelemzés segítségével

Az elkészített kép elemzésével számítógépes algoritmusok arra is képesek, hogy negatívnak vagy pozitívnak minősítsék a mintát, sőt a fejlettebb változatok akár a mintázatok felismerésére, a pozitív minták osztályozására is alkalmasak. Általánosságban elmondható, hogy a sejtes szubsztrátokról készült képek elemzése könnyebben automatizálható, mint a sokkal komplexebb szövetek analízise. A képelemzés első lépése a képek előkészítése, normalizálása, a pixelintenzitás eloszlása alapján küszöböléssel (thresholding, pl. Otsu-féle) az előtér és háttér elválasztása. Sejtszintű elemzés esetén ezután történik a sejtek vagy a sejtmagok határainak megkeresése, a szegmentálás pl. vízválasztó (watershed)-módszer segítségével. Az antinukleáris antitestek esetén néhány automatizált eljárás a sejtmag helyének jelölésére DNS festéket (pl. 4',6-diamidino-2-fenil-indol – DAPI, vagy propidium-jodid) is használ. Képszintű elemzés esetén nincs szükség régió alapú szegmentálásra. A következő lépés a mintázat felismerés, leggyakrabban osztályozó algoritmusok segítségével. A jellemzők keresése (feature extraction) történhet tárgyterületi szakértő bevonásával (machine learning) vagy anélkül (deep learning). A klasszifikáció általában felügyelt (supervised), mivel az osztályokat (IIFT esetén a fluoreszcens mintázatok) előre meghatározzák, definiálják. A számítógépes mintázatfelismerés matematikai modelljeinek részletes ismertetése meghaladná a dolgozat kereteit [26-35].

3.5.3.4 Képernyőn végzett mintázatfelismerés és titrálás

Természetesen a gépi képelemzés eredményeit közvetlenül nem lehet kiadni, annak ellenőrzése szükséges, illetve a vizsgálatok egy részénél nincs is lehetőség a számítógépes felismerésre. Ilyenkor az automatizált mikroszkóp által készített képet emberi értékelő a számítógép képernyőn elemzi és állapítja meg, hogy látható-e és ha igen milyen mintázat. Egy minta sorozathígításáról készült képek esetén pedig a monitoron olvasható le a végponti titer értéke is.

3.5.3.5 Autoantitest kimutatásra alkalmas fluoreszcens mikroszkóp és képelemző rendszerek

Az automatizált mikroszkóp, kamera és képelemző szoftverek egy egységként, zárt rendszerben működnek, a képelemző algoritmus csak a gyártó saját reagensével használható. A legismertebb ilyen rendszerek adatait a 2. táblázat tartalmazza.

Név	Gyártó	Magyar forgalmazó	Sebesség	Kapacitás	Objektív	Mintázat-felismerés	Minőség	Csak digitális	Egyéb
Aklides	Medipan	Diagnosticum	40 mp/3 kép	5x12	10x,40x	ANA, ANCA	CLIFT	EMA, LKS	titer becslés
akiron NEO	Medipan	Diagnosticum	35 mp/minta	2x12	20x	ANA, ANCA	CLIFT	EMA, LKS	titer becslés
Nova View	Inova	Werfen	45 mp/3 kép	5x12	4x,10x, 40x	ANA, ANCA	CLIFT	EMA, LKS	titer becslés
Europattern	Euroimmun	Immunotrin	20 mp/1 kép	50x10	10x,20x, 40x	ANA (kevert is), ANCA	CLIFT	EMA, LKS	titer becslés
Europattern Live	Euroimmun	Immunotrin	2 mp/1 kép	5x10	20x	ANA, ANCA	CLIFT, LKS	EMA	titer becslés
Zenit G-Sight	Menarini	nincs	>60 mp /minta	5x14	4x,40x	ANA, ANCA	CLIFT, EMA	LKS	5, 50 vagy 220 kép/minta
Zenit Pro	Menarini	nincs	N/A	18x12	4x,10x, 20x	ANA, ANCA	CLIFT	EMA, LKS	lemezelőkészítő is, titer becslés
Euroimmun UNIQO	Euroimmun	Immunotrin	N/A	18x12	4x,10x, 20x	ANA, ANCA	CLIFT, LKS	EMA	lemezelőkészítő is, titer becslés
Helios	Aesku	Medilab	10 mp/kép, 1-10 kép	20x12	4x,10x, 20x,50x	ANA, ANCA kiegészítő modul	ANA, ANCA,	EMA, LKS	lemezelőkészítő is, titer becslés
Image Navigator	Immuno-Concepts	Biomedica	25 mp/4 kép	4x21, 8x21	40x,20x, 10x,4x	ANA, ANCA kiegészítő modul	ANA, ANCA	CLIFT, EMA,	HEp-2 vagy HEp-2000, LKS: 16 kép/minta

2. táblázat Autoantitest kimutatásra alkalmas fluoreszcens mikroszkóp és képelemző rendszerek és jellemzőik.

N/A: nincs adat, ANA: antinukleáris antitest, ANCA: anti-neutrofil citoplazmatikus antitest, CLIFT: Crithidia luciliae immunfluoreszcens teszt, EMA: anti-endomysium antitest, LKS: máj, vese, gyomor rágcsáló szövetek

3.6. Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) kimutatása

3.6.1. Az ANCA kimutatás jelentősége kísér-gyulladással járó és más betegségekből

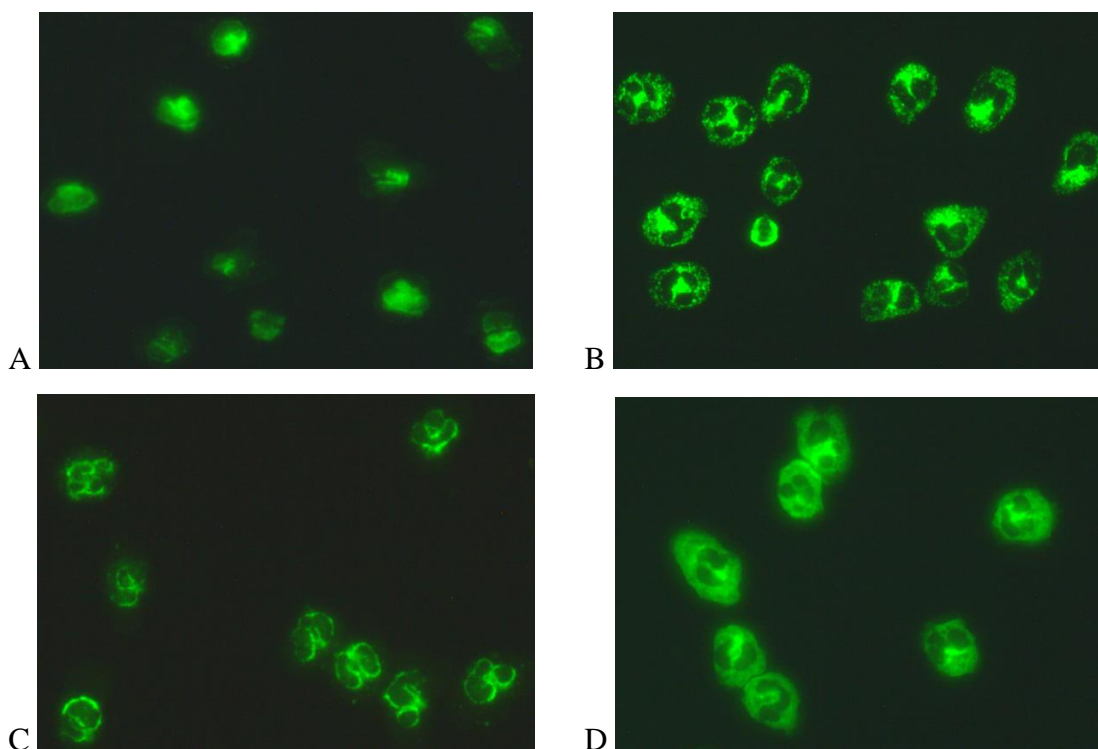
Az anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek felfedezését az IIF technika tette lehetővé az 1980-as években, majd később sikerült azonosítani, hogy az antigének a neutrofil sejtek granulumaiban elhelyezkedő fehérjék. Az ANCA kimutatás számos gyulladással és autoimmun betegségnél hasznos diagnosztikus marker [36-40]. Közülük is kiemelkednek azok a kísér-gyulladással járó kórképek, melyeket a jelenlegi Chapel Hill nozológiai rendszer az ANCA asszociált vasculitisek csoportjába sorol (mikroszkópikus polyangiitis, polyangiitis granulomatosis (korábbi néven Wegener-granulomatosis), eosinophil polyangiitis granulomatosis (Churg–Strauss-szindróma)) [41-46]. A többi vasculitis közül kiemelhető még az anti-GBM betegség (Goodpasture-szindróma), melyben a nevének megfelelően a glomerulus bazálmembrán elleni antitest kimutatása a döntő, de az ANCA pozitívitásnak is van prognosztikai szerepe [47, 48]. Bár nem mérhető össze a vasculitis diagnosztikában betöltött szerepével, de az ANCA kimutatás gyulladással járó bélbetegségekből is jelentőséggel bír [49-51]. A colitis ulcerosa-ban szenvedő betegek akár 88%-ánál indirekt immunfluoreszcens módszerrel ANCA mutatható ki, míg ez az arány csak 6-16% a Crohn-betegség esetében. Több tanulmány azt mutatta ki, hogy a laboratóriumi tesztek között az ANCA és a *Saccharomyces cerevisiae* elleni antitestek (ASCA) egyidejű használata nyújtja a legmagasabb diagnosztikai hatékonyságot a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség elkülönítésében [52, 53]. Az autoimmun májbetegségeket vizsgáló tanulmányokban a primer szklerotizáló cholangitisben (PSC) szenvedő betegek többségében találtak reaktivitást ANCA-antigénekre, míg kisebb hányaduk volt pozitív autoimmun hepatitis és a primer biliaris cholangitis esetében. Az autoimmun májbetegségekből az ANCA-vizsgálat jelentőségét mutatja az is, hogy szerepel az International Autoimmune Hepatitis Group aktualizált diagnosztikai pontrendszerében [54, 55]. ANCA kimutatható több szisztémás autoimmun (rheumatoid arthritis, Felty-szindróma, szisztémás lupus erythematosus, szisztémás sclerosis) és fertőző (endocarditis, *Pseudomonas aeruginosa*-fertőzés, cisztás fibrózisban, humán immunhiányvírus-fertőzés) betegségben is [56-65]. Az ANCA megjelenését tumor, illetve néhány gyógyszer (hidralazin, propiltiouracil, levamisol) is kiválthatja [36, 66, 67].

3.6.2. Az ANCA kimutatás vizsgálati módszerei

Az ANCA kimutatás eszköze kezdetben az IIFT volt etanollal fixált neutrofil granulocitákon, majd az antigének azonosítását követően a legfontosabb két antitest, a myeloperoxidáz (MPO) és a proteináz-3 (PR3) elleni ellenanyag ELISA módszerrel is mérhetővé vált. Az utóbbi években a lumineszcens immunszékek is elérhetőek lettek [68].

3.6.3. Az indirekt immunfluoreszcens ANCA teszt

Az ANCA mintázatok típusait egy nemzetközi ajánlás és annak kiegészítése írja le [69, 70]. A klasszikus diffúz citoplazmatikus ('C-ANCA') mintázat erős asszociációt mutat az anti-PR3 antitestekkel, míg az anti-MPO antitestek állnak az esetek döntő többségében a klasszikus perinukleáris ('P-ANCA') mintázat háttérében. Emellett megkülönböztetünk 'atípusos C-ANCA' és 'atípusos ANCA' mintázatokat is. Több laboratórium formaldehiddel rögzített neutrofil granulocitákat is használ az etanollal fixált sejtek mellett, ami segíti az antinukleáris és ANCA megkülönböztetését és a mintázatok felismerését. Ezzel a technikával a formalin rezisztens P-ANCA és C-ANCA mellett, láthatunk formalinra érzékeny atípusos P-ANCA és atípusos C-ANCA mintázatokat is (4. ábra). [71, 72].



4. ábra Anti-neutrofil citoplazmatikus antitest mintázatok (etanollal fixált granulocyták, 400x). A: P-ANCA, B: C-ANCA, C: atípusos P-ANCA, D: atípusos C-ANCA

3.6.3.1 Előnyök és hátrányok

Az ANCA IIFT előnye, hogy új, ismeretlen antitestek kimutatására is alkalmas, illetve az antigén építésszerkezete ennél a módszernél sérül a legkevésbé, hátránya, hogy a leolvasás szubjektív, időigényes, nehezebben automatizálható és titrálással is legfeljebb szemikvantitatív eljárás. Miután a legfontosabb, legnagyobb klinikai relevanciájú anti-MPO és anti-PR3 antitestek meghatározása ELISA vagy újabban kemilumineszcens módszerekkel megoldható, más neutrofil granulocita elleni antitestek jelentősége pedig jóval kisebb, így az ANCA diagnosztikában az IIF technika kezd háttérbe szorulni [40, 45]. Továbbra is szükséges azonban mint az MPO/PR3 elleni antitestek megerősítő/alternatív tesztje vasculitis gyanúja esetén, illetve mint az egyéb nem érgyulladásos kórképek kiegészítő diagnosztikus vizsgálata [40, 45, 46].

3.6.3.2 Automatizáció, számítógéppel támogatott eljárások

Az ANCA IIF elvű kimutatására nincs olyan mennyiségben igény, mint az ANA tesztelésre, ráadásul a granulociták többféle fixálási módja, illetve zavaró antitestek jelenléte miatt az értékelés az átlagosnál bonyolultabb. A számítógépes eljárások mégis hasznosak, hiszen képernyőn egy nem egyértelmű eset könnyebben megvitatható, illetve a képek digitális tárolásával egy előző mintában észlelt mintázattal való összevetés is lehetséges.

3.7. Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása

3.7.1. Az ANA kimutatás jelentősége autoimmun betegségekben

Az antinukleáris antitestek kimutatásának szisztémás autoimmun betegségek diagnosztizálásában elvitathatatlan jelentősége van. Kevert kötőszöveti betegségben minden beteg ANA pozitív, közel 100% a pozitivitás gyakorisága szisztémás lupus erythematosusban (SLE), a szisztémás sclerosisban szenvedők többsége, a Sjögren-szindrómás betegek 50-70%-a, a rheumatoid arthritises betegek közel fele, de az autoimmun myositisben szenvedők jelentős része is ANA pozitív. A szervspecifikus autoimmun kórképek közül az ANA klinikai jelentőségét nézve kiemelkednek az autoimmun májbetegségek, különösen nagy arányban detektálható antinukleáris antitest autoimmun hepatitis és primer biliáris cholangitis diagnózisa esetén. Néhány gyulladásos kórképben (juvenilis idiopathiás arthritis (JIA), gyulladásos bélbetegségek) is gyakran találkozunk ANA pozitivitással [73-78]. Ezenkívül többféle fertőzés (HCV, HIV, SARS-CoV2, intracelluláris baktérium) is sejtmag elleni antitest termelését indíthatja el [79-83]. Az ANA pozitivitás megítélése, értékelése nem könnyű, mert az aránya a kimutatási módszertől is függ, emellett

egészséges egyénekben is megjelenhet [76]. Tünetmentes egyénekben ráadásul nem tekinthetünk a kimutatott antinukleáris antitestre fals pozitivitásként, mert jóval a betegség megjelenése előtt detektálható lehet, jelezve a szubklinikai autoimmunitást [84].

Néhány kórképben prognosztikai jelentősége is van, JIA-ban például az ANA pozitivitás az uveitis kialakulásának rizikófaktora [85]. Az antitest mennyiségének meghatározására szinte mindig szükség van, hiszen a magasabb koncentráció erősebb asszociációt mutat a betegséggel, valamint összefügghet a betegség aktivitásával is [86-88].

3.7.2. Az ANA kimutatás módszerei

Az LE sejt jelenséget (Hargraves, 1948) tekintjük a sejtmag elleni immunreakció első bizonyítékának [89], de az indirekt immunfluoreszcens módszert is már 1957-ben bevezették Holborow és munkatársai az ANA kimutatási módszerek közé [90], melyhez később csatlakozott az immunprecipitáció, a hemagglutináció és a komplement fixáció, majd az 1970-es években az immunelektroforézis, a Western blot és az ELISA. A hetvenes évektől kezdve az állati szöveteken végzett IIF módszert fokozatosan felváltották a humán sejtvonalakkal végzett vizsgálatok, mára szinte kizárólagossá vált a humán epithelioma 2 (HEp-2) sejtek használata. A modern ANA diagnosztika eszköztára a kemilumineszcens, a citometriás gyöngy immunesszé (CBA: cytometric bead assay) és a partikulum alapú multianalit technika (PMAT: particle based multianalyte technology) megjelenésével vált teljessé [91].

3.7.3. A HEp-2 indirekt immunfluoreszcens ANA teszt

3.7.3.1 *Előnyök és hátrányok*

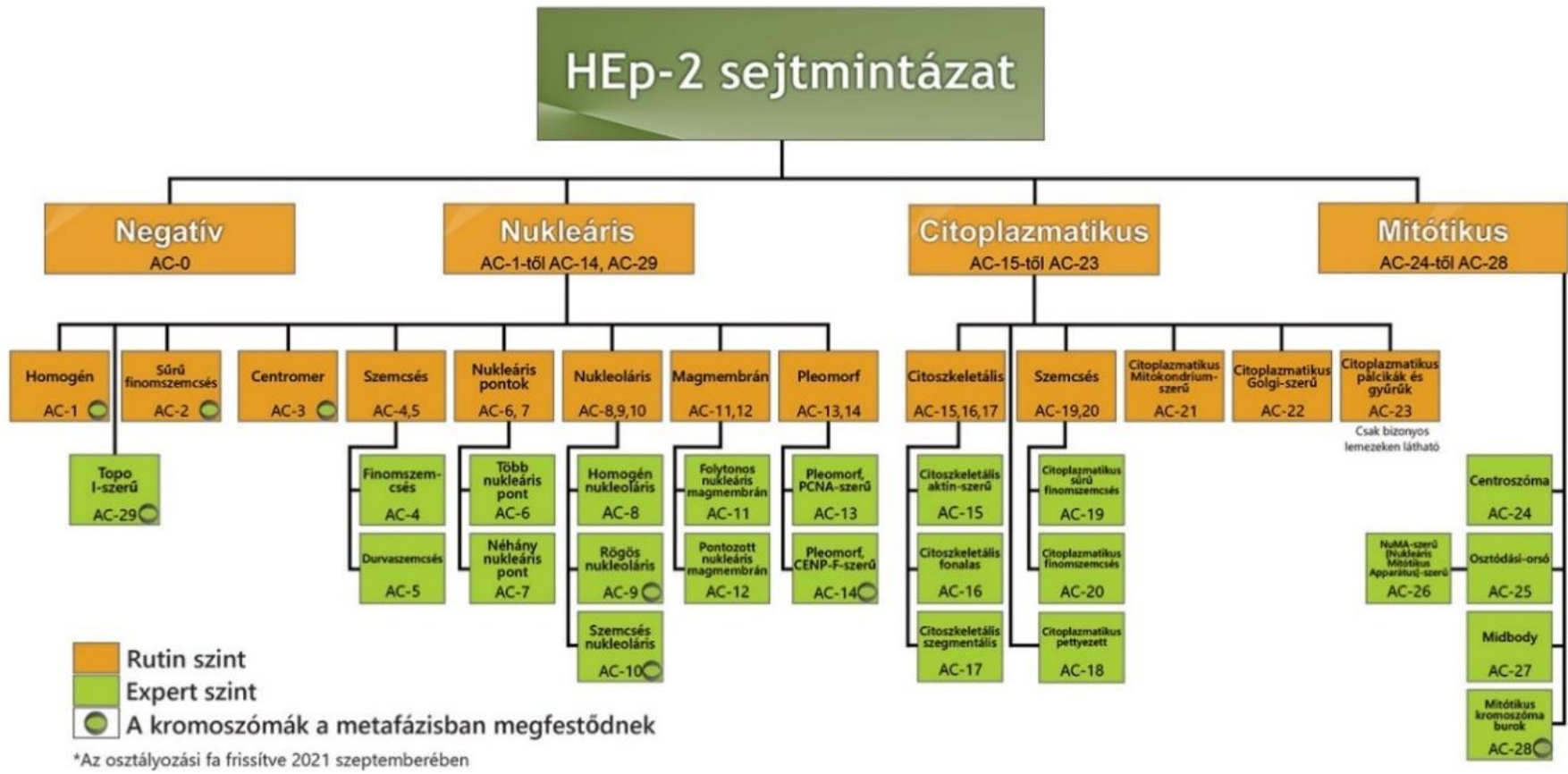
A HEp-2 sejtrétegen végzett IIFT elterjedése annak köszönhető, hogy humán eredete miatt az antigének szerkezete előnyösebb az autoantitestek kimutatására. Könnyen tenyészthető, ami olcsóbbá teszi a lemezek előállítását. Eredetileg humán gégerák carcinoma sejtvonalként lett regisztrálva, de később genetikai vizsgálatok igazolták kontamináló HeLa sejtek túlnövekedését. Mindez nem változtat azon, hogy tumorsejtekről van szó, amelyek a tárgylemezre történő letapadás miatt ellaposodó, nagyméretű sejtmaggal és nagy mitótikus rátával rendelkeznek. A nagy mag és a sejtciklus-függő antigének expressziója miatt IIF szubsztrátként több, mint száz autoantitest kimutatását teszi lehetővé [22]. Ennek köszönhető, hogy 2009-ben az Amerikai Reumatológus Kollégium ANA szűrésre ezt a vizsgálatot ajánlotta, szemben az addigra egyre inkább elterjedő ELISA elvű ANA screen tesztekkel, melyek – miután sokszor csak az ismert antigéneket tartalmazták – álnegatív eredményt adhatnak [21]. Hátránya viszont a HEp-2 alapú vizsgálatnak,

hogy bizonyos autoantigének nem fejeződnek ki elegendő mennyiségben ahhoz, hogy az antitest látható fluoreszcens jelet adjon, vagy a konformációja nem megfelelő az autoantitest bekötődéséhez, esetleg a szerkezete a fixálószer vagy oldószer hatására megváltozik, így egyes ellenanyagok kimutatására egyáltalán nem (pl. anti-Ro52) vagy korlátozottan (pl. anti-Ro60, anti-Jo-1) alkalmas. Ennek orvoslására megjelentek genetikailag módosított HEp-2 sejtvonalak, melyekben egyes antigének (például az ImmunoConcepts cég HEp-2000 termékében a Ro60) fokozottan fejeződnek ki [92]. A mintázatfelismerésben a sejtciklus különböző fázisában lévő sejtek nagy segítséget jelentenek, az Euroimmun ezért fejlesztette ki a tenyésztési körülmények megváltoztatásával a HEp-20-10 sejtvonalat, aminél az osztódó sejtek aránya jelentősen magasabb az eredeti változathoz képest [93].

3.7.3.2 Standardizáció, harmonizáció

Antinukleáris antitestek vonatkozásában valódi standardizációt nem lehet végezni, mert ahhoz pontosan definiálni kellene az analitot. Autoantitesteknél ez nem lehetséges, hiszen egy antigénezen számos epitóp helyezkedik el, illetve az ellenanyag sem teljesen egységes szerkezetű. Ilyenkor a harmonizáció a megoldás, ami azt jelenti, hogy az eredmények variabilitását okozó tényezők megismerése után a végző laboratóriumok megegyeznek, hogy a meghatározást milyen módon végzik [94-96].

A HEp-2 IIFT teszt esetén az egyik fontos lépés a felismerhető mintázatok karakterizálása, elnevezése volt. Ez a folyamat már a 2000-es években elkezdődött, a ma elfogadott ICAP (International Consensus on HEp-2 ANA patterns) nevezéktant 2014-2015-ben dolgozták ki, majd hozták nyilvánosságra a www.anapatterns.org oldalon (5. ábra) [97, 98].



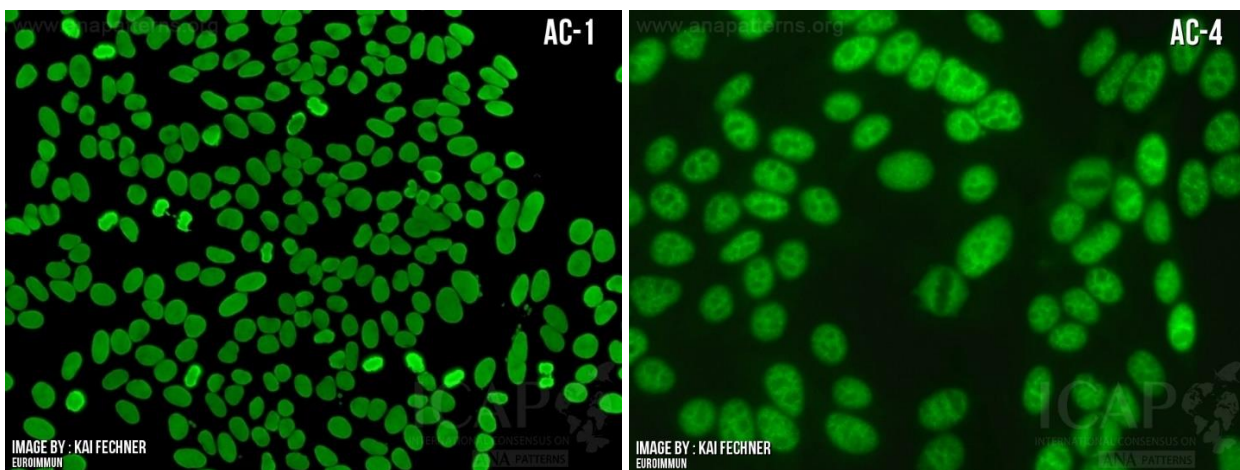
5. ábra Az ICAP (International Consensus on HEp-2 ANA patterns) nevezéktan hierarchikus ágrajza a www.anapatterns.org oldalon.

A honlap a mintázatok leírásán, képein kívül az antigén- és betegségasszociációkat is bemutatja több nyelven. A magyar változatot a hazai immunológia centrumok képviselői állították össze, ezzel is segítve az ANA diagnosztika harmonizációját (3. táblázat) [99]. Az ICAP nomenklatura rendszeres aktualizálását nemzetközi munkacsoport végzi [100, 101].

Csoport	Mintázat	Autoantigén	Betegség
nukleáris	homogén nukleáris	dsDNS, nukleoszóma, hiszton	SLE, gyógyszerindukált lupus, JIA, AIH
	Scl-70-szerű	Scl-70	SSc
	szemcsés nukleáris	SS-A, SS-B, snRNP, Sm, hnRNP, RNS polimeráz II és III, SAE1, NXP2, TIF1 γ , TIF1 β , Ku, Ki, Mi-2	SjS, SLE, RA, MCTD, SSc, DM
	sűrű finomszemcsés nukleáris	DFS70	egészséges egyének, nem szisztémás AID
	centromer	CENP-B és A	SSc limitált forma, PBC, SjS
	több nukleáris pont	Sp-100, PML, NDP53	PBC
	kevés nukleáris pont	p80-coilin	PBC, AIH, CTD
	nukleoláris	PM-Scl, Th, To, U3-RNP, RNS polimeráz I, Gu	SSc, SSC-AIM overlap, SjS, CTD, tumor
	folytonos magmembrán	lamin	autoimmun cytopenia, AILD, APS, CTD
	pontozott magmembrán pleomorf, PCNA-szerű	gp-210, nucleoporin 62 proliferating cell nuclear antigen	PBC, AILD, CTD SLE
pleomorf, CENP-F-szerű	CENP-F	tumor, Crohn-betegség, SjS, AILD	
citoplazmatikus	citoszkeletális	citoszkeleton fehérjék	AIH, alkoholos májbetegség, RA, CTD, fertőzések és gyulladásos állapotok, myasthenia, IBD
	szemcsés	Jo-1, PL-7, PL-12, SRP, riboszómális P proteinek	AIM, ILD, SLE
	pettyezett	GW182, Su/Ago2, endoszoma antigének	CTD és más betegségek
	mitokondrium-szerű	mitokondrium fehérjék	PBC, CTD
	Golgi-szerű	giantin/macrogolgin, golgin	különböző betegségek
	pálcikák és gyűrűk	inozin-5'-monofoszfát dehidrogenáz	interferon+ribavirin kezelés
mitótikus	centroszóma	centriolum fehérjék	Raynaud-jelenség, SSc, SLE, RA
	osztódási orsó	HsEg5	nem egyértelmű
	NuMA-szerű	NuMA	SjS, SLE, RA, CTD
	midbody	többféle	nem egyértelmű
	mitótikus kromoszóma burok	DCA, MCA1, and MCA5	nem egyértelmű

3. táblázat HEp-2 sejteken elkülöníthető nukleáris, citoplazmatikus és mitótikus mintázatok, illetve a velük asszociált autoantitestek és betegségek. AIM: autoimmun myositis, AIH: autoimmun hepatitis, AILD: autoimmun májbetegség, APS: antifoszfolipid szindróma, CENP: centromer protein, CTD: kötőszöveti betegség, DFS: dense fine speckled, DM: dermatomyositis, IBD: gyulladásos bélbetegség, ILD: intersticiális tüdőbetegség, JIA: juvenilis idiopathiás arthritis, MCTD: kevert kötőszöveti betegség, NuMA: nukleáris mitótikus apparátus, PBC: primer biliáris cholangitis, PM:

polymyositis, PML: promyelocytás leukémia fehérje, RA: rheumatoid arthritis, RNP: ribonukleoprotein, SjS: Sjögren-szindróma, SLE: szisztémás lupus erythematosus, SSc: szisztémás sclerosis



6. ábra A homogén nukleáris (AC-1) és a finomszemcsés nukleáris (AC-4) mintázatról készült képek a www.anapatterns.org oldalon.

A harmonizáció másik fontos lépése az antinukleáris antitest vizsgálatot végző laboratóriumok gyakorlatának megismerése, majd a követendő eljáráshoz nemzetközi ajánlások összeállítása volt [102-105].

3.7.3.3 Automatizáció, számítógéppel támogatott eljárások

Mivel a HEp-2 IIF lemezek leolvasása időigényes, a nagy forgalmú laboratóriumokban kezdettől igény volt az automatizációra. A nemzetközi ajánlások pedig meggyőzték a reagensgyártókat, hogy a HEp-2 IIFT nem fog kiszorulni a piacról az ELISA és lumineszcens elvű szűrőtesztek terjedése ellenére. Néhány ANA IIFT mintázatfelismerésre alkalmas mikroszkópos rendszert és az általuk automatizáltan felismert HEp-2 mintázatokat a 4. táblázat mutatja be [106, 107]. A számítógépes eljárások bevezetése a szubjektív küküszöbölésével az értékelés harmonizációját is magával hozhatja [108].

Mintázat	Aklides*	Euro Pattern**	EuroPattern Live	Helios	Nova View*	Zenit G-Sight	Zenit Pro
homogén nukleáris	x	x	x	x	x	x	x
szemcsés nukleáris	x	x	x	x	x	x	x
finomszemcsés nukleáris							x
durva szemcsés nukleáris							x
sűrű finomszemcsés			x				
nukleoláris	x	x	x	x	x	x	x
centromer	x	x	x	x	x	x	x
nukleáris pontok	x	x	x	x	x		x
néhány nukleáris pont							x
több nukleáris pont							x
mitótikus	x	x					
magmembrán		x	x	x			
citoplazmatikus	x	x	x	x		x	x
mitokondrium-szerű			x				x
riboszóma-szerű							x
összesen	7	8	9	7	5	5	9

4. táblázat Antinukleáris antitest mintázatfelismerésre alkalmas számítógép-segített fluoreszcens mikroszkópos rendszerek és a felismert HEp-2 mintázatok típusai. *: 4',6-diamidino-2-fenil-indol – DAPI magfestés, **: propidium-jodid magfestés

3.7.3.4 Összetett, többszörös és kevert ANA mintázatok

A mintázatfelismerést nehezíti, hogy egyszerre lehetnek jelen olyan autoantitestek, amelyek mind kimutathatók a HEp-2 IIF teszttel. Több ANA-mintázat helyes azonosítása nemcsak a számítógép-segített rendszerek számára, de a hagyományos értékelést végző szakértőknek is kihívást jelent. Egnél több mintázat egyidejű előfordulása esetén érdemes megkülönböztetni a többszörös és a kevert mintázatokat. Többszörös mintázat (multiple patterns) esetén két vagy több, de egyértelműen megkülönböztethető mintázatot figyelhetünk meg egy szérummintában [pl. homogén magmintázat (AC-1) + citoplazmatikus pálcikák és gyűrűk (AC-23) vagy finomszemcsés magmintázat (AC-4) + citoplazmatikus Golgi-szerű (AC-22)]. A kevert mintázatok (mixed patterns) megkülönböztetése még nagyobb nehézséget jelent, mivel itt legalább két olyan mintázatot okozó autoantitest található a páciens mintájában, amelyeknél a fluoreszcens jel elhelyezkedésében átfedést mutat, emiatt nem lehetséges egyértelműen azonosítani az egyes komponenseket. A megfigyelt kép nagymértékben függ az egyes autoantitestek koncentrációjától és affinitásától, a domináns antitest képe részben vagy teljesen elfedheti a másikat. Fontos továbbá megkülönböztetni a többszörös/kevert mintázatokat az összetett mintázatoktól [pl. Scl-70-szerű

(AC-29) vagy PCNA-szerű (AC-13)], ahol többféle sejtalkotó a különböző sejtciklusokban eltérő fluoreszcens festődést mutat, de mindezt egyetlen autoantitest okozza [109].

4. Célkitűzés

Vizsgálataink célja az volt, hogy az indirekt immunfluoreszcens elvű autoantitest diagnosztika területén megjelent új, automatizált, számítógéppel támogatott értékelési módokat kipróbáljuk, elemezzük és összehasonlítsuk az elfogadott, jelenleg használt eljárásokkal. A kipróbálást, összehasonlítást az antinukleáris (ANA) és anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) diagnosztikájában EUROPattern automatizált fluoreszcens mikroszkópos rendszerrel végeztük.

I. Az ANCA IIFT hagyományos, számítógépes képelemzéssel, illetve képernyőn végzett értékelésének összehasonlítása során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen a mintázat minősítésének és erősségének reprodukálhatósága? Különbözik-e az ismételhetőség a háromféle értékeléssel?
2. A mérési tartományon belül lineáris-e az egyetlen reakciómező fluoreszcenciaintenzitása alapján becsült végponti titer? Használható-e a sorozathígításon alapuló hagyományos titrálás helyett?
3. Mekkora az egyezés a minták minősítését és osztályozását illetően az EPa képelemző algoritmus, illetve a képernyőn leolvasott eredmények és a hagyományos mikroszkópos értékelés között? Kiadhatók-e az automatizált értékelés eredményei felhasználói ellenőrzés nélkül? Mik a nem egyező minősítés és osztályozás okai?
4. A mintában jelen lévő zavaró antinukleáris vagy anti-citoplazmatikus antitesteknek van-e hatása az ANCA kiértékelésre?

II. Az ANA mintázatok közötti zavaró hatás vizsgálata, a számítógéppel támogatott kiértékelési módok összehasonlítása kapcsán a következőket kívántuk tisztázni:

1. Milyen a Laboratóriumi Medicina Intézetbe HEp-2 IIF vizsgálatra küldött minták körében az egyszerre egynél több ANA mintázatra pozitív minták aránya? Mely mintázatok fordulnak elő leggyakrabban együtt?
2. Kevert mintázatok esetén fellép-e az egyes komponsek között zavaró hatás? Milyen jelentős az interferencia? Milyen titernél alakul ki? El tudja-e teljesen fedni egyik mintázat a másikat?
3. Van-e különbség a vizsgált mintázat felismerésében zavaró mintázat jelenlétében az automatizált képelemzéses, a képernyőn végzett és a konvencionális mikroszkópos értékelési módok között?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A rutin ANCA és ANA vizsgálatok eredményeinek összegyűjtése és elemzése

Az ANCA és az ANA HEp-2 IIF vizsgálat eredményeit a GLIMS (General Laboratory Information Management System v8.0, CliniSys, Belgium) laboratóriumi információs rendszerben tároljuk.

5.1.1. Az egy vagy több ANA mintázattal rendelkező minták gyakoriságának meghatározása

Lekérdeztük az összes ANA HEp-2 eredményt a 2019. március 1. és december 31. közötti időszakból egy Excel-fájlba. Rögzítettük a pozitív/negatív státust, a mintázatokat és a titer értékeiket, egy mintában legfeljebb 3 nukleáris, 1 citoplazmatikus és 1 mitotikus mintázatot tüntettünk fel. Az egyedülálló és kevert mintázatok gyakoriságát kiszámoltuk.

5.2. Betegek és minták

5.2.1. Az ANCA IIFT összehasonlító vizsgálatához felhasznált minták

575 szérummintát elemeztünk, amit a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetébe egy három hónapos időszakban rutin ANCA vizsgálatra küldtek az észak-alföldi régió immunológia, reumatológia, nefrológia, gasztroenterológia, hepatológia, pulmonológia, fül-orr-gégészet, bőrgyógyászat fekvőbeteg osztályainak vagy járóbeteg szakrendeléseinek orvosai. Az 575 minta 570 személytől származott, 5 betegtől két minta érkezett. A laboratóriumi kivizsgálás főbb indikációja akut és krónikus veseelégtelenség, fekélyes vastagbélgyulladás (colitis ulcerosa), Crohn-betegség, szisztémás autoimmun betegségek, vasculitis és autoimmun májbetegségek gyanúja vagy nyomon követése volt.

5.2.2. A kevert antinukleáris mintázatok vizsgálatához felhasznált minták

A rutin ANA vizsgálatra küldött szérumminták közül az alapján válogattunk, hogy milyen IIFT festési mintázatot mutattak HEp-2 sejteken (Euroimmun, Lübeck, Németország). Az 1:80 kezdeti hígításban pozitívnak talált szérumokat további 1:320, 1:1280, 1:5210 hígításokban vizsgáltuk, és EuroStar II Plus fluoreszcens mikroszkóp (Euroimmun) segítségével hagyományos módon határoztuk meg a végponti titeret. Olyan mintákat kerestünk, melyek vagy csak homogén nukleáris (AC-1) vagy csak finomszemcsés nukleáris (AC-4) mintázatot mutattak 1:5120 titerben. A mintákban lévő autoantitestek antigénspecifitását SS-A/Ro60, SS-B/La, RNP, Sm, Scl-70, Jo-1 (Euroimmun), dsDNS, nukleoszóma, hiszton elleni antitest ELISA tesztekkel (Orgentec

Diagnostika, Mainz, Németország), valamint Scl-70, CENP-A, CENP-B, RNS polimeráz III (11 és 155 kDa), fibrillarín, NOR-90, Th/To, PM/Scl-100, PM/Scl-75, Ku, PDGFR, Ro52 elleni antitestek kimutatására alkalmas scleroderma immunblot (Euroimmun) tesztcsíkokkal is azonosítottuk. Azokat a szérumokat választottuk ki, melyek homogén magmintázat esetén kizárólag anti-dsDNS, anti-nukleoszóma vagy anti-hisztón, finomszemcsés magmintázat esetén pedig csak anti-SS-A és/vagy anti-SS-B ellenanyagokat tartalmaztak. A továbbiakban 3 homogén nukleáris (AC-1) és 3 finomszemcsés nukleáris (AC-4) pozitív mintát használtunk a keveréses vizsgálatokhoz.

5.2.2.1 A kevert ANA mintázatok előállítása

A vagy homogén vagy szemcsés magmintázatú, 1:5120 végponti titerű szérummintákból először 40-szeres majd további három tovafutó négyszeres (4x, 16x, 64x) hígítást készítettük hígító pufferrel. Ezen előhígítások számított végponti titerértékei 1:10240, 1:2560, 1:640, 1:160 voltak az eredeti titer (1:5120) és a hígulási faktor alapján. A homogén és a finomszemcsés mintából készült 4–4 ilyen előhígítást 1:1 arányban (25 µL + 25 µL) kevertük össze egymással az összes lehetséges kombinációban. Ezenkívül a 4–4 előhígítást azonos mennyiségű pufferrel is meghígítottuk, hogy csak az egyik mintázatra pozitív mintákat is vizsgálhassuk. Így összesen 16 kevert mintázattal és 4–4 izolált mintázattal rendelkező mintát vittünk fel a HEp-2 lemezekre minden futtatásnál. A felvitt mintákban így a két mintázat elvárt végponti titere 1:5120, 1:1280, 1:320, 1:80 vagy nulla volt. A 3 homogén és 3 finomszemcsés mintából 8 homogén-szemcsés mintapárt választottunk ki, és minden mintapárnál elkészítettük az előbb leírt hígításokat és keveréseket. Így minden homogén/szemcsés ANA mintázat arány esetén az adatpontok minimális száma 8 volt. Azokban az esetekben, ahol a megfigyelt és várható fluoreszcencia intenzitás/titer közötti különbség közel szignifikáns volt, megismételtük az előhígítási és keverési eljárást ugyanazokkal a mintapárokkal, maximum 16 alkalommal. Így egy homogén/szemcsés mintázatarány esetén a mérési pontok maximális száma n=24 volt.

5.3. Az indirekt immunfluoreszcens vizsgálatok kivitelezése

Az Euroimmun Granulocyte Mosaic 13 (katalógusszám: FC 1201-1010-13) és ANA HEp-20-10 EPa (katalógusszám: FC 1522-1010) reagenskészleteit használtuk. A kivitelezés manuálisan, szigorúan a gyártó által megadott protokoll szerint történt.

5.3.1. Az ANCA IIFT kivitelezése

Az ANCA lemezen egy reakciómezőben három 2 x 2 mm-es „biochip” (szubsztráttal fedett vékony üveglemezdarabka) volt található. A háromféle biochipen etanollal vagy formalinnal fixált neutrofil granulociták, illetve HEp-2 sejtrétegre rászórt granulociták szolgálták szubsztrátként az autoantitestek megkötésére. A másodlagos ellenanyag humán IgG elleni kecske antitest volt, fluoreszcein-izotiocianáttal megjelölve. A szűrő mintahígítás mértéke 1:10 volt.

5.3.2. Az ANA IIFT kivitelezése

Az ANA lemezek szubsztrátként megfelelően fixált HEp-2 sejtréteget alkalmaztunk. A 5.2.2.1 bekezdésben leírt módon elkészített mintákból 30 µL-t vittünk fel egy mezőre véletlenszerű sorrendben, melyet a leolvasó nem ismert. A másodlagos humán IgG elleni kecske antitest fluoreszcein-izotiocianáttal volt megjelölve, emellett a konjugátum oldat a sejtmagok piros háttérfestését biztosító propidium-jodidot is tartalmazott.

5.4. A fluoreszcens lemezek kiértékelése, a mintázatlanleolvasás módjai

A lemezeket EUROPattern automatizált fluoreszcens mikroszkóp és szoftvercsomag (Euroimmun, 3.7.289.14128 változat) segítségével értékeltük ki, a beépített kamera 20×-os objektívvel készített digitális képeket, melyeket png és jpeg formátumban tárolt. A pozitív és negatív minták elkülönítését, illetve a mintázatok felismerését a beépített automatikus képanalízis is elvégezte a gyártó által kifejlesztett osztályozó algoritmusok segítségével. Ezt követően a gépi eredményeket és a digitális képeket egy kalibrált számítógépes képernyőn a felhasználó értékelte, validálta. Végül a lemezeket hagyományos vizuális leolvasással értékeltük epifluoreszcens mikroszkóp alatt (EUROStar II Plus, Euroimmun).

5.4.1. Az ANCA lemezek értékelése

Az ANCA mintázatok hagyományos és képernyőn végzett leolvasását az etanollal és formalinnal fixált neutrofil granulocita- és a HEp-2 sejtrétegen látható mintázatok alapján az 5. táblázat alapján végeztük.

Mintázat	Etanollal fixált neutrofil granulocita	Formalinnal fixált neutrofil granulocita	HEp-2 sejtréteg
C-ANCA	diffúz citoplazmatikus	diffúz citoplazmatikus	negatív
P-ANCA	perinukleáris citoplazmatikus,	diffúz citoplazmatikus	negatív
atípusos P-ANCA	perinukleáris citoplazmatikus	negatív	negatív
atípusos C-ANCA	diffúz citoplazmatikus	negatív	negatív
sejtmag	magmintázat	negatív	magmintázat
citoplazmatikus	citoplazmatikus mintázat	negatív	citoplazmatikus mintázat

5. táblázat Az anti-neutrofil citoplazmatikus (ANCA) indirekt immunfluoreszcens teszt értékelése hagyományos mikroszkópos és képernyőn végzett leolvasással: ANCA és zavaró sejtmag, illetve citoplazmatikus mintázatok.

Az EPa automatizált képanalízis a mintákat 'nem értékelhető', 'negatív', 'C-ANCA', 'P-ANCA' vagy 'atípusos ANCA' kategóriákba sorolta. A 'nem értékelhető' kategóriába általában technikai probléma miatt kerültek a minták. Az automatizált értékelés sikertelenségének (7/575 tesztelt mintából) oka buborék jelenléte, alacsony sejtsűrűség vagy homályos kép volt. Ezeket az eseteket kizártuk az elemzésből, így az összehasonlításban szereplő minták száma 568 volt.

Az automatizált elemzéssel elérhető kategóriáknak való megfeleltethetőség érdekében a képernyőn történő és a hagyományos leolvasás 'atípusos C-ANCA' és 'atípusos P-ANCA' eredményeit összevontuk egy 'atípusos ANCA' kategóriába. A HEp-2 sejteken és az etanollal rögzített granulocita sejtrétegen látható fluoreszcencia mintázatok együttes értékelése alapján az általános, nem neutrofil granulocitára specifikus nukleáris vagy citoplazmatikus sejt-komponensekhez kötődő antitestekkel rendelkező mintákat pedig külön 'ANA/ACyA interferencia' csoportba soroltuk, mivel ezek az antitestek bizonytalanná vagy lehetetlenné teszik az ANCA mintázat értékelését.

Ebben a tanulmányban antinukleáris antitest (ANA) elnevezéssel kizárólag a sejtmag összetevői elleni antitestekre utaltunk, míg a citoplazmában található antigének elleni antitestekre az anti-citoplazmatikus antitest (ACyA) megnevezést használtuk. Tisztában vagyunk azzal, hogy az ANA mintázatok nemzetközileg elfogadott nevezéktana (ICAP) szerint az ANA kifejezés minden antitestet magában foglal, ami a HEp-2 sejtek nukleáris, citoplazmatikus és mitotikus antigénjeihez kapcsolódni tud, de mi meg akartuk különböztetni a sejtmag és a citoplazma elleni antitesteket, mivel ezek feltehetően különböző mértékű zavaró hatást gyakorolhatnak az ANCA mintázatok felismerésére. Amikor az etanollal fixált granulocita biochip pozitív volt és ANA vagy ACyA

mintázat volt a HEp-2 sejtrétegen, akkor a mintát 'ANA/ACyA interferencia' kategóriába soroltuk. Ha az etanollal rögzített granulocita biochip negatív volt, a mintát negatívnak soroltuk be függetlenül az ANA vagy ACyA jelenlététől.

Összeségében a mintákat 5 kategóriába osztottuk be: 'negatív', 'P-ANCA', 'C-ANCA', 'atípusos ANCA' és 'ANA/ACyA interferencia'. A 'P-ANCA', 'C-ANCA', 'atípusos ANCA' és 'ANA/ACyA interferencia' kategóriákra együtt "nemnegatív"-ként, míg a 'P-ANCA', 'C-ANCA' és 'atípusos ANCA' eredményekre pozitívként utaltunk. Mind az öt kategóriát a hagyományos és a képernyőn történő értékelésnél használtuk, míg az EPa automatizált osztályozása nem tudta felismerni az ANA/ACyA interferenciát, és ezeket a mintákat - hibásan - a pozitív ANCA alcsoportokba sorolta ('P-ANCA', 'C-ANCA', 'atípusos ANCA'). A hagyományos és a képernyőn történő leolvasást – a rutin értékelés során alkalmazott módon – egy megfigyelő végezte.

A kategória megadása mellett az EPa klasszifikációs algoritmus a konfidencia értéket is közöl, amely kifejezi a besorolás megbízhatóságát százalékban kifejezve. Ezenkívül a szoftver a szűrőhígításban látható fluoreszcencia intenzitásából a végponti ANCA titerre is becslést ad (1:10, 1:32, 1:100 vagy 1:320). Az EPa a 1:10-es titerű mintákat 'határértékű' eredményként jelöli, de mi ezeket a pozitív esetekkel (titer > 1:10) együtt vizsgáltuk és elemeztük.

5.4.2. Az ANA lemezek értékelése

A EUROPattern automatizált mintázatfelismerő rendszer az osztályozás során az alábbi kategóriákba sorolja be a mintákat: pozitív, negatív, határértékű és nem értékelhető ('?'). Továbbá azonosítani tud nyolcféle ANA mintázat/mintázats csoportot: nukleáris homogén (AC-1), nukleáris szemcsés (AC-4,5), centromer (AC-3), nukleáris pontok (AC-6,7), nukleoláris (AC-8,9,10), magmembrán (AC-11,12), osztódási orsó (AC-25) és citoplazmatikus (AC-15 - AC-23). Ezenkívül a szoftver minden mintázat végponti titer értékét is megbecsüli a szűrőhígítás fluoreszcencia intenzitása alapján.

A képernyőn történő és a hagyományos leolvasás során az értékelők az ANA mintázatokat azonosították, majd a mintázat fluoreszcencia intenzitását (FI) becsülték a negatív (0)/1+/2+/3+/4+ szemikvantitatív skálán. Két független szakértő értékelte az összes képet/lemezt, egyet nem értés esetén közösen ellenőrizték és konszenzuson alapuló döntést hoztak.

A minták kategorizálásához, a mintázatok besorolásához használt algoritmus, az osztályozási megbízhatóság és a végponti titer becslésének paramétereit és küszöbértékeit a gyártó mérnökei alapértelmezett értékekre állították a műszer telepítése során.

5.5. Az ANCA mintázatok felismerésének és erősségének reprodukálhatósági vizsgálata

Három alacsony vagy közepesen pozitív C-ANCA, P-ANCA és atípusos ANCA mintázatú mintát ötször-ötször teszteltük három külön napon. Összevetettük a felismert mintázatot és a fluoreszcencia intenzitás/becsült végponti titer értékeit mindhárom kiértékelési módszer esetén.

5.6. A becsült végponti titer linearitásának vizsgálata ANCA meghatározás esetén

A teszt linearitása egy adott tartományon belül azt jelenti, hogy a méréssel kapott eredmények egyenesen arányosak az analit szintjével [110, 111]. Két C-ANCA-mintával, két P-ANCA-mintával és egy atípusos ANCA mintával dolgoztunk, kétszeres hígítási sort készítettünk, majd meghatároztuk a végponti titer konvencionális mikroszkópos értékeléssel. Ezután minden hígítást kiértékelünk az EPa segítségével, az így kapott becsült titer az elvárt titer értékkel hasonlítottuk össze, amit a végponti titerből és a hígítási tényezőtől számítottunk.

5.7. A számított titer és a hagyományos módon meghatározott végponti titer korrelációjának vizsgálata ANCA teszt esetén

Az ANCA végponti titer értékeket 32 mintában (11 C-ANCA, 15 P-ANCA, 6 atípusos ANCA) hagyományos módszerrel határoztuk meg (1:10 és 1:1280 közötti kétszeres tova futó sorozathígítás). Az 1:10-es szűrőhígításból készült kép alapján az EPa becsült végponti titer eredményeket hasonlítottuk a hagyományos végponti titerekkel és Spearman-féle rangkorrelációt végeztünk.

5.8. Az ANCA lemezek kiértékelési idejének számítása

Mindhárom kiértékelési módszer esetén megmértük az egy futtatás összes lemezének leolvasásához szükséges időt, majd elosztottuk a minták számával. Négy futtatásból átlagot és szórást számítottunk.

5.9. A myeloperoxidáz és proteináz 3 elleni antitestek meghatározása ELISA vizsgálattal

Az anti-MPO/PR3 ellenanyagokat az Orgentec ELISA reagensei (katalógusszám: ORG 219 és ORG 318) segítségével határoztuk meg Alegria analizátoron. A referenciatartomány anti-MPO esetén < 5 U/mL, anti-PR3 esetén pedig < 10 U/mL volt.

5.10.A statisztikai elemzés módszerei

Az összes eredmény, valamint külön a pozitív/negatív minták egyezőségét, és a Cohen-kappa együtthatókat kiszámoltuk. A különböző leolvasási módokkal kapott mintázaterősség/titer értékek összefüggését Spearman-féle rangkorrelációs analízissel vizsgáltuk.

A kevert antinukleáris mintázatok vizsgálata során a második mintázat zavaró hatását úgy vizsgáltuk, hogy kiszámoltuk azoknak a mintáknak az arányát, amelyekben a vizsgált mintázat helyesen azonosításra került (egyezési arány % \pm 95% CI). Ezt az elemzést külön is elvégeztük azokon a mintákon, ahol csak egyetlen mintázat volt jelen (csak homogén: $n = 32$, csak szemcsés: $n = 44$), és azokban, ahol a homogén mintázat elvárt titer értéke magasabb ($n = 75$) vagy alacsonyabb volt ($n = 96$) volt a szemcsés mintázat titerénél, illetve megegyezett ($n = 61$) azzal.

Ezenkívül értékeltük a vizsgált minta megfigyelt és várt titerének korrelációját a második, zavaró minta titerének függvényében (Spearman-féle r rangkorrelációs együttható \pm 95% CI).

Végül a második mintázat okozta interferenciát (alul/felülmérés, maszkolás) részletesen elemeztük a fluoreszcencia intenzitások mediánjainak összehasonlításával (Kruskal–Wallis, majd Mann–Whitney tesztek).

A statisztikai elemzésekhez, illetve az ábrák készítéséhez a GraphPad Prism és Microsoft Excel szoftvert használtuk. A statisztikai teszteknel a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1. Az ANCA vizsgálatok eredményei

6.1.1. A mintázat felismerésének és erősségének reprodukálhatósága

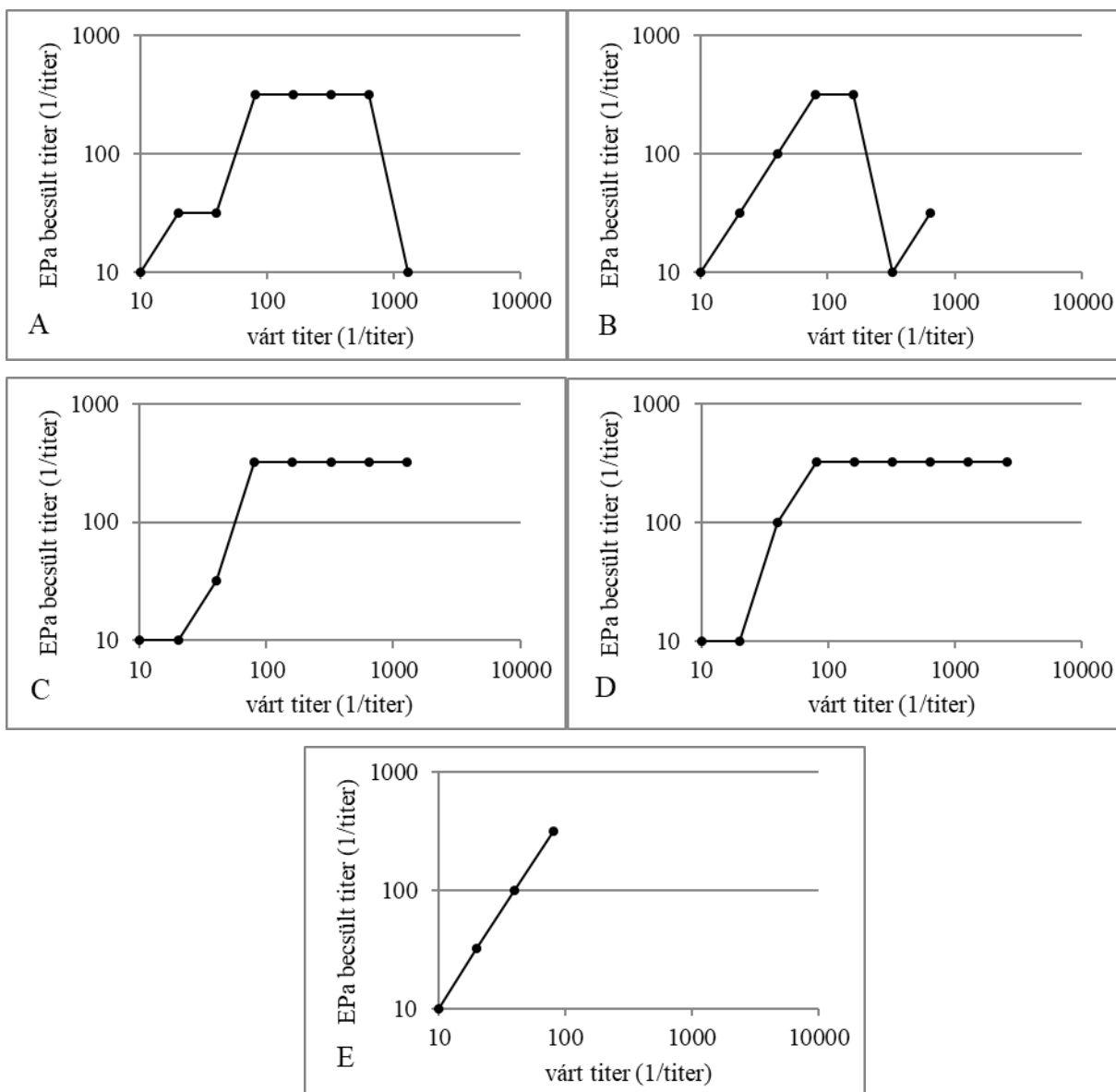
Három alacsony vagy közepesen pozitív C-ANCA, P-ANCA és atípusos ANCA mintát teszteltünk ötször három különböző napon. Hagyományos és képernyőn történő leolvasással mindhárom mintában minden ismétléssel az elvárt mintázatot kaptuk. Az automatizált képanalízissel mind a 15 mérés ugyanazt a mintázatot adta a P-ANCA pozitív mintával, a C-ANCA pozitív mintával a várt eredményt kaptuk 14 alkalommal (egyszer 'nem értékelhető' volt), az atípusos mintával pedig 13 alkalommal (egy-egy alkalommal "negatív", illetve "P-ANCA" volt).

A becsült végponti titerek jó reprodukálhatóságot mutattak, az összes eredmény a medián \pm egy hígítási lépés tartományban volt mindhárom mintázat esetében (az adatokat nem mutatjuk). A fluoreszcenciaintenzitás reprodukálhatósága is elfogadható volt. A képernyőn történő értékelés során a C-ANCA és a P-ANCA pozitív minta esetén 15-ször 2+, az atípusos ANCA minta esetén 10-szer 1+, 5-ször 2+ erősséget olvastunk le. A hagyományos értékelés során a C-ANCA pozitív minta 3-szor +/-, 8-szor 1+, 4-szer 2+, a P-ANCA pozitív minta 11-szer 1+, 4-szer 2+, az atípusos ANCA minta 15-ször 1+ intenzitás értéket kapott.

A 15 ismétlés alatt az EPa algoritmus által megadott konfidencia értékek átlagai 84,7%, 80,2%, 86,0%, míg a variációs együtthatók 5,25%, 4,35%, 5,85% voltak a C-ANCA, P-ANCA, illetve az atípusos ANCA pozitív minta esetében. A konfidencia érték nem volt alacsonyabb, amikor az algoritmus a mintát rosszul osztályozta, tehát úgy tűnik, hogy nem segíti a hibás besorolás felismerését (az adatokat nem mutatjuk).

6.1.2. A becsült titer dinamikus tartományának és linearitásának vizsgálata

Az erős pozitív minták sorozathígításával közel lineáris választ kaptunk az 1:10-1:80 tartományban, de a görbék ellaposodtak, amikor a titerbecslés elérte az 1:320 értéket (7. ábra). Érdekes, hogy mindkét C-ANCA pozitív mintánál jelentős alámérést lehetett látni magas antitest-koncentrációknál (high dose hook effect).

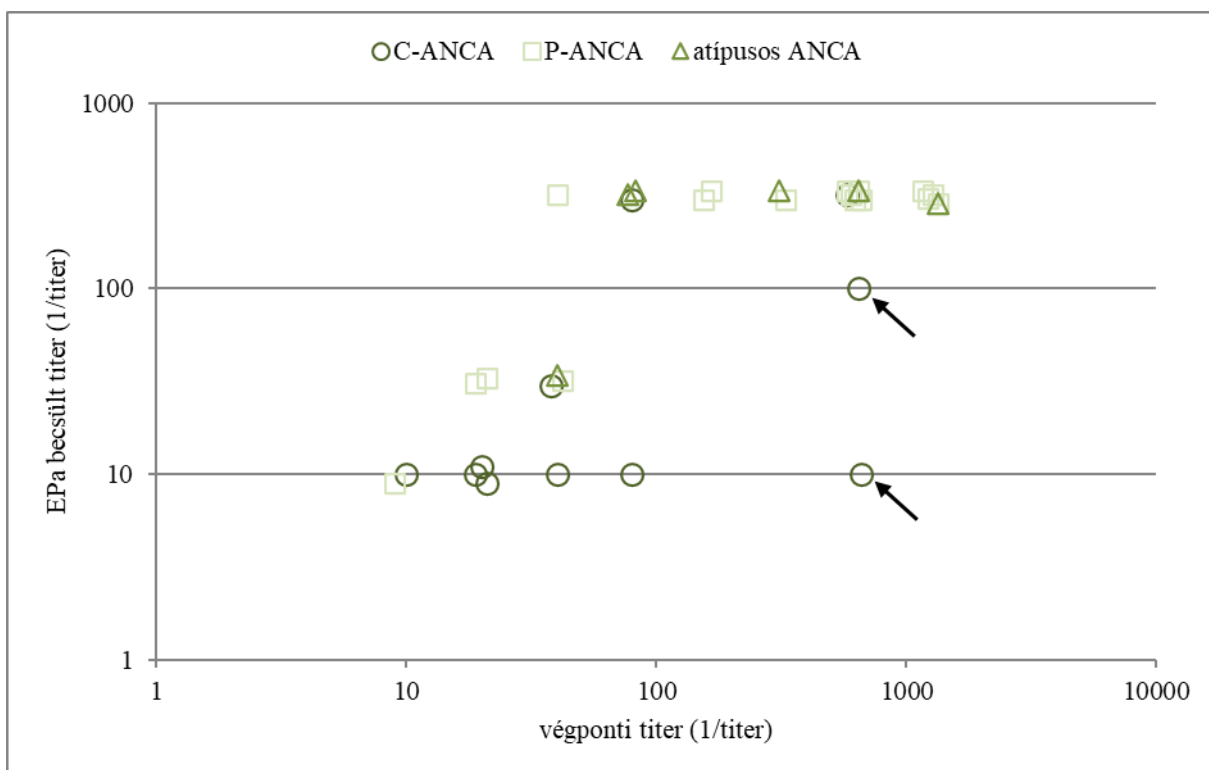


7. ábra A digitális kép fluoreszcencia intenzitásából a EUROPattern (EPa) képanalízis által becsült titer érték a konvencionális értékeléssel kapott végponti titerből és a hígítási tényezőtől számolt várt titer függvényében. Két C-ANCA (A és B), két P-ANCA (C és D) és egy atípusos ANCA (E) pozitív minta kétszeres tovafutó hígítását készítettük el a szűrési hígításból (1:10) elindulva. Az EPa által becsült ANCA titer 1:10, 1:32, 1:100 vagy 1:320 értéket vett fel.

6.1.3. Az EPa becsült titer és a hagyományos végponti titer korrelációjának vizsgálata

32 mintánál (11 C-ANCA, 15 P-ANCA, 6 atípusos ANCA) az 1:10-es szűrőhígításból készült kép alapján az EPa által becsült végponti titer eredményét hasonlítottuk össze a hagyományos módon titrálással meghatározott értékkel (8. ábra). Az összes mintát együtt vizsgálva a Spearman-féle r együttható 0,70 volt ($p < 0,001$). Erősebb korrelációt lehetett megfigyelni a P-ANCA ($r = 0,74$, $p = < 0,001$) pozitív minták esetén. Az atípusos és diffúz citoplazmatikus ANCA pozitív szérumoknál

az összefüggés nem volt szignifikáns, de az együttható mérsékelt korrelációt mutatott ($r = 0,66$, $p = 0,33$, illetve $r = 0,58$, $p = 0,06$).



8. ábra A digitális kép fluoreszcencia intenzitásából a EUROPattern (EPa) képanalízis által becsült titer érték a konvencionális értékeléssel kapott végponti titer függvényében. Az EPa által becsült ANCA titer 1:10, 1:32, 1:100 vagy 1:320 értéket vett fel. Az adatpontok értékeit kis mértékben véletlenszerűen módosítottuk a jobb láthatóság kedvéért. A nyilak két C-ANCA mintát mutatnak, amelyeknél nagydózisú hook effektus jött létre.

6.1.4. A negatív és nemnegatív minták elkülönítése

Mivel az ANCA vizsgálatra küldött minták többsége negatív (a mi tanulmányunkban a szérumok 70,6%-a), először azt vizsgáltuk, hogy a negativitás megítélése mennyire pontos a különböző értékelési módokkal.

Összesen 568 minta adatait elemeztük ki. A konvencionális leolvasás alapján negatívnak minősített 401 mintából 328-at (81,8%) negatívnak minősített az automatizált képértékelés is (6. táblázat). Az álpozitív minták száma 73 volt, ebből 6, 19, illetve 48 mintát osztályozott az algoritmus P-ANCA, C-ANCA, illetve atípusos ANCA-nak. Az összes ilyen minta gyenge/határérték pozitivitást mutatott az EPa rendszerrel [becsült titer 1:10 (69 minta) és 1:32 (4 minta)]. A negatív eredmények egyezése 95,3%-ra emelkedett (382/401), amikor a képeket a képernyőn értékeltük (7. táblázat).

Hagyományos értékelés	EUROPattern képelemző algoritmus					
	negatív	P-ANCA	C-ANCA	atípusos ANCA	ANA/ACyA interferencia	összesen
negatív	328	6	19	48		401
P-ANCA		20		3		23
C-ANCA		1	14	2		17
atípusos ANCA	5	9	3	30		47
ANA/ACyA interferencia	1	23	4	52		80
összesen	334	59	40	135		568

6. táblázat A EUROPattern képelemző algoritmus osztályozási eredményei összehasonlítva a hagyományos mikroszkópos értékeléssel.

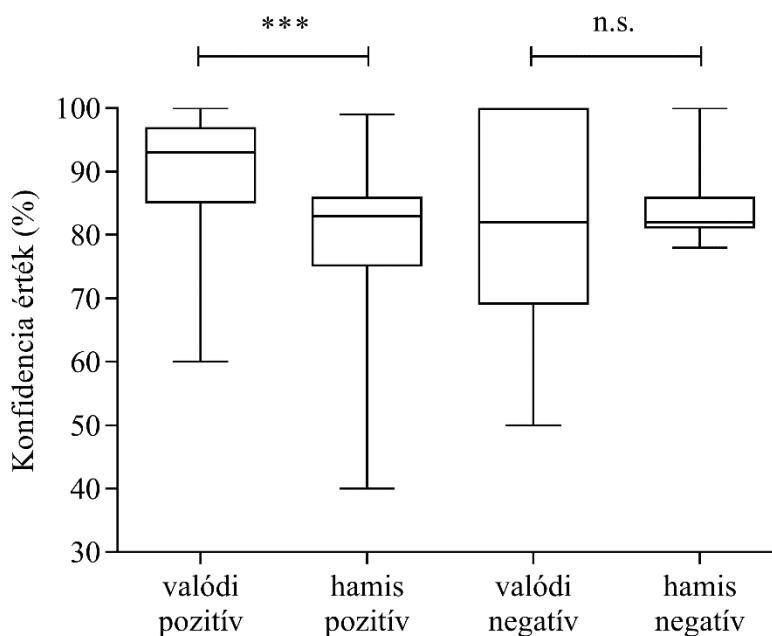
Hagyományos értékelés	Képernyőn végzett értékelés					
	negatív	P-ANCA	C-ANCA	atípusos ANCA	ANA/ACyA interferencia	összesen
negatív	382		1	6	12	401
P-ANCA		21	1	1		23
C-ANCA			16	1		17
atípusos ANCA			1	45	1	47
ANA/ACyA interferencia		1		3	76	80
összesen	382	22	19	56	89	568

7. táblázat A képernyőn végzett értékelés osztályozási eredményei összehasonlítva a hagyományos mikroszkópos értékeléssel.

167 minta került a nemnegatív csoportba a konvencionális mikroszkóppal történő leolvasással: 23 (4,0%) P-ANCA, 17 (3,0%) C-ANCA, 47 (8,3%) atípusos ANCA és 80 (14,1%) értékelhetetlen volt interferáló antitest miatt (ANA/ACyA interferencia). A nem értékelhető eredmények többségét ANA jelenléte okozta (80-ból 74, 93%). A nemnegatív minták körében a konvencionális leolvasással való egyezés kiváló volt az automatizált ($161/167 = 96,4\%$) és tökéletes (100,0%) a képernyőn történő kiértékelési mód esetén. Csak 5 atípusos ANCA és 1 ANA pozitív minta esetében volt negatív az EPa (6. táblázat), ezeket is helyesen minősítették az értékelők a képernyő

előtt (7. táblázat). Összességében az automatizált képértékelés eredményeinek 86,1%-a (489/568) volt összhangban a szokásos, konvencionális értékeléssel, míg a konkordancia 96,7% -ra nőtt (549/568) a képek képernyőn történő áttekintése után.

A valós C-ANCA, P-ANCA vagy atípusos ANCA pozitív eredmények (EPa automatizált és konvencionális értékelés is pozitív, $n = 82$) esetén a besorolás biztonságát mutató konfidencia érték mediánja jelentősen magasabb volt, mint az álpozitív (EPa pozitív, de hagyomány leolvasás negatív, $n = 73$) csoportban (93% vs 83%, $p < 0,001$). A valós negatív ($n = 328$) és hamis negatív ($n = 6$) csoportok konfidencia értékeinek összehasonlítása nem mutatott szignifikáns különbséget (9. ábra).

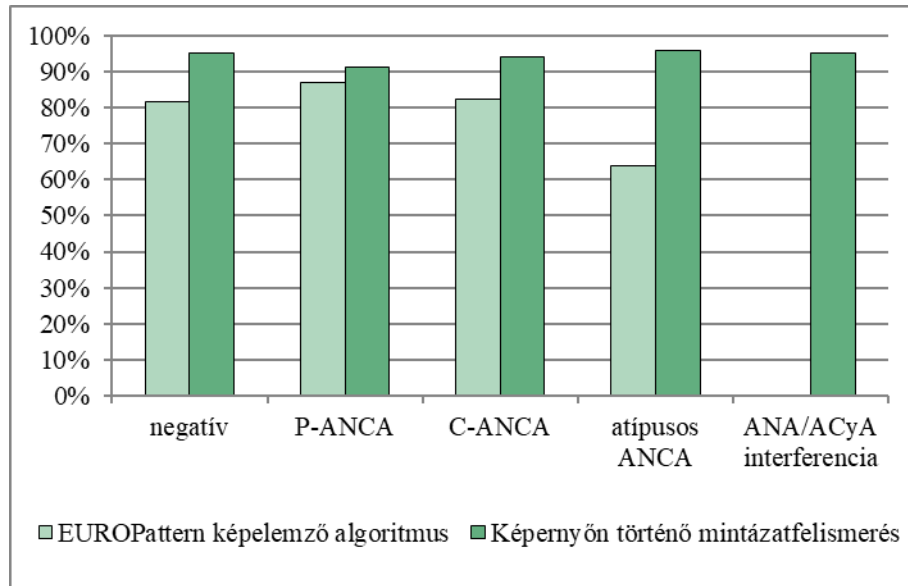


9. ábra Az automatikus képértékelés konfidencia értékei a valódi pozitív (EPa automatizált és konvencionális értékelés is pozitív, $n = 82$), hamis pozitív (EPa pozitív, de a hagyomány leolvasás negatív, $n = 73$), valódi negatív (EPa automatizált és konvencionális értékelés is negatív, $n = 328$) és hamis negatív (EPa negatív, de hagyomány leolvasás pozitív, $n = 6$) eredményekhez. A statisztikai értékeléshez Bonferroni-korrigált Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk; n.s.: $p > 0,05$, ***: $p < 0,001$.

6.1.5. A minták osztályozása mintázatfelismerés alapján

A EUROPattern automatizált értékelése a minták 69,0%-át helyesen sorolta be (összesen 392: 328 negatív, 20 P-ANCA, 14 C-ANCA, 30 atípusos ANCA), ha az ANCA mintázatot is figyelembe vesszük (6. táblázat). A jól osztályozott minták aránya 95,1%-ra emelkedett, amikor a leolvasó a képernyő előtt dolgozott (7. táblázat). A Cohen-féle kappá együttható 'mérsékelt' egyezést mutatott

a konvencionális mikroszkópos és a számítógépes algoritmikus értékelés között ($\kappa = 0,446$, 95% CI: 0,396–0,495), és 'nagyon jó' egyezést a hagyományos és a képernyős kategorizálás között ($\kappa = 0,900$, 95% CI: 0,864–0,936). Ha a gépi algoritmus eredményességét nézzük, akkor a helyesen azonosított minták aránya a legmagasabb a P-ANCA pozitív (87,0%), legalacsonyabb az atípusos ANCA pozitív (63,8%) szérumok között volt (10. ábra). A képértékelő algoritmus nem képes megkülönböztetni az antinukleáris vagy anti-citoplazmatikus zavaró antitesteket az ANCA-tól, ezért az ANA/ACyA pozitív mintákat főként atípusos ANCA-nak vagy kevésbé gyakran P-ANCA-nak sorolta be. Hangsúlyozni kell azonban, hogy egyetlen pozitív P-ANCA vagy C-ANCA mintát sem kategorizált az EPa negatívnak. A helyesen osztályozott minták aránya 91,3% és 95,7% között változott, ha a mintázatot humán értékelő azonosította a számítógép képernyőjén (10. ábra).



10. ábra A EUROPattern képelemző algoritmus osztályozásának és a felhasználó által képernyőn végzett mintázatfelismerés összehasonlítása: a helyesen, a hagyományos mikroszkópos értékeléssel azonosan kategorizált minták aránya.

Az automatizált képértékelés helytelen besorolása nagyrészt annak tudható be, hogy az interferáló antitesttel (ANA vagy ACyA pozitív) rendelkező mintákat atípusos ANCA-ként ($n = 52$) vagy P-ANCA-ként ($n = 23$) és a negatív mintákat atípusos ANCA-ként ($n = 48$) vagy C-ANCA-ként ($n = 19$) kategorizálta. A képernyőn történő értékelés során a helytelen osztályozás között előfordult a negatív minták ANA/ACyA pozitív ($n = 12$) vagy atípusos ANCA pozitív ($n = 6$), valamint az ANA/ACyA pozitív minták atípusos ANCA pozitív ($n = 3$) kategóriába való sorolása.

Sajnos a tesztelt betegek diagnózisával az eredményeket nem volt módunk összevetni, de a minták többségénél (428/568) az anti-PR3/MPO antitestek mérése megtörtént. Az anti-PR3 pozitivitás jól ismert és erős asszociációt mutat a C-ANCA, míg az anti-MPO pozitivitás a P-ANCA mintázattal, így ezek a mérések segíthetnek az IIF vizsgálatok értékelésének megítélésében. Az ELISA és az IIF vizsgálatok eredményeinek összevetése látható a 8. táblázatban. Általánosságban elmondható, hogy az EPa automatizált értékelés érzékenysége valamivel magasabb, mint a másik két értékelési módé, de ennek az az ára, hogy az álpozitív esetek száma nő (anti-PR3 esetén: 25 szemben a 7 és 10 mintával, valamint anti-MPO esetén: 30 szemben a 6, illetve 6 mintával).

ELISA eredmény	Hagyományos értékelés	EPa képelemző algoritmus	Képernyőn végzett értékelés
anti-PR3 pozitív (n=12)	8/12 (66,7%) C-ANCA	9/12 (75,0%) C-ANCA	7/12 (58,3%) C-ANCA
anti-PR3 negatív (n=416)	409/416 (98,3%) nincs C-ANCA	391/416 (94,0%) nincs C-ANCA	406/416 (97,6%) nincs C-ANCA
anti-MPO pozitív (n=25)	17/25 (68,0%) P-ANCA	23/25 (92,0%) P-ANCA	16/25 (64,0%) P-ANCA
anti-MPO negatív (n=403)	397/403 (98,5%) nincs P-ANCA	373/403 (92,6%) nincs P-ANCA	397/403 (98,5%) nincs P-ANCA

8. táblázat Az ELISA és a háromféle módon kiértékelt IIF vizsgálat eredményeinek összevetése

6.1.6. Az antinukleáris és anti-citoplazmatikus antitestek hatása a mintázatfelismerésre

Az antinukleáris és anti-citoplazmatikus antitestek mintázatfelismerésre kifejtett zavaró hatásának vizsgálatához a kappá koefficiens mint az egyezés mérőszámát kiszámoltuk úgy is, hogy a mintákat az ANA (n = 236) és az ACyA (n = 146) pozitivitása alapján csoportosítottuk (9. táblázat). Az ANA/ACyA pozitív minták száma viszonylag magas volt, de ezek az antitestek csak 80 esetben zavarták az ANCA-értékelést olyan mértékben, hogy az nem volt értékelhető. Az egyezés az automatizált és hagyományos értékelés között szignifikánsan gyengébb volt, ha ANA mintázat volt látható a HEp-2 sejteken (Cohen-féle kappá: 0,534 az 0,335-höz képest), de az ACyA jelenlétének ugyanilyen hatása nem volt kimutatható. Nem volt különbség a képernyőn végzett és a

hagyományos leolvasás eredményei közötti egyezőségben, az ANA/ACyA jelenléte nem rontotta le azt.

	Antinukleáris antitest (ANA)		Anti-citoplazmatikus antitest (ACyA)	
	negatív (n=332)	pozitív (n=236)	negatív (n=422)	pozitív (n=146)
EPa képelemző algoritmus vs. hagyományos értékelés	0,534* (0,440-0,628)	0,335* (0,275-0,395)	0,464 (0,407-0,521)	0,395 (0,297-0,494)
Képernyőn végzett értékelés vs. hagyományos értékelés	0,877 (0,811-0,943)	0,898 (0,848-0,948)	0,921 (0,884-0,957)	0,832 (0,739-0,924)

9. táblázat Az antinukleáris vagy anti-citoplazmatikus antitestek hatása a minták besorolására: Az EPa automatikus képelemzés és a képernyőn végzett értékelés egyezősége a hagyományos értékeléssel antinukleáris vagy anti-citoplazmatikus antitestek jelenlétében és hiányában. Az egyezés mértékét Cohen-kappa együtthatóval fejeztük ki (95% CI). *: $p < 0,05$

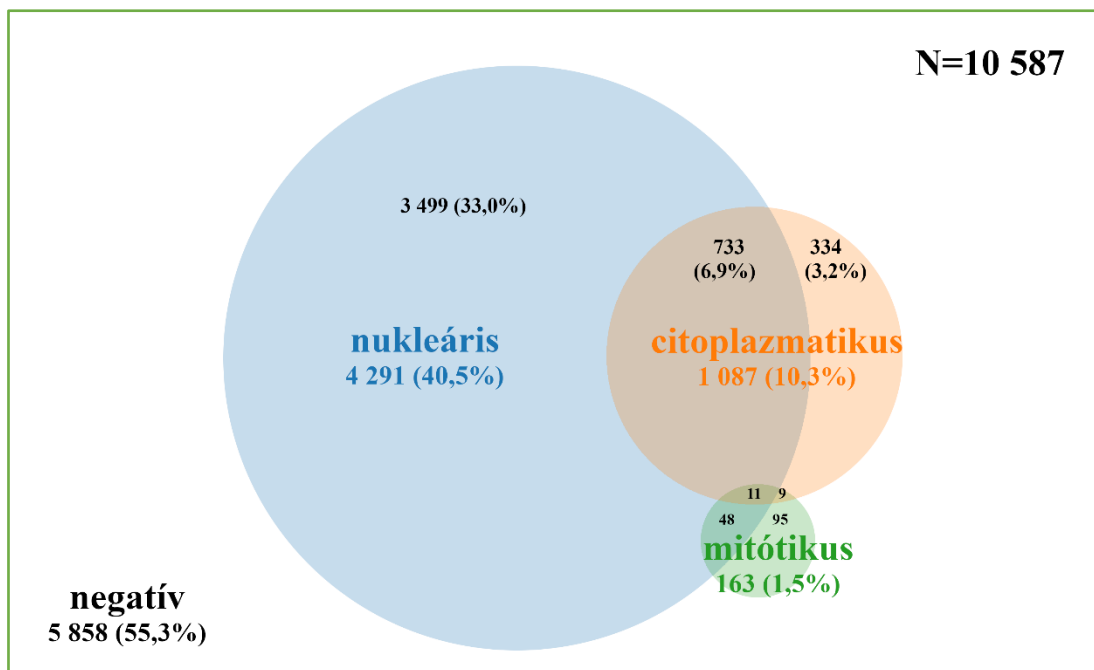
6.1.7. A gépi és képernyő előtti kiértékelés hatása a leolvasási időre

Az autofókuszálás, a képfelvétel és az automatikus értékelés egy reakciómezőn $63,8 \pm 1,5$ másodpercig tartott, ami összevethető a műszer specifikációjában megadott 20 másodperc/biochip kiértékelési idővel. A hagyományos leolvasással $79,5 \pm 9,0$ másodpercet vett igénybe egy mező leolvasása, míg egy minta kiértékeléséhez a képernyőn jóval kevesebb időre volt szükség ($46,8 \pm 2,4$ másodperc, $p < 0,001$).

6.2. A kevert ANA mintázatok vizsgálatának eredményei

6.2.1. Az egy vagy több ANA mintázattal rendelkező minták gyakorisága

Összesen 10 587 mintán végeztünk ANA HEp-2 IIF tesztet laboratóriumunkban 2019. március 1. és 2019. december 31. között. A negatív eredmények száma 5858 volt (55,3%), 3499 minta (33,0%) csak nukleáris, 334 minta (3,2%) csak citoplazmatikus és 95 minta (0,9%) csak mitótikus mintázatot mutatott, továbbá 801 szérum (7,6%) különböző kombinációban több mintázattal is rendelkezett ebből a három mintázatszoportból (11. ábra).



11. ábra Terület arányos Venn-diagram, ami a Laboratóriumi Medicina Intézetben 2019.03.01 és 12.31. között elvégzett 10 587 HEp-2 vizsgálat eredményének eloszlását mutatja.

A 4 291 nukleáris pozitív mintából 2 786 (64,9%) csak egy, 1 396 (32,5%) kettő, míg 109 (2,5%) három különböző magmintázatra volt pozitív. A citoplazmatikus és mitótikus pozitivitásnál 15 (1,4%) és 4 (2,5%) mintánál két különböző citoplazmatikus, illetve mitótikus mintázat volt jelen. Tehát egynél több mintázat leggyakrabban a nukleáris ANA pozitív szérumok között fordult elő. A homogén (AC-1) és a szemcsés (AC-4,5) magmintázat kombinációja messze a leggyakoribb volt (10. táblázat).

Mintázat-kombináció	N	%
homogén (AC-1) + szemcsés (AC-4,5)	937	62,3%
homogén (AC-1)+ nukleoláris (AC-8,9,10)	256	17,0%
szemcsés (AC-4,5) + nukleoláris (AC-8,9,10)	99	6,6%
szemcsés (AC-4,5) + néhány nukleáris pont (AC-7)	67	4,5%
homogén (AC-1) + néhány nukleáris pont (AC-7)	45	3,0%
homogén (AC-1) + centromer (AC-3)	25	1,7%
szemcsés (AC-4,5) + több nukleáris pont (AC-6)	17	1,1%
homogén (AC-1) + több nukleáris pont (AC-6)	12	0,8%

Mintázat-kombináció	N	%
szemcsés (AC-4,5) + centromer (AC-3)	11	0,7%
egyéb	36	2,4%
összesen	1505	100%

10. táblázat A leggyakoribb magmintázat-kombinációk és gyakoriságuk a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben a tíz hónapos időszakban végzett HEp-2 indirekt immunfluoreszcens vizsgálatok között.

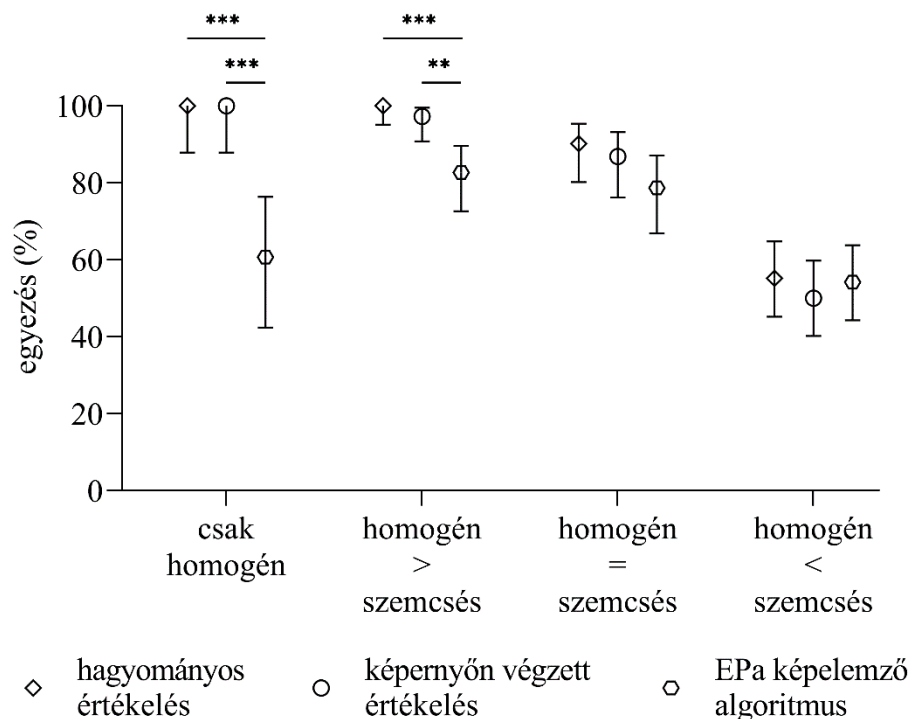
6.2.2. Az elvárt mintázattal való egyezés a zavaró második mintázat jelenlétében

6.2.2.1 *A szemcsés magmintázat hatása a homogén magmintázat felismerésére*

Azokat a mintákat, amelyek csak homogén mintázatot mutattak, a hagyományos és a képernyőn végzett értékeléssel is 100%-ban sikerült megfelelően osztályozni, míg az EPa besorolása szignifikánsan pontatlanabb volt (60,7%, $p = 0,0002$) (12. ábra). Az EPa alacsonyabb hatékonysága az izolált homogén pozitivitás felismerésében nagyrészt azzal magyarázható, hogy alacsonyabb találati aránnyal ismeri fel a legalacsonyabb, 1:80 titerű mintázatot. Amikor külön vizsgáltuk az 1:320, 1:1280 és 1:5120 titerű csak homogén pozitív mintákat, a felismerés aránya már 80,9% volt (ábrán nem mutatjuk be).

Ha a homogén mintázat titere magasabb, mint a szemcsés mintázaté, akkor a zavaró szemcsés mintázat jelenlétében az egyezés 100% hagyományos és 97% képernyőn végzett értékelés esetén, ugyanakkor az EPa kép elemzésének egyezési aránya (83%) kissé, de szignifikánsan alacsonyabb volt ($p = 0,0002$, illetve $p = 0,0028$). Az egyezés százaléka csökkent, ha a zavaró mintázat titere azonos (hagyományos: 90,2%, képernyős: 86,9%, EPa: 78,7%) vagy magasabb volt (hagyományos: 55,2%, képernyős: 50,0%, EPa: 54,2%), mint a homogén mintázat titere (12. ábra).

Homogén mintázat



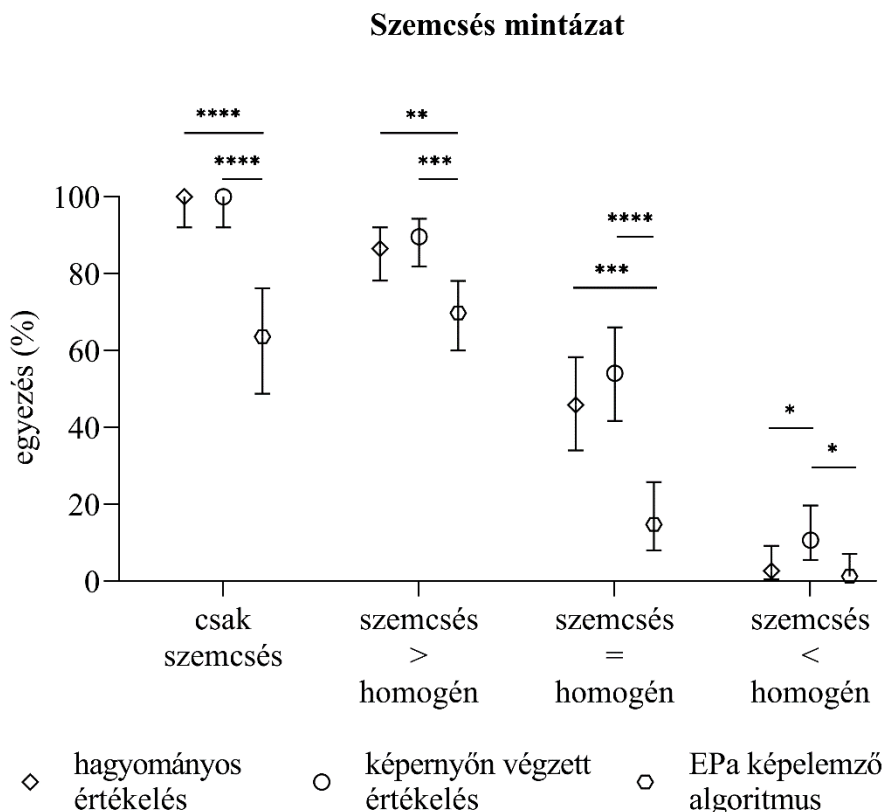
12. ábra A szemcsés mintázat hatása a megfigyelt és a várt mintázat egyezésére homogén mintázat esetén hagyományos, képernyőn végzett és EPa automatikus értékelés során. A homogén mintázat felismerését vizsgáltuk interferáló szemcsés mintázat nélkül és akkor, amikor a homogén mintázat titere magasabb, egyenlő vagy alacsonyabb a zavaró mintázaténál. A jelölők az egyezés arányát, a hibavonalak annak 95%-os konfidencia intervallumát mutatják (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

6.2.2.2 A homogén magmintázat hatása a szemcsés magmintázat felismerésére

A csak szemcsés mintázatú minták azonosítási aránya 100% volt hagyományos és képernyőn végzett értékelésnél, míg az EPa esetében csak 63,6% ($p < 0,0001$) (13. ábra). Hasonlóan a homogén mintázathoz, a csak szemcsés mintázat felismerési százaléka is jobb volt az EPa esetében, ha a titer $\geq 1:320$ (87,5%, ábrán nincs megjelenítve).

A szemcsés mintázat felismerési aránya a homogén mintázat jelenlétében hagyományos és képernyőn végzett leolvasással 87%, illetve 90% volt, abban az esetben, ha a finomszemcsés mintázat szintje magasabb volt, mint a zavaró homogén mintázaté. Az EPa automatikus elemzés felismerési aránya jó volt (69,8%), de szignifikánsan gyengébb a másik két módszerhez képest ($p = 0,0052$ és $p = 0,0007$). Amikor a két mintázat titere azonos volt, az egyezési arány 14,8% volt az EPa használatával, míg a szemcsés magmintázatot hagyományos és képernyőn végzett értékeléssel

jelentősen magasabb hányadban azonosítottuk helyesen (45,9%, $p = 0,0002$, illetve 54,1%, $p < 0,0001$). Az egyezési arány 20% alatt volt, amikor a zavaró mintázat szintje magasabb volt, mint a szemcsés mintázaté (hagyományos: 2,7%, képernyős: 10,7%, EPa: 1,3%) (13. ábra).



13. ábra A homogén mintázat hatása a megfigyelt és a várt mintázat egyezésére szemcsés mintázat esetén hagyományos, képernyőn végzett és EPa automatikus értékelés során. A szemcsés mintázat felismerését vizsgáltuk interferáló homogén mintázat nélkül és akkor, amikor a szemcsés mintázat titeré magasabb, egyenlő vagy alacsonyabb a zavaró mintázaténál. A jelölők az egyezés arányát, a hibavonalak annak 95%-os konfidencia intervallumát mutatják ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$).

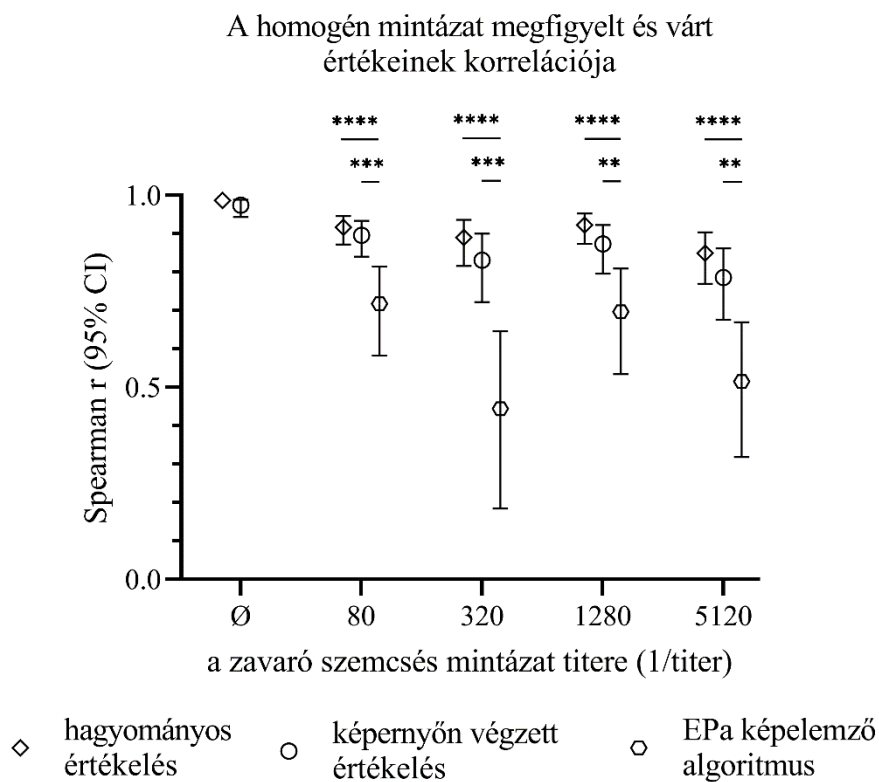
6.2.3. A megfigyelt és a várt fluoreszcencia intenzitás/titer korrelációja

6.2.3.1 Vizsgált mintázat: homogén magmintázat, zavaró mintázat: finomszemcsés magmintázat

A homogén mintázat fluoreszcencia intenzitása a hagyományos és a képernyőn végzett értékelési módszerekkel erős korrelációt mutatott a várt titerrel mind a finomszemcsés mintázat jelenléte, mind a hiánya esetén (Spearman r rangkorrelációs együttható: 0,79–0,99). Ezzel szemben az EPa automatikus képértékelés becsült titerértékei sokkal kevésbé voltak pontosak (14. ábra). Zavaró szemcsés mintázat nélkül ennél a kiértékelési módnál nem is volt szignifikáns a korreláció a homogén mintázat elvárt és megfigyelt titeré között, ami azzal magyarázható, hogy az 1:80 titerű

mintáknál a mintázat felismerés hatékonysága csökkent volt, míg 1:320 és afeletti titernél jelentős túlbecslést lehetett tapasztalni. Szemcsés mintázat jelenlétében a homogén mintázat várt és észlelt titer értékei között mérsékelt, de szignifikáns korrelációt meg lehetett megfigyelni (r : 0,44–0,72, minden p -érték $<0,01$) az EPa automatikus képértékelés esetében is.

A zavaró szemcsés mintázat titerének változása nem befolyásolta szignifikánsan a vizsgált homogén mintázat elvárt és észlelt titerének/fluoreszcencia intenzitásának korrelációját (14. ábra).

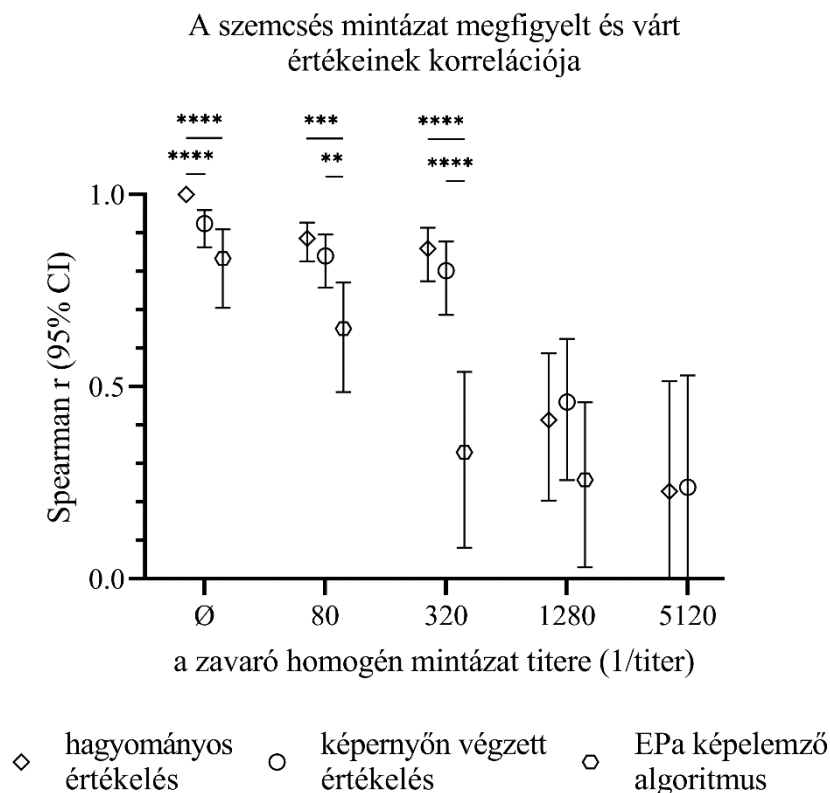


14. ábra A homogén mintázat háromféle kiértékelési móddal megfigyelt titer/fluoreszcenciaintenzitás értékeinek korrelációja a várt titerrel zavaró szemcsés mintázat nélkül és jelenlétében. A jelölők a Spearman-féle r korrelációs együtthatót, a hibavonalak annak 95%-os konfidencia intervallumát mutatják (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

6.2.3.2 Vizsgált mintázat: finomszemcsés magmintázat, zavaró mintázat: homogén magmintázat

A rangkorreláció erős volt (r : 0,80–1,00) a szemcsés mintázat észlelt és várt fluoreszcencia intenzitása között a hagyományos és képernyőn végzett értékeléseknél, de csak akkor, ha a zavaró homogén mintázat hiányzott vagy annak titer 1:1280 alatt volt. Az automatikus képértékelés ebben a tartományban erőstől gyenge szintig terjedő korrelációt mutatott (r : 0,83–0,33). Alacsony szintű korrelációt találtunk ($r < 0,5$) minden értékelési típusban, ha a homogén mintázat jelen volt

1:1280 vagy 1:5120 titerben. Az EPa becsült titer és az elvárt titer között nem volt szignifikáns korreláció, amikor a homogén mintázat titere 1:5120 volt. Összességében a korreláció jelentősen csökkent a zavaró mintázat titerének növekedésével (15. ábra).

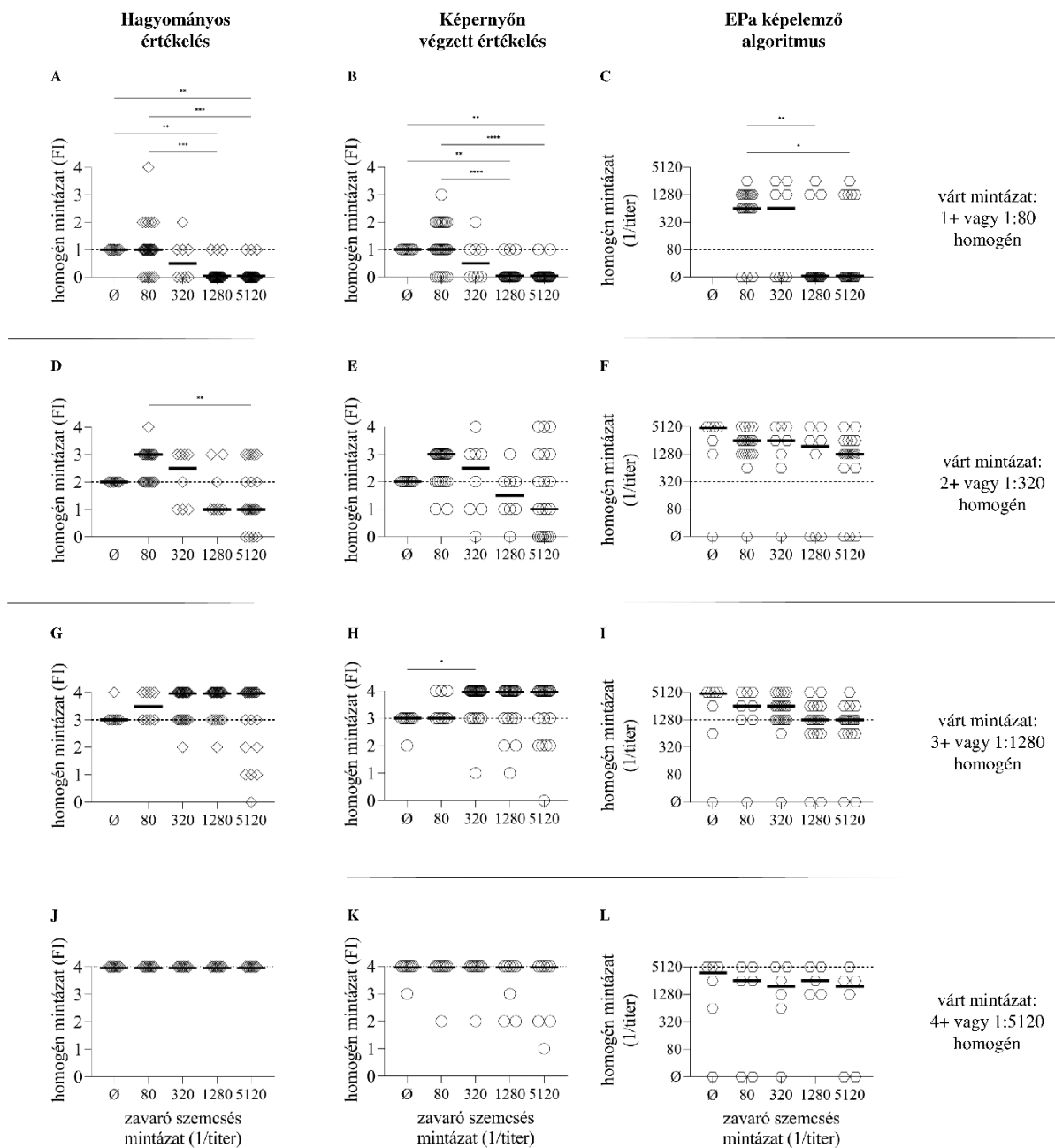


15. ábra A szemcsés mintázat háromféle kiértékelési móddal megfigyelt titer/fluoreszcenciaintenzitás értékeinek korrelációja a várt titerrel zavaró homogén mintázat nélkül és jelenlétében. A jelölők a Spearman-féle r korrelációs együtthatót, a hibavonalak annak 95%-os konfidencia intervallumát mutatják (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

6.2.4. A szemcsés magmintázat homogén magmintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése

A várt 1:80 (1+) pozitív homogén minták esetén a homogén mintázat megfigyelt fluoreszcencia intenzitása a hagyományos és képernyőn végzett értékelés során szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb volt, mint a FI a szemcsés mintázat nélküli mintákban, ha a zavaró szemcsés mintázat titere 1:1280 vagy annál magasabb volt (16. ábra A-B). Ugyanezt nem lehetett megítélni az EPa esetén, mert a zavaró mintázat hiányában az összes homogén mintát 'nem értékelhető' kategóriába sorolta és nem adott meg becsült titer. Azonban - hasonlóan a más két értékelési típushoz -, ha a homogén mintázat elvárt titere 1:80 volt és a szemcsés mintázat titere $\geq 1:1280$ volt, a homogén

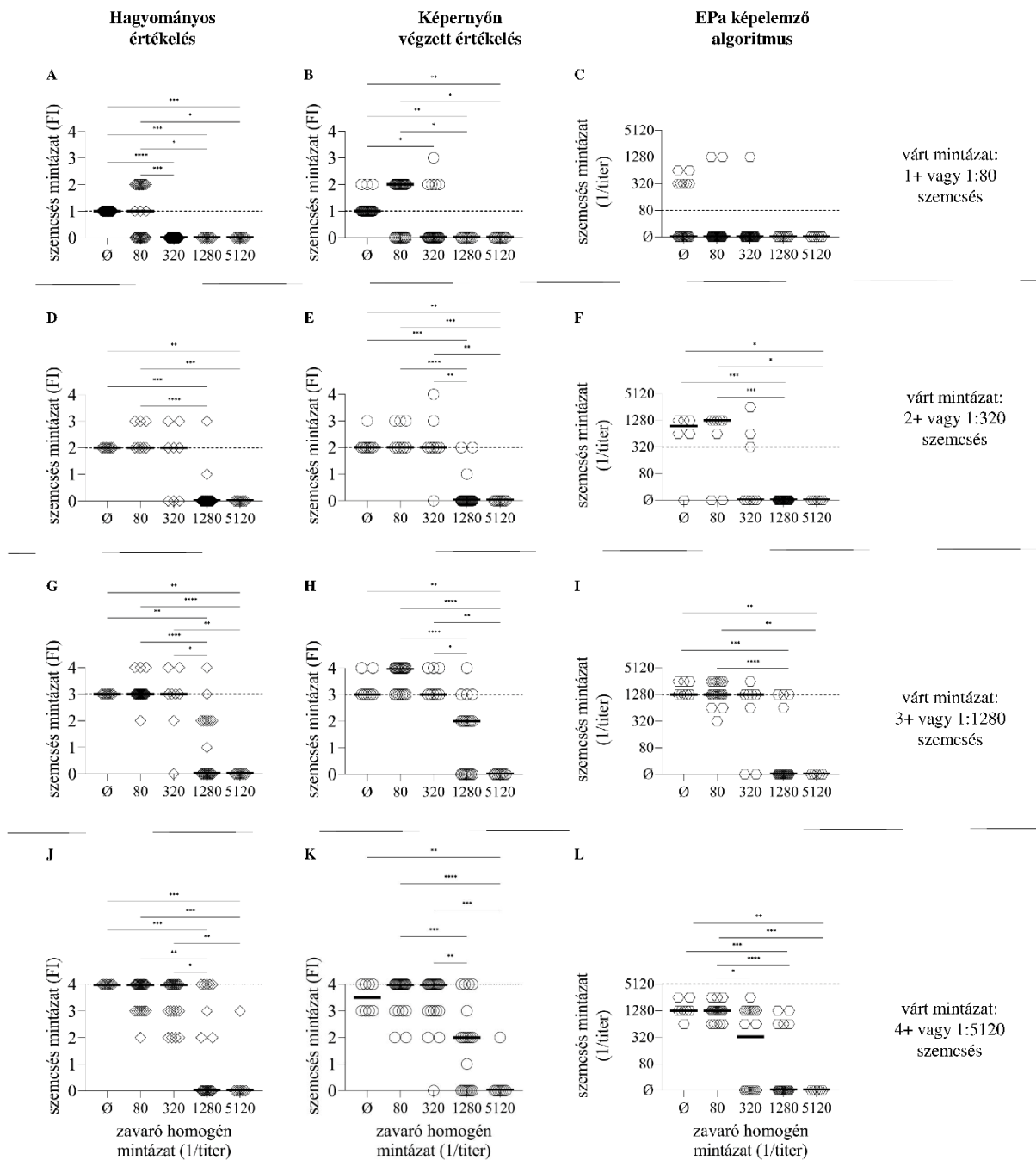
mintázatot legtöbbször nem ismerte fel a képelemző algoritmus (16. ábra C). A homogén mintázat erősségének ugyanilyen alulbecslése látható a 16. ábra D–E részén (homogén mintázat 1:320 vagy 2+), de a különbségek itt nem szignifikánsak. Szignifikáns negatív interferencia nem látható, ha a homogén mintázat várt titere 1:1280 vagy 1:5120, függetlenül attól, hogy a szemcsés mintázat titere mennyire magas (16. ábra G-L). Ugyanakkor szignifikáns ($p = 0,0147$) felülmérés tapasztalható a homogén mintázat képernyőn megfigyelt fluoreszcencia intenzitásában, ha a várt homogén mintázat titer 1:1280 és zavaró szemcsés mintázat van jelen 1:320 titerben (16. ábra H). Ugyanez a pozitív interferencia tendenciaszerűen látható a 16. ábra D, E és G részén is ($p = ns.$). A homogén mintázat erősségének megítélésében az EPa becsült titer a legkevésbé pontos, amit a még zavaró antitest hiányában is megmutatkozó számottevő túlbecslés jól mutat (16. ábra F és I). Ezenkívül világosan látható, bár statisztikai tesztekkel nem elemeztük, hogy egy második szemcsés mintázat jelenlétében a homogén mintázat erőssége nagyobb variabilitással határozható meg.



16. ábra A szemcsés mintázat homogén mintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése. Minden adatpont egy megfigyelt fluoreszcenciaintenzitást (FI; a "Hagyományos értékelés" és a "Képernyőn végzett értékelés" esetében) vagy 1/titer értéket (az "EPa képelemző algoritmus" esetében) mutat egy adott keverékben, amiben mind a vizsgált homogén, mind a zavaró szemcsés mintázat titeré ismert (számított). Az egyes keverékekben megfigyelt homogén mintázat FI/titer az y-tengelyen (a vastag szakaszok a mediánértékeket mutatják), míg az interferáló szemcsés mintázat titerét az x-tengelyen ábrázoltuk. A homogén mintázat várt FI vagy titer értékét a szaggatott vonal jelzi. Interferencia hiányában és az erősség tökéletes leolvasása esetén az összes adatpont a szaggatott vonalakon lenne. Az összehasonlításhoz Kruskal-Wallis és Mann-Whitney teszteket használtunk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

6.2.5. A homogén magmintázat szemcsés magmintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése

Az 1:80 titerű szemcsés mintázatú minták megfigyelt fluoreszcencia intenzitása hagyományos és képernyőn végzett értékeléssel szignifikánsan alacsonyabb volt (p értékek: $<0,0001$ -től $0,0378$ -ig), ha a zavaró homogén mintázat titere $\geq 1:320$ (17. ábra A és B). Ez a negatív irányban ható interferencia statisztikai teszttel nem volt igazolható az EPA értékelésénél, mivel a referenciaként használt határérték pozitív mintáknál sok álnegatív eredményt kaptunk (17. ábra C). Az összes olyan keveréknél, ahol a szemcsés mintázat várt titere $\geq 1:320$ és a zavaró homogén mintázat titere $\geq 1:1280$, a szemcsés mintázat erősségének szignifikáns alulbecslését láttuk (p értékek: $<0,0001$ -től $0,0158$ -ig), kivéve kettő kombinációt (17. ábra D–G, I, J, L). Valójában ebben a két esetben is valószínűsíthető negatív interferencia, csak az alulbecslés nem szignifikáns 1:1280, csak 1:5120 titerű zavaró homogén mintázat mellett (17. ábra H és K, $p = 0,0051$, illetve $p = 0,0036$). Kis mértékű, de nem szignifikáns ($p = ns$) a szemcsés mintázat FI-nak túlbecslése a képernyőn végzett értékelés során azokon a mintákon, ahol a zavaró homogén mintázat titere 1:80 (17. ábra B és H). Az EPA becsült titer pontatlansága feltűnő a zavaró homogén mintázat nélküli határérték pozitív szemcsés mintázatú minták esetében (17. ábra C). Hasonlóan a szemcsés mintázat zavaró hatásához, a szemcsés mintázat fluoreszcencia intenzitásának megítélése is bizonytalanabb, nagyobb szórással olvasható le egy második homogén mintázat jelenlétében.



17. ábra A homogén mintázatra kifejett zavaró hatásának részletes elemzése. Minden adatpont egy megfigyelt fluoreszcenciaintenzitást (FI; a "Hagyományos értékelés" és a "Képernyőn végzett értékelés" esetében) vagy 1/titer értéket (az "EPa képelemző algoritmus" esetében) mutat egy adott keverékben, amiben mind a vizsgált szemesés, mind a zavaró homogén mintázat titer ismert (számított). Az egyes keverékekben megfigyelt szemesés mintázat FI/titer az y-tengelyen (a vastag szakaszok a mediánértékeket mutatják), míg az interferáló homogén mintázat titerét az x-tengelyen ábrázoltuk. A szemesés mintázat várt FI vagy titer értékét a szaggatott vonal jelzi. Interferencia hiányában és az erősség tökéletes leolvasása esetén az összes adatpont a szaggatott vonalakon lenne. Az összehasonlításhoz Kruskal-Wallis és Mann-Whitney teszteket használtunk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

7. Megbeszélés

7.1. Az ANCA vizsgálatok eredményei

Az ANCA kimutatás elengedhetetlen számos autoimmun és gyulladással járó megbetegedés diagnosztikájában. Ugyan több tanulmány kimutatta, hogy az antigén-specifikus tesztek jobban elkülönítik az ANCA-asszociált vasculitisszel rendelkező betegeket a betegkontrolloktól, mint az IIF vizsgálat [46, 112-114], de az továbbra is nagy segítség nyújt, ha az anti-PR3/anti-MPO tesztek eredménye és a klinikum egymásnak ellent mond [46, 112-115]. Emellett az IIFT fontos az olyan diagnosztikai laboratóriumokban, amelyek jelentős mennyiségben kapnak mintát nem-vasculitises betegektől.

Az ANCA vizsgálatok területén célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az Euroimmun EUROPattern (EPa) automatizált IIF mikroszkópos rendszert [116, 117] és összehasonlítsuk a számítógéppel segített értékelési módokat a hagyományos leolvasással nagyszámú, olyan rutin mintán, melyek az immunológia, reumatológia, nefrológia, gasztroenterológia és hepatológia szakterületek szakorvosaitól érkeztek, így az ANCA meghatározás minden indikációját lefedik.

Először az IIF rendszer analitikai megbízhatóságát teszteltük. Az ismételt vizsgálatunk jó reprodukálhatóságot mutatott az EPa automatikus értékelés esetében. A P-ANCA, a C-ANCA és az atípusos ANCA mintázatot mutató alacsony vagy határértékű pozitív mintákat minden futtatásban az elvártnak megfelelően osztályozta az algoritmus, csak egy teszt adott negatív eredményt. Ez lehetett mintastabilitási probléma, mivel a rendelkezésre álló alacsony szérummennyiség miatt a mintát nem fagyasztottuk le és a negatív eredményt az utolsó napon kaptuk, bár a reagens leirat szerint a szérumok +2°C és +8 °C közötti hőmérsékleten 14 napig tárolhatók.

A kép fluoreszcenciaintenzitásából számolt titer linearitása elfogadható volt az 1:10–1:100 tartományban, de efelett a görbe ellaposodott. Ez valószínűleg a fluoreszcenciaintenzitás és a 8 bites kamera által digitalizálható fényintenzitás tartományai közötti nagy különbségre vezethető vissza. Mivel a gyártó nem engedélyezi a becsült titer végponti titerként való közlését a leleten, ezért ezt nem tekintjük valódi problémának. Ha szükség van a végponti titer meghatározására, azt hígítási soron el lehet végezni.

Fontos viszont, hogy néhány erősen pozitív mintánál magas dózisu hook-effektus jelentkezett. Ez a jelenség IIF esetén is ismert: fluoreszcencia quenching vagy a konjugátum bekötődésének sztérikus gátlása csökkentheti a fluoreszcencia erősségét, ha az autoantitest koncentrációja rendkívül magas [118, 119]. A magas dózisu hook-effektus a képernyős és a hagyományos kiértékelésnél is megjelenik, de amit a humán értékelő könnyen felismer, azt az EPa automatizált analízise nem képes azonosítani. A képernyős értékelésnél segít, ha több kép készül a látótérről, mivel a fluoreszcencia csökkenése kisebb a reakciómező széli részén.

A pozitív-negatív elkülönítés pontossága talán a legfontosabb paramétere egy automatizált IIF rendszernek, mivel a rutin minták túlnyomó többsége negatív. Tanulmányunkban a szérumok 70,6%-a volt negatív, és ezek 81,8%-át sorolta be az automatizált képelemzés helyesen. Ennél fontosabb, hogy a 334 automatizált képanalízissel negatív mintából 328-at a hagyományos értékelés is negatívnak minősített. Csak 6 minta volt álnegatív, de az értékelő mindegyiket helyesen minősítette a képernyőn.

A EUROPattern nemcsak a pozitív-negatív minősítést, hanem a pozitív minták mintázat szerinti osztályozását is el tudja végezni. A képelemző algoritmus így négy különböző kategóriába csoportosít: negatív, C-ANCA, P-ANCA vagy atípusos ANCA. A nálunk beüzemelt készülék szoftvere nem volt alkalmas arra, hogy megkülönböztesse az antinukleáris vagy anti-citoplazmatikus zavaró mintázatokat az ANCA-tól, ami az ötödik kategóriát ('ANA/ACyA interferencia') képezte a hagyományos és a képernyőn történő értékelés során.

Vizsgálatunkban a minták 69,0%-át kategorizálta a EUROPattern képanalízis a hagyományos mikroszkópos olvasás eredményének megfelelően, míg a képernyőn végzett értékelésnél ez az arány 95,1% volt. A jó egyezést ennél a kiértékelési módnál a magas rangkorrelációs együttható ($\kappa = 0,900$) is jelzi. A 401 negatív mintából csak 19-et minősített helytelenül pozitívnak, míg a 167 nemnegatív mintából 9-et negatívnak az értékelő a képernyőn. Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy a számítógépes értékelés önmagában nem elég pontos, a leletezéshez a felhasználó korrekciója, jóváhagyása szükséges.

Az EPa helytelen osztályozása döntően két okra volt visszavezethető:

i) Negatív mintákat sorolt a pozitívak közé. Ezeket az eltéréseket külön megvizsgálva azt láttuk, hogy többségük olyan minta volt, amiknél a fluoreszcencia intenzitása a határértékhez nagyon közeli volt, mely a hagyományos értékeléssel még negatív besorolást kapott, de az EPa már pozitívnak minősítette. A határérték közeli minták eltérő értékelését részben magyarázhatja,

hogy a EUROPattern és a hagyományos mikroszkóp fényforrása és optikai elemei különbözőek. A minták fluoreszcencia intenzitása valóban is kissé alacsonyabb lehetett a hagyományos értékelés idején, mivel az a lemezek automatizált fényképezése, tehát már egy fényexpozíció után történt. Ezt a hibát teljesen nem tudtuk elkerülni, mert mindenképpen ugyanazokat a lemezeket akartuk a különböző módszerekkel értékelni. A hiba mértéke viszont ebben az elrendezésben valószínűleg elhanyagolható, de mindenképpen kisebb, mivel az automatizált mikroszkópban az excitációs fény csak a kép rögzítésekor van bekapcsolva, míg a hagyományos mikroszkópban folyamatosan. Önmagukban ezek a hatások azonban nem lehetnek az EPa eltérő minősítésének az okai, mert akkor a képernyőn végzett értékelésnél is hasonló hibás értékeléseknek kellett volna előfordulnia. Ezért inkább az valószínű, hogy a képelemző algoritmus kifejlesztésekor a gyártó alacsonyabb küszöbértékeket állított be, hogy elkerülje a fals negatív eredményeket, akár a fals pozitivitás növekedése árán is. Mindenesetre a határérték pozitív minták helyes azonosítása valóban nehéz, de még ez az alacsony ANCA szint is lehet klinikailag fontos, mivel összefügghet a betegség rosszabb kimenetelével [120].

ii) A hibás EPa kategorizálás másik gyakori oka az ANA és/vagy ACyA interferencia volt. Ezeket a mintákat az EPa legtöbbször atípusos ANCA-ként osztályozta, mivel mind az antinukleáris, mind az anti-citoplazmatikus antitest pozitivitást okoz az etanollal rögzített granulocitákon, míg a formalinnal rögzített neutrofil sejtek negatívak, hasonlóan az atípusos mintázathoz. Néhány ANA/ACyA pozitív mintát, amelyeknél halvány fluoreszcencia volt látható a formalinnal rögzített granulocitákon is, tévesen P-ANCA-ként osztályozott. Ezen esetek többsége a képernyőn természetesen jó besorolást kapott.

Az automatizált képanalízis és a képernyőn történő értékelés eredményeit a hagyományos mikroszkópos értékeléssel hasonlítottuk össze, miközben ennek a leolvasási módnak is van pontatlansága és szubjektivitása. Annak érdekében, hogy objektívebben értékelhessünk, a különböző IIF értékelési módok eredményeit összehasonlítottuk az anti-PR3 és anti-MPO ELISA eredményekkel, melyek elérhetőek voltak a laboratórium információs rendszerben a betegek többségénél. Ez az elemzés azt mutatta, hogy az EPa automatizált osztályozás érzékenysége kissé magasabb a más két IIF értékelési móddal összehasonlítva, de egyben magasabb az álpozitivitás is. Ha az összes esetet figyelembe vesszük, ahol az ELISA eredmények rendelkezésre álltak, akkor a hagyományos leolvasásnak volt a legjobb a hatékonysága, mutatva, hogy miért ennek használatát tekintjük referencia eljárásnak. Fontos megemlíteni, hogy az ELISA pozitív/IIF negatív minták

nagy részében igen alacsony, éppen referencia tartomány feletti ANCA-szint volt mérhető ELISA teszttel. Ez megerősíti azt az új konszenzust, amely az antigén-specifikus tesztek alkalmazását javasolja az ANCA-asszociált vaszkulitisek laboratóriumi kivizsgálásánál.

A EUROPattern mikroszkóp/szoftver értékeléséről ANCA vonatkozásában csak egy korábbi vizsgálatot találtunk, de az is más beteganyagon és más reagensek felhasználásával történt. Ebben a tanulmányban Csernok és mtsai. különböző típusú vasculitises betegeket, egészséges egyéneket és autoimmun és gyulladásos rendellenességekben szenvedőket vizsgáltak, de kizárták a gyulladásos bél- és autoimmun májbetegségeket. Az automatizált IIFT érzékenysége és specificitása vasculitis esetében 89,8% és 89,2% volt, a ROC AUC értéke pedig 0,904 [121]. Ezen kívül egy tanulmány foglalkozott a Helios [122, 123], míg legalább 5 az Aklides rendszerrel [124-128]. Egy francia tanulmány a mi megközelítésünkhöz hasonlóan, rutin minták sorozatán tesztelték az Image Navigator automatizált mikroszkópot [129]. Ezekben a publikációkban - az utolsó kivételével - az automatizált ANCA-értékelő rendszerek hasonló diagnosztikai teljesítményt mutattak, mint a mi tanulmányunk.

Az automatizált IIF mikroszkópok alkalmazása várhatóan azt eredményezi, hogy csökken a humán munkaigény és az adminisztráció, rövidül az analízis összideje, egyszerűsödik a munkafolyamat. A képernyőn történő értékelés gyorsabb lehet, mint a hagyományos leolvasás, mivel a lemezek cseréje, a reakciómezők közötti váltás és a fókuszálás előzetesen megtörténik. A mi tanulmányunkban ez 41%-kal csökkentette az értékelési időt.

A vizsgálatunk egyik korlátja a P-ANCA és C-ANCA pozitív esetek viszonylag alacsony száma, de ez következik abból, hogy a célunk a EUROPattern rendszer tesztelése volt olyan minták sorozatán, amelyben jelentős részt tesznek ki a nem vasculitis irányában vizsgáltak. Ezáltal lehetséges annak megítélése, hogy a számítógépes képelemzés és a képernyőn végzett értékelés helyettesítheti-e a hagyományos mikroszkópos leolvasást a rutin ANCA diagnosztikában.

7.2. A kevert ANA mintázatok vizsgálatának eredményei

Az HEp-2 sejteken alapuló IIF teszt az ajánlott ANA szűrő módszer szisztémás autoimmun betegségek gyanúja esetén. Az utóbbi években a standardizálásukra tett erőfeszítések megbízhatóbbá tették ezeket a teszteket [102, 104], a manuális munkaigény csökkent az automatizált lemezelőkészítő készülékek megjelenésével, emellett számítógép-vezérelt mikroszkópok váltak elérhetővé, amelyek képesek a mikroszkópos kép rögzítésére és elemzésére [106, 107].

Ezek a digitális képet elemző számítógépes algoritmusok megbízható adatokat szolgáltathatnak az ANA pozitivitás/negativitás tekintetében, de az ANA mintázatok azonosítása még mindig kihívást jelent [108, 130, 131]. Ha összehasonlítjuk a mintázatok algoritmusok által önállóan végzett osztályozását a hagyományos mikroszkópos értékeléssel, akkor az egyezés az Aklides rendszer esetében 43,0% és 84,7% között [106, 132, 133], a EUROPattern esetében 69,0% és 87,1% között [106, 117, 134-136], a Helios esetében 70,8% [137], a NovaView esetében 53,8% és 70,8% között [106, 137-139], valamint a Zenit G-sight esetében 26,0% és 63,0% között [106, 140, 141] változik. Az egyedi mintázatok esetén a helyes azonosítás százalékos arányai még szélesebb tartományban változnak. A homogén mintázatot 46,7% és 95,0% között, a szemcsés mintázatot 11,1% és 76,9% között, a nukleoláris mintázatot 33,3% és 100% között, míg a centromer mintázatot 25,0% és 92,7% között azonosították jól a különböző automatizált rendszerek. A pontozott magmintázat (helyes azonosítás 0% - 100%), a magmembrán (helyes azonosítás 0% - 50%) és a citoplazmatikus mintázatok (helyes azonosítás 48,0% - 100%) felismerésére nem minden analizátor képes, emellett ilyen mintázatok alacsony számmal szerepeltek a tanulmányokban. A nagy variabilitásért részben az eszközök képességei, részben a tanulmányok felépítése közötti különbségek okolhatók. Az értékelt minták száma 49 és 3745 között változott, egyes tanulmányok szelektált pozitív mintákat használtak, míg másokban rutindiagnosztikai értékelésre küldött szokásos mintákat teszteltek. Ez drasztikusan megváltoztathatja a helyesen azonosított mintázatok/minták arányát.

A számítógéppel támogatott rendszereknél nagyobb a helyesen felismert mintázatok aránya, ha a rögzített digitális képet nem a képelemző algoritmus, hanem az ANA mintázatok leolvasásában jártas szakember értékelt képernyőn. Az egyezés aránya a monitoron és a konvencionális mikroszkópos értékelés között hasonlóan magas volt a EUROPattern (94,6%) [134], a NovaView (97,0%) [142] és a Zenit G-sight (90,0%) [141] esetében.

A legnehezebb feladat az ANA IIF értékelése során az olyan minták osztályozása, melyek egyszerre egynél több mintázattal rendelkeznek. Tudomásunk szerint jelenleg az automatizált, számítógéppel segített rendszerek közül csak a EUROPattern képelemző algoritmus képes kategorizálni az ilyen többszörös vagy kevert mintázatokot és azonosítani az egyes komponenseit. Azon esetek aránya, ahol a EUROPattern képelemző szoftvere a domináns mintázatot a klasszikus mikroszkópos értékelésnek megfelelően azonosította viszonylag magas volt: 87,5% [143] és 95,2% [135]. Ezzel szemben a többszörös/kevert mintázat minden komponensét csak 33,3% és 68,4% közötti arányban azonosította helyesen az automatizált rendszer [134-136, 143]. Ezen adatok

alapján az ANA mintázatok pontos osztályozása az automatizált, számítógép-segített rendszerek számára még mindig nagy kihívás, ami még kifejezettebb több ANA mintázat egyidejű előfordulása esetén.

A rutin diagnosztikában ez nagyon lényeges, hiszen a több ANA mintázattal rendelkező minták aránya viszonylag magas. Az általunk vizsgálat 10 hónapos időszakban a pozitív minták több, mint harmadában (36,3%) volt többszörös/kevert mintázat, és hasonló arányokat mutattak korábbi tanulmányok is. Choi és munkatársai [144] 17,1%, illetve 20,3%-nak találták a kevert mintázatú minták arányát ANA IIF szűrésnél, illetve titrálásnál. Van Beers tanulmánya [145] szerint a többszörös mintázat aránya 24,6% volt hagyományos mikroszkópos értékelésnél és 34,6% EUROPattern automatizált analízis esetén, míg Li és munkatársai [146] 62,5%-os értéket kaptak a több mintázattal rendelkező minták gyakoriságára.

A számítógépes ANA mintázatfelismerő rendszerek megítélésének fő problémája az, hogy nincsenek megfelelő többszörös/kevert mintázatot mutató referenciamintáink, azaz olyan minták, melyek minden mintázata és azok titerre is pontosan ismert. A rutin diagnosztikából származó szérumminták nem felelnek meg ennek a célnak, mivel kevert mintázat esetén a hagyományos mikroszkópos ANA leolvasásban jártas szakértők sem tudnak pontos eredményt szolgáltatni. A probléma megoldása érdekében egy új megközelítést alkalmaztunk. Két különböző mintázatra izoláltan, magas titerben pozitív minta sorozathígításait készítettük el és kevertük össze, így jól definiált, ismert mintázatú és titerű kevert mintákat hoztunk létre. Ezeket a keverékeket HEp-2 IIF vizsgálatot végeztünk, és a két különböző mintázat jelenlétét és erősségét értékeltük az összes keverékben. A két ANA mintázat egymásra kifejtett hatását a leggyakoribb mintázatkombináció, a homogén magmintázat (AC-1) és a finomszemcsés magmintázat (AC-4) vizsgálatával kezdtük. Eredményeink azt mutatják, hogy a homogén magmintázat nagyobb mértékben akadályozza a finomszemcsés magmintázat megítélését, mint fordítva, de mindkét mintázat zavarja a másik felismerését. A kevert mintázatú minták jelentős részében a homogén mintázat akár teljesen el is fedheti, maszkolhatja a szemcsészet ugyanabban a mintában, és - bár sokkal ritkábban - az alacsony titerű homogén mintázat is teljesen rejtett maradhat egy magas titerű szemcsés mintázat mellett. Bizonyos esetekben az elfedett komponens láthatóvá válhat titrálással, azaz a minta hígításával, vagy - ideális esetben - a laboratóriumok megszüntethetik a zavaró mintázat hatását, ha antigén-specifikus immunoabszorpcióval eltávolítják a domináns autoantitestet.

Az ANA mintázatok közötti interferencia ismerete fontos ahhoz, hogy jól működő laboratóriumi kivizsgálási algoritmusokat alakíthassunk ki. Nemrégiben tettek közzé egy ANA vizsgálati protokollt, amely a másodvonalbeli autoantitest tesztek sorrendjére tesz javaslatot a HEp-2 sejteken észlelt mintázat alapján [147]. Mivel - eredményeink alapján - nem zárhatjuk ki a szemcsés magmintázat jelenlétét egy homogén mintázatra pozitív minta esetében és fordítva sem, mind a homogén (pl. dsDNS, hiszton elleni antitest), mind a szemcsés mintázatnak megfelelő (pl. anti-ENA) antigén-specifikus tesztek el kell végezni, ha az ANA mintázat titere egy adott szintet meghalad. A mintázatok közötti zavaró hatások megismerése segíthet a multiplex tesztpanelek kialakításában is. A mintázatok közötti interferenciával a kezelőorvosoknak is tisztában kell lenniük, a laboratóriumi specialisták a leletek véleményezésével segíthetik az ANA mintázatok értelmezését. A mintázat típusa és titere alapján az adott leletre specifikus megjegyzésekkel részletes információt lehet átadni arról, hogyan zavarhatja egy mintázat a másik azonosítását. Ez segíthet elkerülni a hibás diagnózis felállítását és csökkentheti a laboratóriumi kivizsgálás költségeit.

Az elfedés mellett érdekes módon bizonyos esetekben az interferáló antitest jelenléte fokozta a vizsgált mintázat intenzitását. Az erősítés statisztikailag is szignifikáns volt 1:1280 titerű homogén mintázat képernyőn végzett leolvasásánál, ha a zavaró szemcsés mintázat 1:320 titerű volt, de a tendencia több keverékben is megfigyelhető volt mind hagyományos, mind monitoron végzett értékelésnél. A homogén mintázat erősségének felülbecslése annak a következménye lehetett, hogy a szemcsés mintázat fluoreszcens fénye részben összeadódott a homogén mintázat jelével leolvasás közben. A jelenség a szemcsés mintázatnál interferáló homogén mintázat jelenlétében is megfigyelhető volt, de kevésbé kifejezetten, a felülbecslés egyik keverék esetén sem volt szignifikáns.

A különböző kevert homogén-szemcsés mintázatú minták értékelése során a hagyományos mikroszkópos és a képernyőn történő leolvasás nagyon hasonló eredményeket mutatott. Ugyanakkor a számítógépes képelemzésen alapuló minősítés önmagában gyengébb teljesítményt mutatott, a titerbecslés pedig még kevésbé volt pontos. Érdekes módon a homogén mintázat titerét az EPa gyakran túlbecsülte, míg a szemcsés mintázatnál alacsony titerek esetén felül-, magas titerek esetén alulmérés volt látható. Ezek az eredmények az mutatják, hogy a jelenlegi számítógépes mintázatfelismerő algoritmusok még kevert mintázatú mintáknál is viszonylag jól, de a hagyományos és képernyőn végzett humán értékelésnél rosszabbul azonosítják a mintázatot,

de a fluoreszcencia intenzitáson alapuló titerbecslés még nem igazán megbízható. Ez utóbbi felhívja a figyelmet arra, hogy a fluoreszcens mintázat erősségének meghatározása nem egyenlő egyszerű fényerősség méréssel, hiszen abban egy digitális kamera nyilvánvalóan jobb volna, mint az emberi szem.

Az ANA HEp-2 mintázatok közötti interferencia tanulmányozására kidolgozott megközelítésünk újnak mondható. A kevert minták használata természetesen nem új, de az antinukleáris antitest mintázatok egymásra kifejtett zavaró hatását ilyen szisztematikusan még nem vizsgálták. A szakirodalomban csak két tanulmányt találtunk, amely ANA mintázatok közötti interferenciával foglalkozik, de ezekben a tanulmányokban különböző mintázatokra erősen pozitív mintákat használtak (a titer meghatározása nélkül), majd azokat különböző arányokban keverték. Ráadásul ezeknek a tanulmányoknak nem az volt a céljuk, hogy az interferenciát elemezzék, hanem hogy kimutassák, hogy a monospecifikus és a más mintázattal együtt jelen lévő sűrű finomszemcsés magmintázat [dense fine speckled (DFS), AC-2] kiértékelése könnyebb egy speciális reagenssel, amely módosíthatatlan és DSF-70 knock-out HEp-2 sejtek keverékét tartalmazza [148], illetve, hogy a DFS mintázat felismerése problematikus egy másik ANA mintázat jelenlétében [149]. Vizsgálataink lényege ezzel szemben az volt, hogy olyan mintakeverékeket készítsünk, amelyekben két különböző ANA mintázat van jelen különböző, de ismert titerben, és összehasonlítsuk az elvárt és megfigyelt mintázat intenzitásokat. Ez nemcsak a mintázatok közötti interferencia észlelését tette lehetővé, hanem annak részletes elemzésére és jellemzésére is lehetőséget nyújtott. Ráadásul a kevert mintázatok számítógépes képelemzéssel és monitoron végzett értékelését össze tudtuk hasonlítani a konvencionális leolvasással. Tudomásunk szerint ezt a kísérleti elrendezést az ANA mintázatok közötti interferencia vizsgálatára más még nem alkalmazta.

Vizsgálatainknak van néhány korlátja. Először is, csak a két leggyakoribb ANA mintázat interferenciáját vizsgáltuk, a homogén nukleáris és finomszemcsés nukleáris mintázatot. Nagyon valószínű, hogy más ANA mintáztpárok egymásra kifejtett zavaró hatása eltérhet ettől. Másodszor, a két ANA-pozitív minta összekeverése megváltoztatja az idiotípus/antiidiotípus hálózatot, amely befolyásolhatja az autoantitestek reaktivitását, megváltoztatva a megfigyelt mintázatot. Harmadszor, az interferáló mintázatot tartalmazó mintából származó IgA és IgM osztályú antitestek - amit nem tudunk észlelni az anti-IgG-FITC konjugátummal - kapcsolódhatnak a HEp-2 sejtekhez és megváltoztathatják a vizsgált mintázatot okozó IgG osztályú autoantitestek

kötődését. Ezt a potencióális problémát el lehetne háritani IgG osztályú antitestek izolálásával és használatával. Negyedszer, betegmintákat használtunk, amelyeket standard homogén és finomszemcsés mintázatra pozitív készítményekkel lehetne helyettesíteni. Még tisztább megközelítés lehetne monoklonális antitestek (pl. anti-dsDNS és anti-Ro60) keverése, de ezzel nem humán antitestek közötti interferenciát vizsgálnánk. Ötödször, a kevert mintázatú mintákat csak egyféle HEp-2 ANA reagenskészlettel teszteltük.

8. Összefoglalás

Háttér: Az indirekt immunfluoreszcens teszt az egyik legrégebb óta autoantitestek kimutatására használt módszer. Számos előnye mellett hátránya, hogy a fluoreszcens képek kiértékelése bonyolult, időigényes feladat, mely a harmonizáció irányába tett lépések ellenére még mindig jelentős mértékben szubjektív. A kiértékelés automatizációja, számítógépes eljárások bevezetése a folyamat felgyorsítását, standardizálását, a variabilitás csökkentését, a szakértő idejének felszabadulását teheti lehetővé. A rutin diagnosztikába történő bevezetés feltétele viszont, hogy a számítógépes rendszer új eljárásai által nyújtott lehetőségeket és korlátokat megismerjük, az új kiértékelési módokat karakterizáljuk és összevessük az eddig használt hagyományos értékeléssel.

Módszerek: Vizsgálatainkban a EUROPattern fluoreszcens mikroszkópot használtuk antinukleáris (ANA) és anti-neutrophil citoplazmatikus antitest (ANCA) indirekt immunfluoreszcens tesztek számítógéppel támogatott kiértékelésére. Az ANCA diagnosztika területén kísér-gyulladásban, autoimmun betegségben és más gyulladásos kórállapot gyanúja vagy követése miatt a laboratóriumunkba küldött rutin minták sorozatán hasonlítottuk össze a képelemző és mintázatfelismerő algoritmus (EPa), illetve a képernyőn végzett értékelés eredményeit a hagyományos mikroszkópos kiértékeléssel. Az ANA vizsgálatok területén a HEp-2 sejteken látható autoantitest mintázatok közötti interferenciát vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a különböző értékelési eljárásokat.

Eredmények: Az ANCA minták értékelése során mind a mintázatfelismerés, mind a mintázat intenzitásának reprodukálhatóságát megfelelőnek találtuk. A kép fényintenzitásán alapuló számítógépes titerbecslés 1:80 feletti értékeknél viszont nem mutatott lineáris összefüggést a végponti titerrel, erős pozitív C-ANCA mintáknál néhány esetben ráadásul jelentős alábecslést adott. Az 568 minta esetén összességében 86,1%-ban, negatív mintáknál 81,8%-ban, nemnegatív mintáknál 96,4%-ban adta meg a minősítést a képelemző algoritmus a hagyományos mikroszkópos leolvasásnak megfelelően. Képernyőn történő leolvasásnál a teljes konkordancia 96,7%, míg az egyezés aránya a negatív és a nemnegatív esetek körében 95,3%, illetve 100% volt. Az ANCA mintázatot az EPa 69,0%-ban, a képernyőn végzett értékelés 95,1%-ban sorolta be helyesen.

A két leggyakoribb ANA mintázat egyidejű jelenléte esetén jelentős interferencia kialakulását demonstráltuk. A finomszemcsés magmintázat zavarja a homogén magmintázat felismerését, és fordítva. A homogén mintázat zavaró hatása miatt az esetek döntő többségében a szemcsés mintázat nem is látható, ha titere alacsonyabb, mint a homogén mintázaté. Egy második mintázat

jelenlétében mind a homogén, mind a szemcsés mintázat felismerése és erősségének megítélése képernyőn végzett értékelésnél hasonló, számítógépes képelemzéssel rosszabb, mint hagyományos leolvasással.

Következtetés: A EUROPattern automatizált mikroszkópos rendszer ANA és ANCA tesztek esetén is alkalmas indirekt immunfluoreszcens lemezek humán értékelő által képernyőn végzett, számítógéppel támogatott kiértékelésére. Önállóan, felhasználói ellenőrzés nélkül az általunk vizsgált verziójú képelemző algoritmus nem használható eredmények kiadására, mivel rutin ANCA kivizsgálásra érkező és kevert ANA mintázattal rendelkező mintáknál mind a pozitív-negatív minősítés, mind a mintázatfelismerés terén teljesítményben elmaradt a referencia módszernek tekintett hagyományos mikroszkópos leolvasástól. Az egyetlen mintahígítás fluoreszcencia intenzitásából becsült titer meghatározás nem váltja ki a sorozathígításon alapuló titrálást. Az automatizált fluoreszcens mikroszkópok alkalmazásával elkerülhető a sötétszobában folyó munka, a papír alapú munkalisták használata, gyorsabbá tehető a kiértékelés és lehetséges a mintázatról készült képek eltárolása.

9. Summary

Background: The indirect immunofluorescence test is one of the oldest methods used to detect autoantibodies. It has many benefits, but the interpretation of fluorescence images is a complex, time-consuming task, which is still considered markedly subjective, despite the steps towards harmonisation. Automation, computerised procedures can increase throughput, reduce variability of results and workload of expert. However, the introduction of computer-aided techniques into routine diagnostics requires that the possibilities and limitations of the new procedures be understood and compared with the conventional evaluation means.

Methods: In these studies, we used the EUROPattern fluorescence microscope for computer-assisted evaluation of indirect immunofluorescence assays in antinuclear (ANA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) testing. In the field of ANCA diagnostics, we compared the results of image analysis and pattern recognition algorithm (EPa) and on-screen evaluation with conventional microscopic evaluation on a series of routine diagnostic or follow-up samples of patients with small-vessel inflammation, autoimmune disease and other inflammatory disease states sent to our laboratory. In the ANA study, we investigated the interference between HEp-2 ANA patterns and compared the evaluation modalities.

Results: We found reproducibility of ANCA pattern recognition and intensity estimation suitable. At the same time, relationship of single well titer estimation and end-point titer was not linear above 1:80, even significant underestimation occurred in case of strong C-ANCA positivity. Total agreement of image analysis algorithm with the conventional evaluation was 86.1% for all (568) samples, 81.8% for negative samples and 96.4% for non-negative samples. Overall concordance was 96.7% for on-screen readings, while agreement rates for negative and non-negative cases were 95.3% and 100%, respectively. Rate of correct classification of ANCA patterns was 69.0% by EPa and 95.1% during on-screen evaluation.

Significant interference between ANA patterns was demonstrated if homogeneous and fine speckled nuclear patterns were present in the sample at the same time. Fine speckled pattern interferes with the recognition of homogeneous pattern, and vice versa. Due to the influence of the homogeneous pattern, the speckled pattern is not even visible in the vast majority of cases if its titer is lower than that of the homogeneous pattern. Quality of on-screen recognition and intensity estimation of patterns is similar to conventional evaluation, but computer-assisted image analysis by itself is inferior.

Conclusion: The EUROPattern automated microscope system is suitable for interpretation of ANA and ANCA indirect immunofluorescence slides if performed by an observer on the computer screen. Without validation of the user, the image analysis algorithm – at least the version used in our laboratory - cannot be used to report results, as it appeared to be inferior both for positive-negative classification and pattern recognition on sera with mixed ANA patterns and samples sent for routine ANCA testing, as compared to conventional reading. Titer estimation based on fluorescence intensity of a single well cannot substitute traditional titration. The use of automated fluorescence microscopes makes darkrooms and paper worklists unnecessary, while providing faster evaluation and storage of fluorescence images.

10. Az új eredmények összefoglalása

I. Az ANCA IIFT hagyományos, EUROPattern számítógépes képelemzéssel, illetve képernyőn végzett értékelésének összehasonlítása:

1. A mintázatok minősítésének és erősségének reprodukálhatósága megfelelő volt, a háromféle értékelés között jelentős eltérés nem volt.
2. A végponti titer becslés nem volt lineáris az eljárás mérési tartományán belül, ráadásul C-ANCA mintázatnál erősen pozitív mintáknál magas dózis hook-effektus is előfordult.
3. Az automatizált képelemzéses és a hagyományos értékelés között jelentős eltérés volt mind a minták minősítését, mind az osztályozását illetően, ezért a számítógépes algoritmus eredményei felhasználó ellenőrzés nélkül nem adhatók ki. A helytelen kvalitatív értékelés oka leggyakrabban negatív minták határérték pozitív atípusos ANCA-nak minősítése volt. A helytelen mintázatfelismerést többségében az ANA/ACyA pozitív minták nem megfelelő csoportba sorolása okozta.
4. A képernyőn végzett értékelés nagyon jó egyezést mutatott a referenciaként használt konvencionális mikroszkópos értékeléssel.

II. Az ANA mintázatok közötti zavaró hatás vizsgálata, a számítógéppel támogatott kiértékelési módok összehasonlítása:

1. A Laboratóriumi Medicina Intézetbe HEp-2 IIF vizsgálatra küldött minták körében gyakori, hogy egyszerre egynél több ANA mintázat látható, leggyakrabban a homogén és a szemcsés magmintázatok fordulnak elő együtt.
2. Kevert mintázatú mintáknál a homogén mintázat zavarja a szemcsés mintázatot és fordítva. A homogén mintázat zavaró hatása a nagyobb mértékű.
3. Zavaró második mintázat mellett a vizsgált mintázat felismerése és erősségének megítélése képernyőn végzett értékeléssel hasonló, számítógépes képelemzéssel rosszabb, mint hagyományos leolvasással.

11. Tárgyszavak

Autoimmun betegségek

Autoimmune diseases

Indirekt immunfluoreszcens teszt

Indirect immunofluorescence assay

Anti-neutrofil citoplazmatikus antitest

Anti-nuclear cytoplasmic antibody

Antinukleáris antitest

Antinuclear antibody

Automatizált mintázatfelismerés

Automated pattern recognition

Etanollal fixált granulocita

Ethanol-fixed granulocyte

HEp-2 indirekt immunfluoreszcens teszt

HEp-2 indirect immunofluorescence assay

Interferencia

Interference

Kevert mintázat

Mixed patterns

Számítógéppel támogatott

Computer-assisted

Számítógéppel segített

Computer-aided

Többszörös mintázat

Multiple patterns

12. Irodalomjegyzék

12.1. Hivatkozások

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunologic tolerance and autoimmunity. In: Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Elsevier Inc.; 2021. p. 337-65.
2. Davidson A, Diamond B. General features of autoimmune disease. In: Rose NR, Mackay IR, editors. The Autoimmune Diseases. 6th ed. London, United Kingdom: Academic Press; 2020. p. 17-45.
3. Goodnow CC, Sprent J, de St Groth BF, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature. 2005 Jun 2,;435(7042):590-7.
4. Wahren-Herlenius M, Dorner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. The Lancet (British edition). 2013 Aug 31,;382(9894):819-31.
5. Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity. Current opinion in immunology. 2011 Dec 1,;23(6):721-31.
6. Voight BF, Cotsapas C. Human genetics offers an emerging picture of common pathways and mechanisms in autoimmunity. Current opinion in immunology. 2012 Oct 1,;24(5):552-7.
7. McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. PLoS medicine. 2006 Aug 1,;3(8):e297.
8. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. Autoimmunity (Chur, Switzerland). 2008 Mar;41(2):123-32.
9. Conrad N, Misra S, Verbakel JY, Verbeke G, Molenberghs G, Taylor PN, et al. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: A population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. The Lancet (British edition). 2023 Jun 3,;401(10391):1878-90.
10. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. Autoimmunity reviews. 2012 Aug 1,;11(10):754-65.
11. Cooper GS, Bynum MLK, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. Journal of autoimmunity. 2009 Nov 1,;33(3):197-207.

12. Casali P, Elkon K. Nature and functions of autoantibodies. *Nature clinical practice. Rheumatology*. 2008 Sep 1,;4(9):491-8.
13. Yehuda Shoenfeld, Pier Luigi Meroni, M. Eric Gershwin, M.E. Gershwin, Y. Shoenfeld / Yehuda Shoenfeld, Pier Luigi Meroni, M. Eric Gershwin, M.E. Gershwin, Yehuda Shoenfeld. *Autoantibodies*. 2nd ed. ; 2011.
14. Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunology today (Amsterdam. Regular ed.)*. 1991 Apr 1,;12(4):105-10.
15. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of immunological methods*. 1998 Jul 1,;216(1):117-37.
16. Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/european league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*. 2013 Nov;65(11):2737-47.
17. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 european league against rheumatism/american college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*. 2019 Sep;71(9):1400-12.
18. Suppiah R, Robson JC, Grayson PC, Judge A, Hutchings A, Luqmani RA, et al. 2022 american college of rheumatology/european alliance of associations for rheumatology classification criteria for microscopic polyangiitis. *Ann Rheum Dis*. 2022 Mar;81(3):321-6.
19. Nagy G. Laboratóriumi vizsgálatok. In: Szekanecz Z, Nagy G, editors. *Reumatológia*. Budapest: Medicina; 2019. p. 87-99.
20. Yong WH. An introduction to performing immunofluorescence staining. In: *Biobanking*. United States: Springer; 2019. p. 299-311.
21. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: An old test with new recommendations. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010 Aug 1,;69(8):1420-2.
22. Buchner C, Bryant C, Eslami A, Lakos G. Anti-nuclear antibody screening using HEP-2 cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2014 Jun 23,(88):e51211.
23. James W. Goding. 12 - immunofluorescence. In: *Monoclonal Antibodies*. Third Edition ed. ; 1996. p. 352-99.

24. Tozzoli R, Antico A, Porcelli B, Bassetti D. Automation in indirect immunofluorescence testing: A new step in the evolution of the autoimmunology laboratory. *Autoimmunity highlights*. 2012 Aug 1,;3(2):59-65.
25. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. *Fluorescence microscopy*. Cold Spring Harbor protocols. 2014 Oct 1,;2014(10):pdb.top071795.
26. Manivannan S, Li W, Akbar S, Wang R, Zhang J, McKenna SJ. An automated pattern recognition system for classifying indirect immunofluorescence images of HEp-2 cells and specimens. *Pattern recognition*. 2016 Mar;51:12-26.
27. Rahman S, Wang L, Sun C, Zhou L. Deep learning based HEp-2 image classification: A comprehensive review. *Medical image analysis*. 2020 Oct 1,;65:101764.
28. Foggia P, Percannella G, Soda P, Vento M. Benchmarking HEp-2 cells classification methods. *TMI*. 2013 Oct 1,;32(10):1878-89.
29. Rodrigues LF, Naldi MC, Mari JF. Comparing convolutional neural networks and preprocessing techniques for HEp-2 cell classification in immunofluorescence images. *Computers in biology and medicine*. 2020 Jan 1,;116:103542.
30. Wu Y, Sheu R, Chung C, Wu Y, Ou C, Hsiao C, et al. Application of supervised machine learning to recognize competent level and mixed antinuclear antibody patterns based on ICAP international consensus. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Apr 1,;11(4):642.
31. Benammar Elgaaied A, Cascio D, Bruno S, Ciaccio MC, Cipolla M, Fauci A, et al. Computer-assisted classification patterns in autoimmune diagnostics: The AIDA project. *BioMed research international*. 2016 Jan 1,;2016:2073076-9.
32. Merone M, Sansone C, Soda P. A computer-aided diagnosis system for HEp-2 fluorescence intensity classification. *Artificial intelligence in medicine*. 2019 Jun;97:71-8.
33. Perner P, Perner H, Müller B. Mining knowledge for HEp-2 cell image classification. *Artificial intelligence in medicine*. 2002 Sep 1,;26(1):161-73.
34. Cheng C, Lu C, Hsieh T, Lin Y, Taur J, Chen Y. Design of a computer-assisted system to automatically detect cell types using ANA IIF images for the diagnosis of autoimmune diseases. *J Med Syst*. 2015 Oct 1,;39(10):314.
35. Sack U, Knoechner S, Warschkau H, Pigla U, Emmrich F, Kamprad M. Computer-assisted classification of HEp-2 immunofluorescence patterns in autoimmune diagnostics. *Autoimmunity reviews*. 2003 Sep 1,;2(5):298-304.

36. Weiner M, Segelmark M. The clinical presentation and therapy of diseases related to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity reviews*. 2016 Oct 1;15(10):978-82.
37. Savige J, Trevisin M, Pollock W. Testing and reporting antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in treated vasculitis and non-vasculitic disease. *Journal of immunological methods*. 2018 Jul;458:1-7.
38. BARTUONKOVA J, TESAR V, SEDIVA A. Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 2003 Feb 1;106(2):73-82.
39. Folci M, Ramponi G, Solitano V, Brunetta E. Serum ANCA as disease biomarkers: Clinical implications beyond vasculitis. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2022 Oct;63(2):107-23.
40. Moiseev S, Cohen Tervaert JW, Arimura Y, Bogdanos DP, Csernok E, Damoiseaux J, et al. 2020 international consensus on ANCA testing beyond systemic vasculitis. *Autoimmunity reviews*. 2020 Sep 1;19(9):102618.
41. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis and rheumatism*. 2013 Jan;65(1):1-11.
42. Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, et al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007 Feb 1;66(2):222-7.
43. Kallenberg C. Usefulness of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in diagnosing and managing systemic vasculitis. *Current opinion in rheumatology*. 2016 Jan;28(1):8-14.
44. Comarmond C, Pagnoux C, Khellaf M, Cordier J, Hamidou M, Viallard J, et al. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): Clinical characteristics and long-term followup of the 383 patients enrolled in the french vasculitis study group cohort. *Arthritis and rheumatism*. 2013 Jan;65(1):270-81.
45. Bossuyt X, Cohen Tervaert J, Arimura Y, Blockmans D, Flores-Suárez LF, Guillevin L, et al. Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nature reviews. Rheumatology*. 2017 Nov 1;13(11):683-92.
46. Damoiseaux J, Csernok E, Rasmussen N, Moosig F, van Paassen P, Baslund B, et al. Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCAs): A multicentre european vasculitis study group

- (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017 Apr 1,;76(4):647-53.
47. File I, Pucsok K, Trinn C, Ujhelyi L, Balla J, Mátyus J. Clinical consequence and significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibody positivity in anti-glomerular basement membrane disease. *Orvosi hetilap*. 2013 Oct 1,;154(43):1696-701.
48. McAdoo SP, Tanna A, Hrušková Z, Holm L, Weiner M, Arulkumaran N, et al. Patients double-seropositive for ANCA and anti-GBM antibodies have varied renal survival, frequency of relapse, and outcomes compared to single-seropositive patients. *Kidney international*. 2017 Sep 1,;92(3):693-702.
49. Mahler M, Bogdanos DP, Pavlidis P, Fritzler MJ, Csernok E, Damoiseaux J, et al. PR3-ANCA: A promising biomarker for ulcerative colitis with extensive disease. *Clinica chimica acta*. 2013 Sep 23,;424:267-73.
50. Lee W, Subramaniam K, Hawkins CA, Randall KL. The significance of ANCA positivity in patients with inflammatory bowel disease. *Pathology*. 2019 Oct 1,;51(6):634-9.
51. Zhou G, Song Y, Yang W, Guo Y, Fang L, Chen Y, et al. ASCA, ANCA, ALCA and many more: Are they useful in the diagnosis of inflammatory bowel disease? *Digestive diseases (Basel)*. 2016 Jan 1,;34(1-2):90-7.
52. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, et al. Anti-saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: Prevalence and diagnostic role. *Gut*. 1998 Jun;42(6):788-91.
53. Zhou F, Xia B, Wang F, Shrestha UK, Chen M, Wang H, et al. The prevalence and diagnostic value of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-saccharomyces cerevisiae antibodies in patients with inflammatory bowel disease in mainland china. *Clinica chimica acta*. 2010 Oct 9,;411(19):1461-5.
54. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International autoimmune hepatitis group report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. 1999 Nov 1,;31(5):929-38.
55. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Autoimmunity reviews*. 2014 Apr 1,;13(4):435-40.

56. Sposito F, McNamara PS, Hedrich CM. Vasculitis in cystic fibrosis. *Frontiers in pediatrics*. 2020 Nov 12;8:585275.
57. Iwuji K, Larumbe-Zabala E, Bijlani S, Nugent K, Kanu A, Manning E, et al. Prevalence of bactericidal/permeability-increasing protein autoantibodies in cystic fibrosis patients: Systematic review and meta-analysis. *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*. 2019 Jun 1;32(2):45-51.
58. Vornicu A, Obrișcă B, Sorohan B, Berechet A, Ismail G. Anca-associated vasculitis in a hiv-infected patient: A case based-review. 2023 Jan 13,.
59. Koderisch J, Andrassy K, Rasmussen N, Hartmann M, Tilgen W. "False-positive" anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in HIV infection. *The Lancet (British edition)*. 1990 May 19;335(8699):1227-8.
60. Van Gool IC, Kers J, Bakker JA, Rotmans JI, Teng YKO, Bauer MP. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in infective endocarditis: A case report and systematic review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2022 Oct 1;41(10):2949-60.
61. Pan H, Fang X, Wu G, Li W, Zhao X, Li X, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in new-onset systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Inflammation*. 2008 Aug 1;31(4):260-5.
62. Sen D, Isenberg DA. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2003 Jan 1;12(9):651-8.
63. Wang Y, Yu X, Xie X, Li H, Yang W, Liang Y, et al. Clinical features and outcomes of patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-positive systemic lupus erythematosus. *Renal failure*. 2023 Dec;45(1):2235431.
64. COREMANS IEM, HAGEN EC, VAN DER VOORT EAM, VAN DER WOUDE FJ, DAHA MR, BREEDVELD FC. Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in felty's syndrome. *Clinical and experimental rheumatology*. 1993 May 1;11(3):255-62.
65. Tur BS, Süldür N, Ataman Ş, Tutkak H, Atay MB, Düzgün N. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with rheumatoid arthritis: Clinical, biological, and radiological correlations. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2004 May 1;71(3):198-202.
66. Culerrier J, Nguyen Y, Karadag O, Yasar Bilge S, Yildirim TD, Ögüt TS, et al. Characteristics and outcome of ANCA-associated vasculitides induced by anti-thyroid drugs: A multicentre retrospective case-control study. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2023 Jun 24,.

67. Weng C, Liu Z. Drug-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Chinese medical journal*. 2019 Dec 5,;132(23):2848-55.
68. Damoiseaux J. ANCA testing in clinical practice: From implementation to quality control and harmonization. *Frontiers in immunology*. 2021 Mar 16,;12:656796.
69. SAVIGE J, GILLIS D, POLLOCK W, PUSEY C, SAVAGE COS, SILVESTRINI R, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *American journal of clinical pathology*. 1999 Apr 1,;111(4):507-13.
70. SAVIGE J, DIMECH W, WIJK A, WONG R, FRITZLER M, GOEKEN J, et al. Addendum to the international consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies: Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *American journal of clinical pathology*. 2003 Sep 1,;120(3):312-8.
71. Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): How to test for ANCA — evidence-based immunology? *Autoimmunity highlights*. 2010 May 1,;1(1):39-43.
72. Lin M, Silvestrini RA, Culican S, Campbell D, Fulcher DA. A dual-fixed neutrophil substrate improves interpretation of antineutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. *American journal of clinical pathology*. 2014 Sep;142(3):325-30.
73. Ling M, Murali M. Antinuclear antibody tests. *Clinics in laboratory medicine*. 2019 Dec 1,;39(4):513-24.
74. Bossuyt X, De Langhe E, Borghi MO, Meroni PL. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology*. 2020 Dec 1,;16(12):715-26.
75. Sirotti S, Generali E, Ceribelli A, Isailovic N, De Santis M, Selmi C. Personalized medicine in rheumatology: The paradigm of serum autoantibodies. *Autoimmunity highlights*. 2017 Dec 1,;8(1):10.
76. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmunity reviews*. 2011 Oct 1,;10(12):801-8.
77. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Archives of pathology & laboratory medicine (1976)*. 2000 Jan 1,;124(1):71-81.

78. Wiik AS. Anti-nuclear autoantibodies: Clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2005;34(4):260-8.
79. Narciso-Schiavon J, Freire FC, Suarez M, Ferrari MV, Scanhola G, Schiavon L, et al. Antinuclear antibody positivity in patients with chronic hepatitis C: Clinically relevant or an epiphenomenon? *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2009 Apr;21(4):350-6.
80. Im JH, Chung M, Park YK, Kwon HY, Baek JH, Lee SY, et al. Antinuclear antibodies in infectious diseases. *Infectious diseases (London, England)*. 2020 Mar 3;52(3):177-85.
81. de Castro GLC, da Silva Graça Amoras E, Araújo MS, da Silva Conde SRS, Bichara CDA, Queiroz MAF, et al. High prevalence of antinuclear antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *European journal of medical research*. 2022 Sep 16;27(1):1-180.
82. Gazzaruso C, Carlo Stella N, Mariani G, Nai C, Coppola A, Naldani D, et al. High prevalence of antinuclear antibodies and lupus anticoagulant in patients hospitalized for SARS-CoV2 pneumonia. *Clin Rheumatol*. 2020 Jul 1;39(7):2095-7.
83. Bossuyt X, Vulsteke J, Van Elslande J, Boon L, Wuyts G, Willebrords S, et al. Antinuclear antibodies in individuals with COVID-19 reflect underlying disease: Identification of new autoantibodies in systemic sclerosis (CDK9) and malignancy (RNF20, RCC1, TRIP13). *Autoimmunity reviews*. 2023 Apr 1;22(4):103288.
84. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine*. 2003 Oct 16;349(16):1526-33.
85. Saurenmann RK, Levin AV, Feldman BM, Rose JB, Laxer RM, Schneider R, et al. Prevalence, risk factors, and outcome of uveitis in juvenile idiopathic arthritis: A long-term followup study. *Arthritis and rheumatism*. 2007 Feb;56(2):647-57.
86. Li H, Zheng Y, Chen L, Lin S. High titers of antinuclear antibody and the presence of multiple autoantibodies are highly suggestive of systemic lupus erythematosus. *Scientific reports*. 2022 Feb 1;12(1):1687.
87. Bossuyt X, Claessens J, Belmonto T, De Langhe E, Westhovens R, Poesen K, et al. Harmonization of clinical interpretation of antinuclear antibody test results by solid phase assay and by indirect immunofluorescence through likelihood ratios. *Autoimmunity reviews*. 2019 Nov 1;18(11):102386.

88. Prado MS, Dellavance A, Rodrigues SH, Marvulle V, Andrade LEC. Changes in the result of antinuclear antibody immunofluorescence assay on HEp-2 cells reflect disease activity status in systemic lupus erythematosus. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2020 Jul 28,;58(8):1271-81.
89. HARGRAVES MM, RICHMOND H, MORTON R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic*. 1948 Jan 21,;23(2):25-8.
90. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *BMJ*. 1957 Sep 28,;2(5047):732-4.
91. Irure-Ventura J, López-Hoyos M. The past, present, and future in antinuclear antibodies (ANA). *Diagnostics (Basel)*. 2022 Mar 7,;12(3):647.
92. BOSSUYT X, MEURS L, MEWIS A, MARIËN G, BLANCKAERT N. Screening for autoantibodies to SS-A/ro by indirect immunofluorescence using HEp-2000 cells. *Annals of clinical biochemistry*. 2000 Mar 1,;37:216-9.
93. Rohwäder E, Locke M, Fraune J, Fechner K. Diagnostic profile on the IFA 40: HEp-20-10 - an immunofluorescence test for reliable antinuclear antibody screening. *Expert review of molecular diagnostics*. 2015 Apr 1,;15(4):451-62.
94. Damoiseaux J, Tervaert JWC, Derksen R, Hamann D, Hooijkaas H, Klasen I, et al. Autoantibody standardization in the netherlands. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009 Sep 1,;1173(1):10-4.
95. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N. Challenges in the standardization of autoantibody testing: A comprehensive review. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2017 Aug 1,;53(1):68-77.
96. Damoiseaux J. The perspective on standardisation and harmonisation: The viewpoint of the EASI president. *Autoimmunity highlights*. 2020 Feb 6,;11(1):4.
97. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *Journal of autoimmunity*. 2010 Nov 1,;35(3):276-90.
98. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in immunology*. 2015 Aug 20,;6:412.

99. International consensus on HEp-2 ANA patterns [Internet].; cited Jan 21, 2024]. Available from: www.anapatterns.org.
100. Herold M, Klotz W, Andrade LEC, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J, et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: Defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2018 Sep 25,;56(10):1799-802.
101. Chan EKL, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, et al. Report on the second international consensus on ANA pattern (ICAP) workshop in dresden 2015. *Lupus*. 2016 Jul;25(8):797-804.
102. Bonroy C, Vercammen M, Fierz W, Andrade LEC, Van Hoovels L, Infantino M, et al. Detection of antinuclear antibodies: Recommendations from EFLM, EASI and ICAP. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2023 Jun 27,;61(7):1167-98.
103. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: The international consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019 Jul 1,;78(7):879-89.
104. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as antinuclear antibodies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(1):17-23.
105. Vercammen M, Bonroy C, Broeders S, Chan EKL, Bizzaro N, Bogdanos DP, et al. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by HEp-2 indirect immunofluorescence: EFLM report on an international survey. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2023 Jun 27,;61(7):1199-208.
106. Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassetti D, Pesente F, et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: A comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmunity reviews*. 2014 Mar 1,;13(3):292-8.
107. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: Strengths and limitations. *BMC medicine*. 2014 Mar 3,;12(1):38.
108. Van den Breemt S, Schouwers S, Van Blerk M, Van Hoovels L. ANA IIF automation: Moving towards harmonization? results of a multicenter study. *Journal of Immunology Research*. 2017 Jan 1,;2017:6038137-7.

109. Cruvinel WdM, Andrade LEC, Dellavance A, Ximenes AC, Bichara CDA, Manguiera CLP, et al. VI brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on HEp-2 cells. *Advances in rheumatology* (London, England). 2022 Sep 7;62(1):34.
110. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; approved guideline. 2003 Apr 1,.
111. Tholen DW. Evaluation of linearity in the clinical laboratory. *Archives of pathology & laboratory medicine* (1976). 2004 Oct 1;128(10):1078; author reply 1078-48.
112. Vermeersch P, Vervaeke S, Blockmans D, van Hoovels L, Mariën G, Vanmaele H, et al. Determination of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in small vessel vasculitis: Comparative analysis of different strategies. *Clinica chimica acta*. 2008 Nov 1;397(1):77-81.
113. Monogioudi E, Sheldon J, Meroni PL, Hutu DP, Schimmel H, Zegers I. Certified reference material against PR3 ANCA IgG autoantibodies. from development to certification. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2019 Jul 26;57(8):1197-206.
114. Sheldon J. Developments in laboratory testing for autoimmune diseases. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2018 May 24;56(6):865-8.
115. Bossuyt X, Rasmussen N, van Paassen P, Hellmich B, Baslund B, Vermeersch P, et al. A multicentre study to improve clinical interpretation of proteinase-3 and myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Rheumatology* (Oxford, England). 2017 Sep 1;56(9):1633-541.
116. Wu S, Wang F, Huang J, Yin B, Huang M, Wei W, et al. Evaluation of the automated indirect immunofluorescence test for anti-dsDNA antibodies. *Clinica chimica acta*. 2019 Nov 1;498:143-7.
117. Krause C, Ens K, Fechner K, Voigt J, Fraune J, Rohwäder E, et al. EUROPattern suite technology for computer-aided immunofluorescence microscopy in autoantibody diagnostics. *Lupus*. 2015 Apr 1;24(4-5):516-29.
118. LINDER E, MIETTINEN A. Prozone effects in indirect immunofluorescence. *Scandinavian journal of immunology*. 1976 Jan 1;5(5):513-9.
119. Dubois-Galopin F, Beauvillain C, Dubois D, Pillet A, Renier G, Jeannin P, et al. New markers and an old phenomenon: Prozone effect disturbing detection of filaggrin (keratin) autoantibodies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007 Aug 1;66(8):1121-2.
120. Watad A, Bragazzi NL, Sharif K, Gilburd B, Yavne Y, McGonagle D, et al. Borderline positive antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-PR3/MPO detection in a large cohort

tertiary center: Lessons learnt from a real-life experience. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2018 May 24,;56(6):947-53.

121. Csernok E, Damoiseaux J, Rasmussen N, Hellmich B, van Paassen P, Vermeersch P, et al. Evaluation of automated multi-parametric indirect immunofluorescence assays to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in granulomatosis with polyangiitis (GPA) and microscopic polyangiitis (MPA). *Autoimmunity reviews*. 2016 Jul 1,;15(7):736-41.

122. Shovman O, Agmon-Levin N, Gilburd B, Martins T, Petzold A, Matthias T, et al. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Immunol Res*. 2015 Feb 1,;61(1-2):135-40.

123. Shovman O, Agmon-Levin N, Gilburd B, Martins T, Petzold A, Matthias T, et al. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Immunol Res*. 2015 Feb 1,;61(1-2):135-40.

124. Sowa M, Trezzi B, Hiemann R, Schierack P, Grossmann K, Scholz J, et al. Simultaneous comprehensive multiplex autoantibody analysis for rapidly progressive glomerulonephritis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Nov 1,;95(44):e5225.

125. Sowa M, Grossmann K, Knütter I, Hiemann R, Röber N, Anderer U, et al. Simultaneous automated screening and confirmatory testing for vasculitis-specific ANCA. *PloS one*. 2014 Sep 16,;9(9):e107743.

126. Melegari A, Bonaguri C, Russo A, Luisita B, Trenti T, Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmunity reviews*. 2012 Aug 1,;11(10):713-6.

127. Knütter I, Hiemann R, Brumma T, Büttner T, Großmann K, Cusini M, et al. Automated interpretation of ANCA patterns - a new approach in the serology of ANCA-associated vasculitis. *Arthritis research & therapy*. 2012 Dec 14,;14(6):R271.

128. Damoiseaux J, Mallet K, Vaessen M, Austen J, Cohen Tervaert JW. Automatic reading of ANCA-slides: Evaluation of the AKLIDES system. *Clinical & developmental immunology*. 2012 Jan 1,;2012:762874-7.

129. Mathiaux F, Barrot A, Elong C, Parent X. Evaluation of an automated system of immunofluorescence analysis in daily practice. *Annales de biologie clinique (Paris)*. 2018 Aug 1,;76(4):407-15.

130. Turan Faraşat V, Ecemiş T, Doğan Y, Şener AG, Terek Ece G, DüNDAR PE, et al. A multicenter analysis of subjectivity of indirect immunofluorescence test in antinuclear antibody screening. *Archives of rheumatology*. 2019 Sep 1,;34(3):326-33.
131. Rigon A, Infantino M, Merone M, Iannello G, Tincani A, Cavazzana I, et al. The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: A multicenter evaluation and a review of the literature. *Autoimmunity reviews*. 2017 Dec;16(12):1224-9.
132. Looock CD, Egerer K, Feist E, Burmester G. Automated evaluation of ANA under real-life conditions. *Rheumatic & musculoskeletal diseases open*. 2017 Apr 1,;3(1):e000409.
133. Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, Weyer M, Büttner T, Radau B, et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis research & therapy*. 2010 Jan 1,;12(2):R40.
134. Park Y, Kim SY, Kwon GC, Koo SH, Kang E, Kim J. Automated versus conventional microscopic interpretation of antinuclear antibody indirect immunofluorescence test. *Annals of clinical and laboratory science*. 2019 Jan 1,;49(1):127-33.
135. Yoo IY, Oh JW, Cha HS, Koh EM, Kang ES. Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer. *Annals of laboratory medicine*. 2017 May 1,;37(3):240-7.
136. Ricchiuti V, Adams J, Hardy DJ, Katayev A, Fleming JK. Automated processing and evaluation of anti-nuclear antibody indirect immunofluorescence testing. *Frontiers in immunology*. 2018 May 4,;9:927.
137. Daves M, Blecken J, Matthias T, Frey A, Perkmann V, Dall' Acqua A, et al. New automated indirect immunofluorescent antinuclear antibody testing compares well with established manual immunofluorescent screening and titration for antinuclear antibody on HEp-2 cells. *Immunol Res*. 2017 Feb 1,;65(1):370-4.
138. Depincé-Berger AE, Moreau A, Bossy V, Genin C, Rinaudo M, Paul S. Comparison of screening dilution and automated reading for antinuclear antibody detection on HEP2 cells in the monitoring of connective tissue diseases. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2016 Sep;30(5):471-8.
139. Zheng B, Li E, Zhu H, Lu J, Shi X, Zhang J, et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody analysis is a reliable approach in routine clinical laboratories. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017 Oct 26,;55(12):1922-30.

140. Alsuwaidi M, Dollinger M, Fleck M, Ehrenstein B. The reliability of a novel automated system for ANA immunofluorescence analysis in daily clinical practice. *International Journal of Rheumatology*. 2016 Jan 1,;2016:6019268-5.
141. Bonroy C, Verfaillie C, Smith V, Persijn L, De Witte E, De Keyser F, et al. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2014 Nov 19,;52(11):1677.
142. Copple SS, Jaskowski TD, Giles R, Hill HR. Interpretation of ANA indirect immunofluorescence test outside the darkroom using NOVA view compared to manual microscopy. *Journal of Immunology Research*. 2014 Jan 1,;2014:149316-7.
143. Wu S, Liu F, Wang F, Huang J, Yin B, Huang M, et al. Evaluation of the automated indirect immunofluorescence test for antinuclear antibodies. *Annals of clinical and laboratory science*. 2020 Mar 1,;50(2):282-6.
144. Choi H, Kwon YJ, Park J, Lee S, Chun S, Won EJ, et al. Evaluation of a fully automated antinuclear antibody indirect immunofluorescence assay in routine use. *Frontiers in immunology*. 2020 Dec 4,;11:607541.
145. van Beers JJBC, Hahn M, Fraune J, Mallet K, Krause C, Hormann W, et al. Performance analysis of automated evaluation of antinuclear antibody indirect immunofluorescent tests in a routine setting. *Autoimmunity highlights*. 2018 Dec 1,;9(1):8.
146. Li Z, Han R, Yan Z, Li L, Feng Z. Antinuclear antibodies detection: A comparative study between automated recognition and conventional visual interpretation. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2019 Jan;33(1):e22619,n/a.
147. Infantino M, Carbone T, Manfredi M, Grossi V, Antico A, Panozzo MP, et al. A new diagnostic algorithm for pattern-oriented autoantibody testing according to the ICAP nomenclature: A pilot study. *Autoimmunity reviews*. 2020 Aug 1,;19(8):102588.
148. Malyavantham KS, Suresh L. Simultaneous distinction of monospecific and mixed DFS70 patterns during ANA screening with a novel HEp-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. *Journal of Visualized Experiments*. 2018 Jan 17,(131).
149. Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: Results from an international internet-based survey. *Autoimmunity highlights*. 2016 Dec 1,;7(1):8.

12.2.Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/20/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dr. Nagy Gábor

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, G.**, Földesi, R., Csípő, I., Tarr, T., Szűcs, G., Szántó, A., Bubán, T., Szekanecz, Z., Papp, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: A novel way to evaluate autoantibody interference in samples with mixed antinuclear antibody patterns in the HEp-2 cell based indirect immunofluorescence assay and comparison of conventional microscopic and computer-aided pattern recognition.

Clin. Chim. Acta. 553, 1-9, 2024.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2023.117747>

IF: 5 (2022)

2. **Nagy, G.**, Csípő, I., Tarr, T., Szűcs, G., Szántó, A., Bubán, T., Sipeki, N., Szekanecz, Z., Papp, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing by indirect immunofluorescence: computer-aided versus conventional microscopic evaluation of routine diagnostic samples from patients with vasculitis or other inflammatory diseases.

Clin. Chim. Acta. 511, 117-124, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.09.031>

IF: 3.786

További közlemények

3. Palatka, R., Janka, E. A., Soltész, L., Szabó, I. L., Kapitány, A., Dajnoki, Z., Emri, G., **Nagy, G.**, Palatka, K., Zouboulis, C. C., Szegedi, A., Gáspár, K.: Chronic inflammatory intestinal disorders in hidradenitis suppurativa.

Dermatology. 239 (4), 592-600, 2023.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000530434>

IF: 3.4 (2022)





4. Bonroy, C., Vercammen, M., Fierz, W., Andrade, L. E. C., Van Hoovels, L., Infantino, M., Fritzier, M. J., Bogdanos, D. P., Kozmar, A., Nespola, B., Broeders, S., Patel, D., Herold, M., Zheng, B., Chan, E. Y. T., Uibo, R., Haapala, A. M., Musset, L., Sack, U., **Nagy, G.**, Sundic, T., Fischer, K., Rego Sousa, M. J., Vargas, M. L., Eriksson, C., Heijnen, I. A., García-De La, T. I., Carballo, O. G., Satoh, M., Kim, K. H., Chan, E. K. L., Damoiseaux, J., Lopez-Hoyos, M., Bossuyt, X., European Federation of Laboratory Medicine (EFLM) Working Group "Autoimmunity Testing", European Autoimmunity Standardisation Initiative, International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns (ICAP): Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP.
Clin. Chem. Lab. Med. 61 (9), 1167-1198, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2023-0209>
IF: 6.8 (2022)
5. Bereczki, D., Nagy, B. J., Kerényi, A., **Nagy, G.**, Szarka, K., Kristóf, K., Szalay, B., Vásárhelyi, B., Bhattoa, H. P., Kappelmayer, J.: EDTA-Induced Pseudothrombocytopenia Up to 9 Months After Initial COVID-19 Infection Associated with Persistent Anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG Seropositivity.
Lab. Med. 53 (2), 206-209, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/lmab050>
IF: 1.3
6. Hamar, A. B., Szekanecz, Z., Karancsiné Pusztai, A., Czókolyová, M., Végh, E., Pethő, Z., Bodnár, N., Gulyás, K., Horváth, Á., Soós, B., Bodoki, L., Bhattoa, H. P., **Nagy, G.**, Tajti, G., Panyi, G., Szekanecz, É., Domján, A., Hódosi, K., Szántó, S., Szűcs, G., Szamosi, S.: Effects of one-year tofacitinib therapy on bone metabolism in rheumatoid arthritis.
Osteoporosis Int. 32 (8), 1621-1629, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-021-05871-0>
IF: 5.071
7. Karancsiné Pusztai, A., Hamar, A. B., Horváth, Á., Gulyás, K., Végh, E., Bodnár, N., Kerekes, G., Czókolyová, M., Bodoki, L., Hódosi, K., Domján, A., **Nagy, G.**, Szöllősi, I., Lopez, L. R., Matsuura, E., Prohászka, Z., Szántó, S., Szűcs, G., Nagy, Z., Shoenfeld, Y., Szekanecz, Z., Szamosi, S.: Soluble vascular biomarkers in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: effects of one-year anti-TNF-[alfa] therapy.
J. Rheumatol. 48 (6), 821-828, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.200916>
IF: 5.346
8. Horváth, Á., Végh, E., Karancsiné Pusztai, A., Pethő, Z., Hamar, A. B., Czókolyová, M., Bhattoa, H. P., **Nagy, G.**, Juhász, B., Hódosi, K., Domján, A., Szekanecz, Z., Szűcs, G., Szamosi, S.: Complex assessment of bone mineral density, fracture risk, vitamin D status and bone metabolism in Hungarian systemic sclerosis patients.
Arthritis Res. Ther. 21 (1), 1-10, 2019.
IF: 4.103





9. **Nagy, G.**: Laboratóriumi vizsgálatok.
In: Reumatológia. Szerk.: Szekanez Zoltán, Nagy György, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 87-98, 2019.
10. Sarang, Z., Sággy, T., Budai, Z., Ujlaky-Nagy, L., Bedekovics, J., Beke, L., Méhes, G., **Nagy, G.**, Rühl, R., Moise, A. R., Palczewski, K., Szondy, Z.: Retinol Saturase Knock-Out Mice are Characterized by Impaired Clearance of Apoptotic Cells and Develop Mild Autoimmunity. *Biomolecules*. 9 (11), 737, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.3390/biom9110737>
IF: 4.082
11. **Nagy, G.**: Immunológiai eltérések kimutatása laboratóriumi módszerekkel primer immunhiányos betegségekben.
Orv. hetil. 158 (79), 2087-2094, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31261>
IF: 0.564
12. Szántó, A., Szabó, K., **Nagy, G.**, Molnár, C., Zeher, M.: Characterization and Comparison of Patient Subgroups Suspicious for IgG4-Related Disease and Malignant Lymphoma in Patients Followed-up for Sjögren's Syndrome. *Pathol. Oncol. Res.* 22 (3), 579-585, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0041-1>
IF: 1.736
13. Szántó, A., **Nagy, G.**, Molnár, C., Griger, Z., Tarr, T., Zeher, M.: Description of patients with IgG4-related disease from a Hungarian centre. *Scand. J. Rheumatol.* 43 (4), 334-337, 2014.
IF: 2.527
14. Bodolay, E., Prohászka, Z., Paragh, G., Csipő, I., **Nagy, G.**, Laczik, R., Demeter, N., Zöld, É., Nakken, B., Szegedi, G., Szodoray, P.: Increased levels of anti-heat-shock protein 60 (anti-Hsp60) indicate endothelial dysfunction, atherosclerosis and cardiovascular diseases in patients with mixed connective tissue disease. *Immunol. Res.* 60, 50-59, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-014-8552-x>
IF: 3.098
15. **Nagy, G.**: ACPA: citrullinált proteinek és peptidek elleni antitestek és jelentőségük a reumatoid arthritis laboratóriumi diagnosztikájában. *Focus Med.* 15 (2), 33-40, 2013.





16. Szodoray, P., Nakken, B., Baráth, S., Csípő, I., **Nagy, G.**, El-Hage, F., Osnes, L. T., Szegedi, G., Bodolay, E.: Altered Th17 cells and Th17/regulatory T-cell ratios indicate the subsequent conversion from undifferentiated connective tissue disease to definitive systemic autoimmune disorders.
Hum. Immunol. 74 (12), 1510-1518, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.08.003>
IF: 2.282
17. Hajas, Á. H., Szodoray, P., Nakken, B., Gaál, J., Zöld, É., Laczik, R., Demeter, N., **Nagy, G.**, Szekanez, Z., Zeher, M., Szegedi, G., Bodolay, E.: Clinical course, prognosis, and causes of death in mixed connective tissue disease.
J. Rheumatol. 40 (7), 1134-1142, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.121272>
IF: 3.173
18. Baráth, S., **Nagy, G.**, Zöld, É., Csípő, I., Gyimesi, E., Zeher, M., Bodolay, E.: Conductor of regulatory cells: does vitamin D restore the shifted balance of the distinct regulatory cell types in undifferentiated connective tissue disease?
Immunol. Lett. 153 (1-2), 71-72, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.03.001>
IF: 2.367
19. Tímár, O., Szekanez, Z., Kerekes, G., Végh, J., Oláh, A., **Nagy, G.**, Csiki, Z., Dankó, K., Szamosi, S., Németh, Á., Soltész, P., Szűcs, G.: Rosuvastatin improves impaired endothelial function, lowers high sensitivity C-reactive protein, complement and immunocomplex production in patients with systemic sclerosis: a prospective case-series study.
Arthritis Res. Ther. 15 (5), R105, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar4285>
IF: 4.117

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 58,752

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,786

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2024.01.22.

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Antal-Szalmás Péternek, aki felügyelte és támogatta munkámat, segített a kísérletek megtervezésében és az eredmények értelmezésében.

Köszönöm Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, hogy lehetőséget biztosított a DE Laboratóriumi Medicina Intézetében a PhD munkám elkészítésére.

Köszönöm †Szöllősi Ibolya, Török Gáborné, Vargáné Földesi Róza és az összes immunológiai részlegben dolgozó asszisztens precíz munkáját a kísérletes és rutin laboratóriumi tesztek elvégzésében.

Köszönöm a volt és jelenlegi szobatársaimnak, hogy fordulhattam hozzájuk a kisebb-nagyobb technikai problémáimmal, kiemelve Dr. Baráth Sándor és Dr. Mezei Zoltán statisztikai módszerek és Dr. Fejes Zsolt grafikonkészítés területén nyújtott segítségét.

Köszönöm az Euroimmun, illetve magyarországi forgalmazójának az Immunotrin Kft. munkatársainak, kiemelve közülük Dr. Frank Tibort, hogy a reagensek egy részét, a kipróbálás időszakában az automatizált mikroszkópot, illetve a műszerrel kapcsolatos információt biztosították.

Köszönöm a laboratóriumi informatikai rendszer üzemeltetőinek a statisztikai lekérdezésekhez nyújtott segítségüket.

Köszönöm az Immunológiai, Reumatológiai, Gasztroenterológiai és Nefrológiai Tanszék munkatársainak, hogy a betegek karakterizálásával, a rutin minták küldésével lehetővé tették a kísérletes munka elvégzését.

Köszönöm családomnak, feleségemnek, testvéremnek, szüleimnek és barátaimnak a türelmet, támogatást, amivel segítettek, hogy a kutatási munkára fókuszálhassak.

14. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye:

1. **Nagy G**, Csípő I, Tarr T, Szűcs G, Szántó A, Bubán T, Sipeki N, Szekanecz Z, Papp M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing by indirect immunofluorescence: Computer-aided versus conventional microscopic evaluation of routine diagnostic samples from patients with vasculitis or other inflammatory diseases. *Clin Chim Acta*. 2020;511:117-124. doi: 10.1016/j.cca.2020.09.031.
2. **Nagy G**, Földesi R, Csípő I, Tarr T, Szűcs G, Szántó A, Bubán T, Szekanecz Z, Papp M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. A novel way to evaluate autoantibody interference in samples with mixed antinuclear antibody patterns in the HEp-2 cell based indirect immunofluorescence assay and comparison of conventional microscopic and computer-aided pattern recognition. *Clin Chim Acta*. 2024;553:117747. doi: 10.1016/j.cca.2023.117747.