



HỘI NGHỊ KHOA HỌC THƯỜNG NIÊN
LIÊN CHI HỘI HEN - DỊCH ỨNG - MIỄN DỊCH LÂM SÀNG TP.HCM 2023



KIẾN TẬP: TEST CHẨN ĐOÁN DỊCH ỨNG – MIỄN DỊCH

THS. LÊ KIỀU MINH

Trung tâm Y sinh học phân tử
Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP, KỸ THUẬT TRONG CHẨN ĐOÁN

DỊ ỨNG

- Test lấy da
- Test nội bì
- Test áp da - Patch test
- Định lượng tryptase
- Định lượng histamine
- Định lượng IgE đặc hiệu huyết thanh
- Test kích hoạt basophil BAT
- Test kích thích trong chẩn đoán dị ứng thuốc
- Kỹ thuật định lượng cytokine trong huyết thanh
- ...

TỰ MIỄN

- Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp ANA (IIFT-ANA)
- Kỹ thuật ELISA
- Kỹ thuật ngưng kết gel (Gel precipitation assays)
- Phương pháp lai thấm protein: Western (immuno) blot
- Phương pháp điểm chấm (Dot blot)
- Kỹ thuật dải chấm loang (Line blot)
- Kỹ thuật miễn dịch tổ hợp (Multiplex Immunoassay MIA)
- Phép đo dòng chảy (Flowcytometry)
- Kỹ thuật kháng nguyên chip (Antigen microarray)
- ...

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP, KỸ THUẬT TRONG CHẨN ĐOÁN

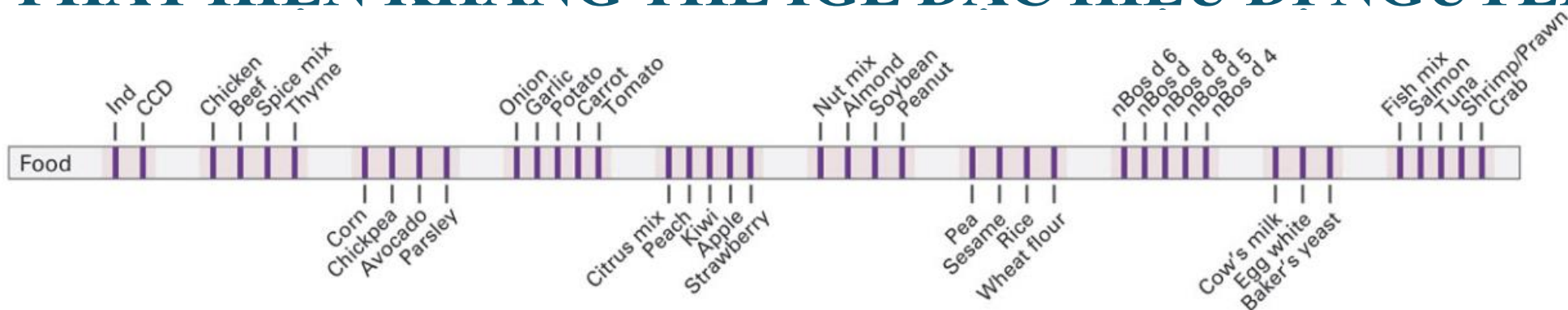
DỊ ỨNG

- Test lấy da
- Test nội bì
- Test áp
- Định lượng tryptase
- Định lượng histamine
- Định lượng IgE đặc hiệu huyết thanh
- Test kích hoạt basophil BAT
- Test kích thích trong chẩn đoán dị ứng thuốc
- Kỹ thuật định lượng cytokine trong huyết thanh
- ...

TỰ MIỄN

- Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp ANA (IIFT-ANA)
- Kỹ thuật ELISA
- Kỹ thuật ngưng kết gel (Gel precipitation assays)
- Phương pháp lai thấm protein: Western (immuno) blot
- Phương pháp điểm chấm (Dot blot)
- Kỹ thuật dải chấm loang (Line blot)
- Kỹ thuật miễn dịch tổ hợp (Multiplex Immunoassay MIA)
- Phép đo dòng chảy (Flowcytometry)
- Kỹ thuật kháng nguyên chip (Antigen microarray)
- ...

XÉT NGHIỆM THẨM MIỄN DỊCH (IMMUNOBLOT) PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ IGE ĐẶC HIỆU DỊ NGUYÊN



ALLERGIC REACTIONS

Skin Contact	Injection	Ingestion	Inhalation
poison plants	bee sting	medication	pollen
animal scratches		nuts & shellfish	dust
pollen			mold & mildew
Latex			animal dander

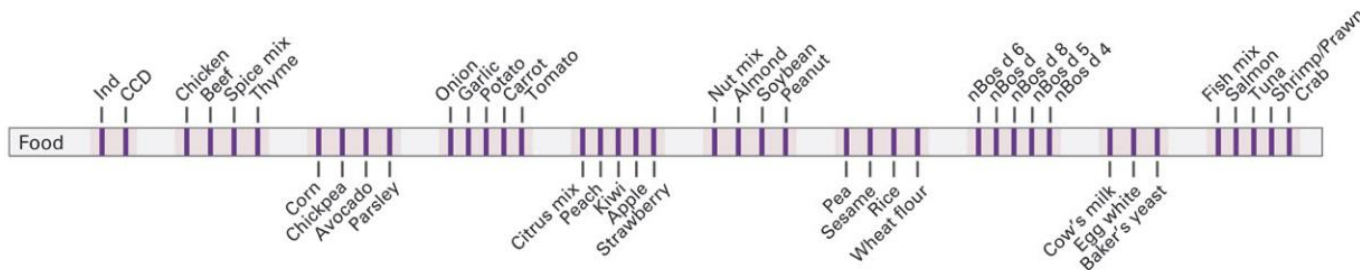
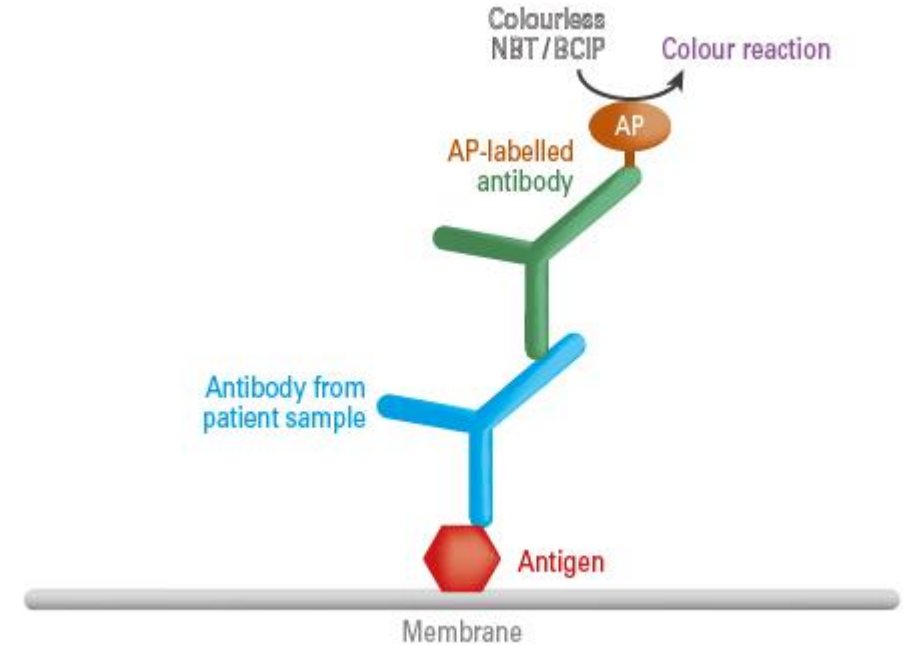
Xét nghiệm kháng thể IgE đặc hiệu dị nguyên là một xét nghiệm máu được sử dụng để chẩn đoán sự dị ứng với một chất hoặc nhiều chất đặc hiệu ở người có triệu chứng dị ứng cấp tính hoặc mạn tính.

Blot	Code	Allergen name
	f1	Egg white
	f75	Egg yolk
	f3	Codfish
	f24	Shrimp/prawn
	f40	Tuna
	f308	Sardine (pilchard)
	f4	Wheat flour
	f5	Rye flour
	f6	Barley flour
	f7	Oat flour
	f9	Rice
	f14	Soybean
	f292	Corn
	f79	Gluten
	f13	Peanut
	f17	Hazelnut
	f20	Almond
	f2	Cow's milk
	f76	nBos d 4 - Alpha-lactalbumin (cow's milk)
	f77	nBos d 5 - Beta-lactoglobulin (cow's milk)
	f78	nBos d 8 - Casein (cow's milk)
	f105	Chocolate
	f218	Goat's milk
	f25	Tomato
	f32	Lemon
	f33	Orange
	f44	Strawberry
	f49	Apple
	f72	Pineapple
	f26	Pork
	f27	Beef
	f83	Chicken
	f155	Brewer's yeast
	f45	Baker's yeast
	u85	Latex
	d1	Dermatophagoides pteronyssinus
	d2	Dermatophagoides farinae
	d201	Blomia tropicalis
	e1	Cat
	e2	Dog
	e85	Chicken feathers
	m1	Penicillium notatum
	m2	Cladosporium herbarum
	m3	Aspergillus fumigatus
	m5	Candida albicans
	m6	Alternaria alternata
	g2	Bermuda grass
	w8	Dandelion
	i1	Honey bee venom
	i3	Common wasp venom
	i70	Fire ant
	i71	Mosquito
	i100	Cockroach, American
	CCD	CCD marker
	Ind	Indicator band

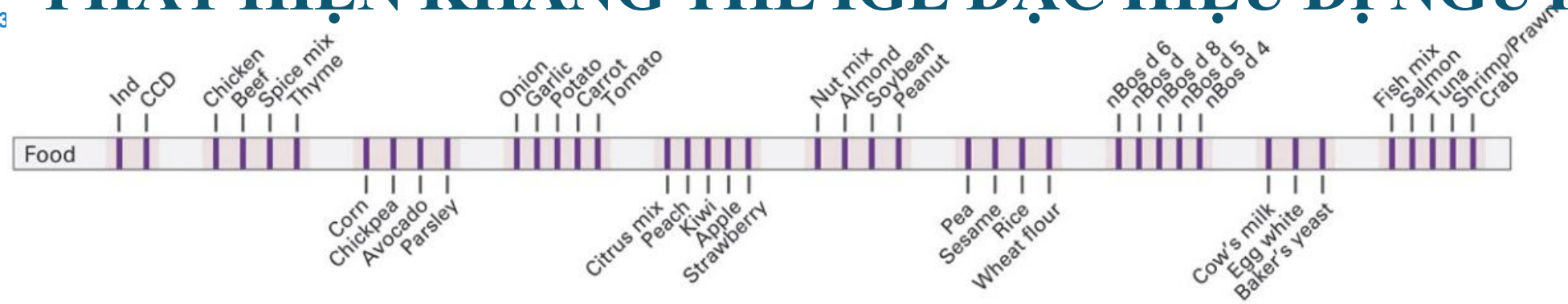
XÉT NGHIỆM THẨM MIỄN DỊCH (IMMUNOBLOT) PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ IGE ĐẶC HIỆU DỊ NGUYÊN

Nguyên lý hoạt động:

- Các kháng nguyên (Antigen) được phủ trên que thử theo vạch song song (pha rắn).
- Nếu bệnh phẩm dương tính, các kháng thể (antibody) đặc hiệu trong huyết thanh sẽ gắn với kháng nguyên.
- Trong bước ủ thứ 2, kháng thể thứ cấp có gắn alkaline-phosphatase (AP) đc cho vào để PU với phức hợp kháng thể-kháng nguyên
- Kháng thể đánh dấu được nhuộm với cơ chất để tạo ra vạch màu tối ở các vị trí gắn kháng nguyên tương ứng.



XÉT NGHIỆM THẨM MIỄN DỊCH (IMMUNOBLOT) PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ IGE ĐẶC HIỆU DỊ NGUYÊN



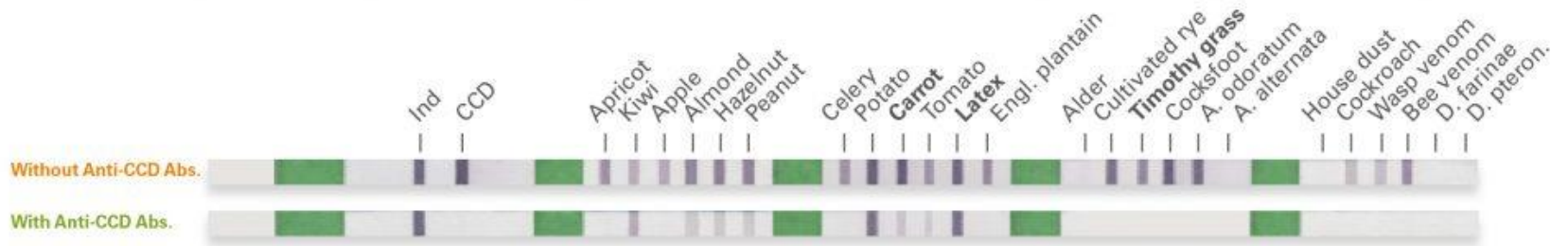
- Xét nghiệm IgE đặc hiệu dị nguyên lên đến vài chục DN/ lần.
- Quy trình chạy tối ưu thể tích mẫu và thời gian thực hiện.
- CCD marker giúp phát hiện PU quá mẫn hoặc PU chéo dị nguyên gốc carbohydrate

ƯU ĐIỂM:

- An toàn, đặc biệt trên BN có nguy cơ sốc phản vệ cao.
- Không gây khó chịu cho BN
- Đặc hiệu CCD, giảm phản ứng chéo



Xử lý phản ứng dương tính giả do cross-reactive carbohydrate determinant (CCD)



Allergen	Concentration	EAST class	0	1	2	3	4	5	6
CCD	91 kU/l <0.35 kU/l	5 0							
Carrot (f31)	58 kU/l 0.52 kU/l	5 1							
Latex (u85)	54 kU/l 54 kU/l	5 5							
Timothy grass (g6)	27 kU/l <0.35 kU/l	4 0							

Excerpt from the test evaluation

Result without Anti-CCD Absorbent:

Positive reaction to a large number of tested allergens.

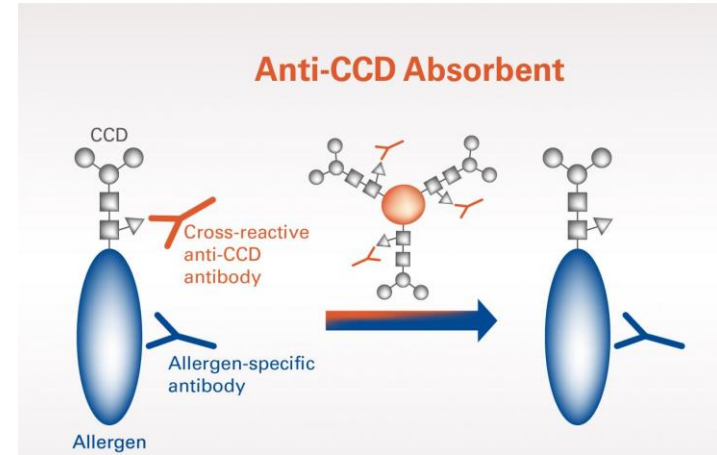
Conclusion:

→ The patient should avoid the allergens with a positive result.

Result with Anti-CCD Absorbent:

Positive results sometimes show a clear reduction in EAST class (e.g. carrot) or are now negative (e.g. timothy grass). In some cases the test result remains unchanged (e.g. latex).

→ A differentiated diagnosis is enabled by inhibition of the anti-CCD IgE antibodies. The patient must avoid far fewer allergens than originally diagnosed.



Phân loại mức độ IgE đặc hiệu dị nguyên trong huyết thanh

Phân loại (Class)	Nồng độ (Concentration) kU/L	Kết quả (Results)
Class 0	$0 \leq \text{sIgE} < 0.35$	Âm tính (Negative)
Class 1	$0.35 \leq \text{sIgE} < 0.7$	Dương tính rất thấp (Very Low Positive)
Class 2	$0.7 \leq \text{sIgE} < 3.5$	Dương tính thấp (Low Positive)
Class 3	$3.5 \leq \text{sIgE} < 17.5$	Dương tính (Positive)
Class 4	$17.5 \leq \text{sIgE} < 50$	Dương tính mạnh (High Positive)
Class 5	$50 \leq \text{sIgE} < 100$	Dương tính rất mạnh (Very High Positive)
Class 6	$\text{sIgE} \geq 100$	Dương tính rất mạnh (Very High Positive)

Nồng độ IgE đặc hiệu dị nguyên trong huyết thanh sIgE = kilo đơn vị/L (kU/L).

PHIẾU KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM

THÔNG TIN BỆNH NHÂN

Mã số: A48

Tuổi/ Năm sinh:

Giới tính: Nữ

Họ và tên:

Bệnh phẩm: Huyết thanh

Địa chỉ/ Điện thoại:

Ngày nhận mẫu:

Bác sĩ chỉ định:

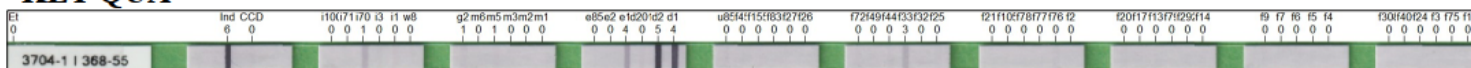
Nơi gửi mẫu:

Chẩn đoán: Viêm mũi dị ứng

Yêu cầu xét nghiệm: Tầm soát dị nguyên thường gặp (không khí, thức ăn, côn trùng ...)

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM Allergy EUROLINE Atopy Venezuela 1

KẾT QUẢ



Dị ứng nguyên	Nồng độ	Phân loại	0	1	2	3	4	5	6
Men bia (f155)	< 0.35 kU/l	0	█						
Men bánh mì (f45)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nhựa, cao su (u85)	< 0.35 kU/l	0	█						
Mạt bụi nhà Der. pter. (d1)	33.25 kU/l	4	█	█	█	█	█		
Mạt bụi nhà Der. farinae (d2)	74.50 kU/l	5	█	█	█	█	█	█	
Mạt bụi nhà Blomia tropicalis (d201)	< 0.35 kU/l	0	█						
Mèo (e1)	18.81 kU/l	4	█	█	█	█	█		
Chó (e2)	< 0.35 kU/l	0	█						
Lông gà (e85)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nấm Penicillium notatum (m1)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nấm Cladosporium herbarum (m2)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nấm Aspergillus fumigatus (m3)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nấm Candida albicans (m5)	0.35 kU/l	1	█	█					
Nấm Alternaria alternata (m6)	< 0.35 kU/l	0	█						
Cò gà (g2)	0.43 kU/l	1	█	█					
Bò công anh (w8)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nọc ong mật (i1)	< 0.35 kU/l	0	█						
Nọc ong vò vẽ (i3)	< 0.35 kU/l	0	█						
Kiến lửa (i70)	0.52 kU/l	1	█	█					
Muối (i71)	< 0.35 kU/l	0	█						
Gián (i100)	< 0.35 kU/l	0	█						
CCD marker (CCD)	< 0.35 kU/l	0	█						

Phân loại (Class)

- Class 0
- Class 1
- Class 2
- Class 3
- Class 4
- Class 5
- Class 6

Nồng độ (Concentration) kU/L

- 0 ≤ sIgE < 0.35
- 0.35 ≤ sIgE < 0.7
- 0.7 ≤ sIgE < 3.5
- 3.5 ≤ sIgE < 17.5
- 17.5 ≤ sIgE < 50
- 50 ≤ sIgE < 100
- sIgE ≥ 100

Kết quả (Results)

- Am tính (Negative)
- Dương tính rất thấp (Very Low Positive)
- Dương tính thấp (Low Positive)
- Dương tính (Positive)**
- Dương tính mạnh (High Positive)**
- Dương tính rất mạnh (Very High Positive)**
- Dương tính rất mạnh (Very High Positive)**

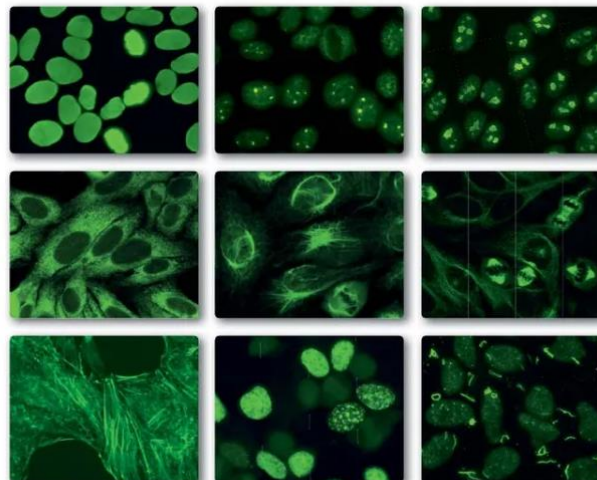
XÉT NGHIỆM KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN (ANA)

Xét nghiệm ANA (Antinuclear antibodies) phát hiện kháng thể nhân trong máu của người được làm xét nghiệm.

Giúp chẩn đoán các bệnh tự miễn như:

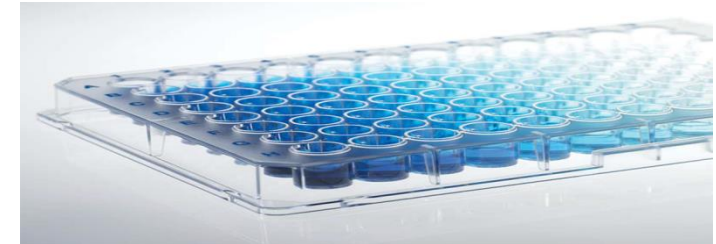
- *Lupus ban đỏ hệ thống SLE*
- *Hội chứng Sjogren SS*
- *Viêm khớp dạng thấp RA*
- *Viêm đa cơ/Viêm da cơ*
- *Xơ cứng bì hệ thống PSS*
- *Bệnh vẩy nến*
- ...

ANA Diagnostics Using Indirect Immunofluorescence IIFT

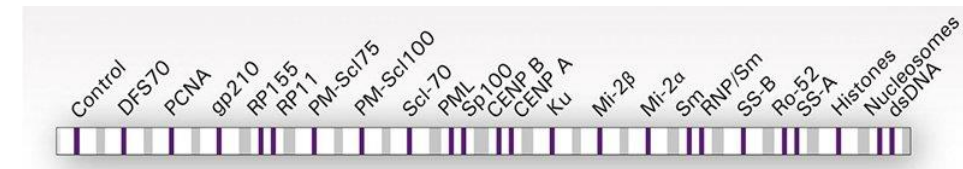


ELISA

Screening, profile and monospecific analysis



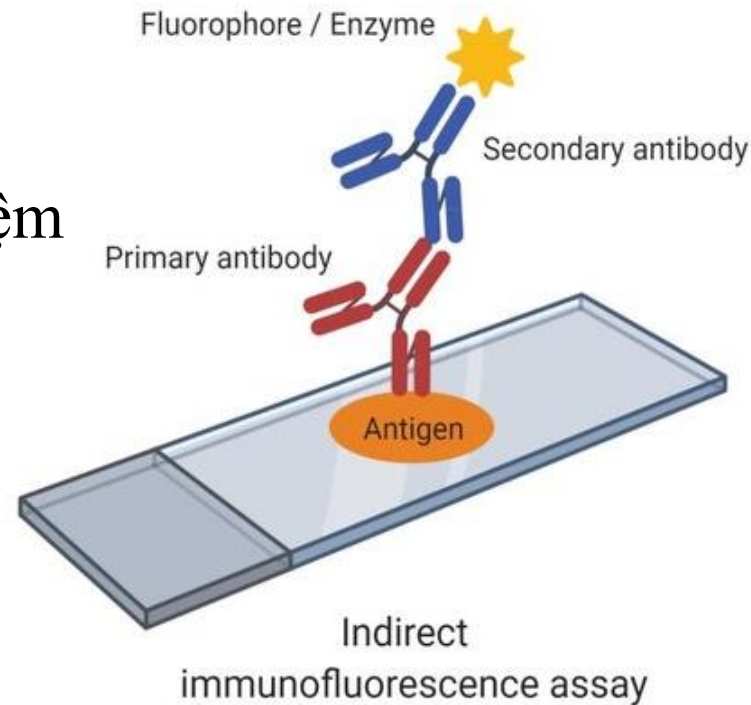
ANA Profile Immunoblot



XÉT NGHIỆM KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN BẰNG KỸ THUẬT HUỖNH QUAN GIÁN TIẾP (IIFT)

- Marker chính: dsDNA, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, Mi-2,..
- Cơ chất thực hiện: Tế bào Hep-2, Primate liver
- Tiêu chuẩn vàng của nhóm xét nghiệm ANA

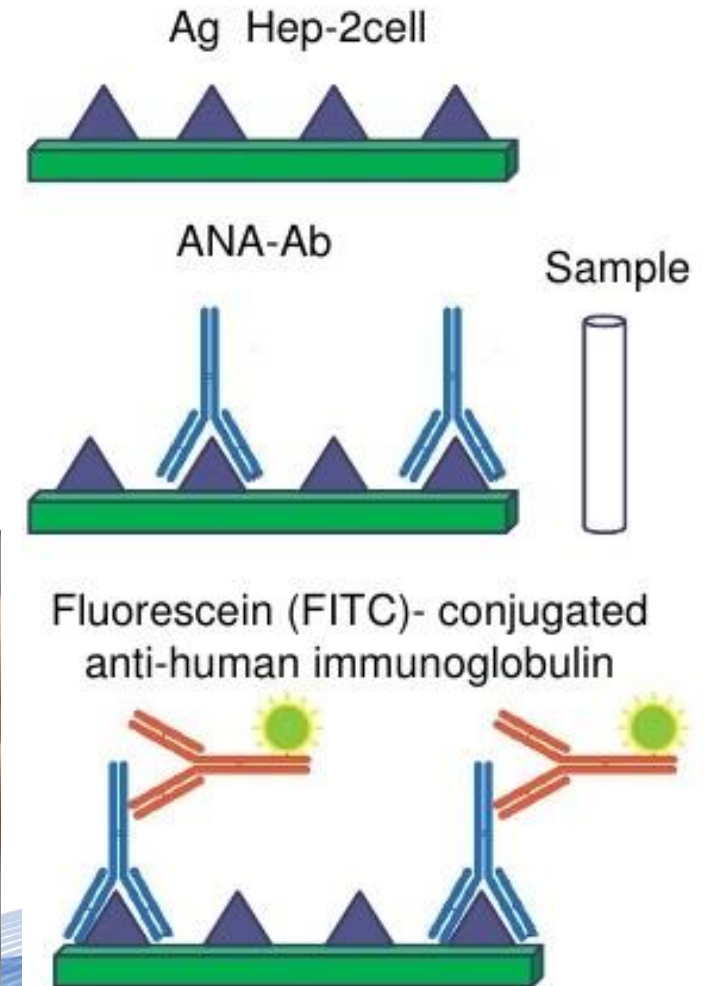
Kháng thể đặc hiệu được gắn với phức hợp huỳnh quang giúp chúng ta quan sát được phản ứng miễn dịch dưới kính hiển vi huỳnh quang



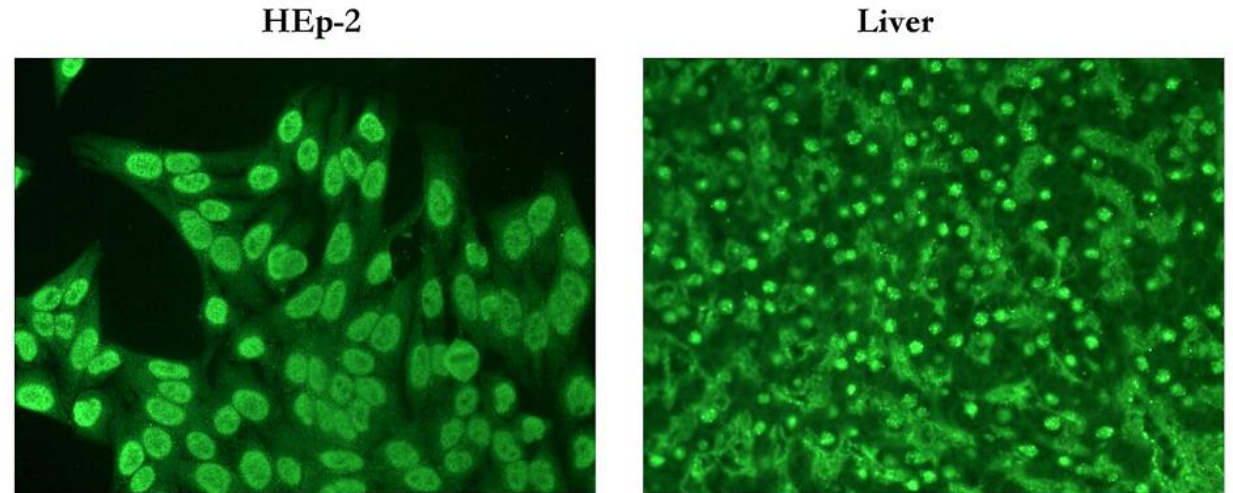
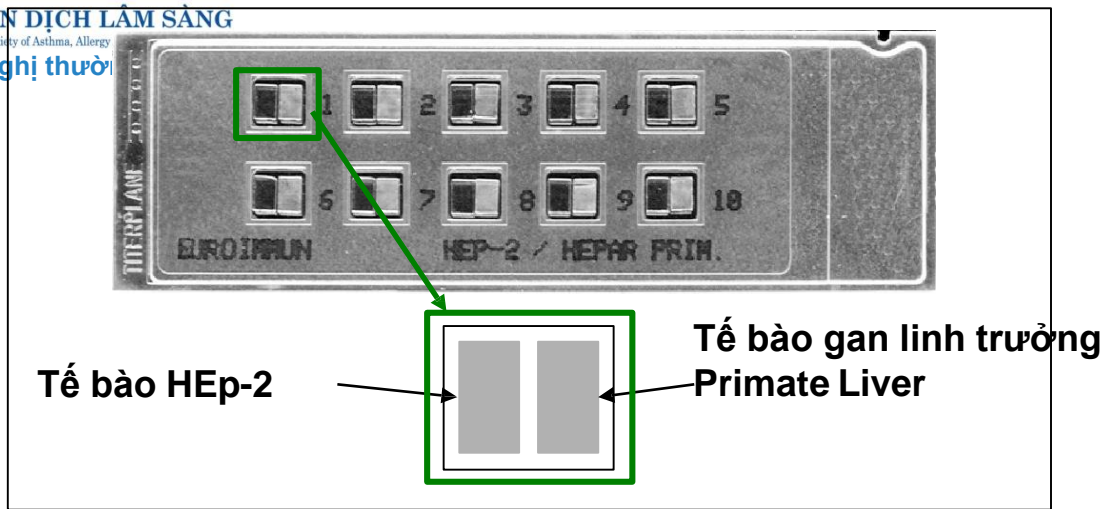
XÉT NGHIỆM KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN BẰNG KỸ THUẬT HUỖNH QUAN GIÁN TIẾP (IIFT)

NGUYÊN LÝ HOẠT ĐỘNG

- Tế bào Hep-2 có kháng nguyên bề mặt đã được cố định trên slide sẽ được cho phản ứng với huyết thanh bệnh nhân.
- Kháng thể thứ cấp có gắn chất đánh dấu huỳnh quang đc cho vào và sẽ liên kết với immunoglobulin của huyết thanh bệnh nhân đã gắn vào kháng nguyên trên cơ chất.
- Những vị trí có cố định kháng thể sẽ nhìn thấy được dưới kính hiển vi huỳnh quang. Mỗi tự kháng thể sẽ được xác định bằng một kiểu bắt màu huỳnh quang đặc biệt trên một cơ chất đặc biệt.



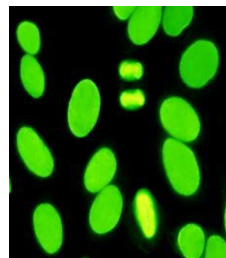
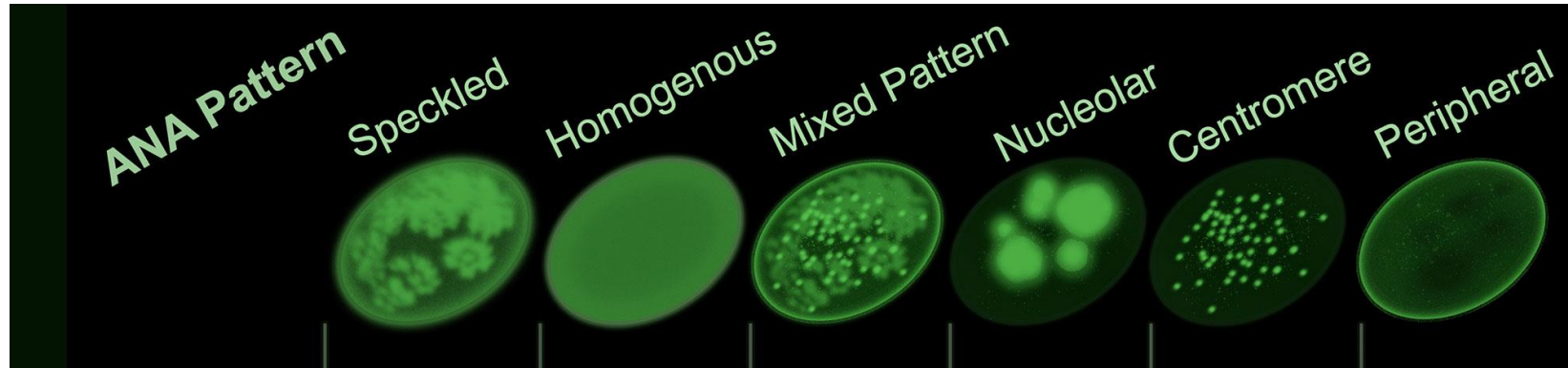
Cấu trúc của một Slide BIOCHIPs có gắn cố định tế bào HEp-2



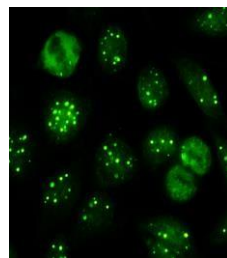
Mỗi slide sẽ có từ 5-10 BIOCHIPs gắn cố định 2 loại tế bào HEp-2 và tế bào gan động vật linh trưởng.

- Tế bào HEp-2 có gấp 10 lần các tế bào đang phân chia giúp dễ dàng quan sát các mitotic pattern.
- Tế bào gan động vật linh trưởng (Primate liver) được tiến hành thực hiện phản ứng song song với HEp-2 cell nhằm mục đích:
 1. Khẳng định kết quả của HEp-2;
 2. Tác dụng tương hỗ lẫn nhau khi đọc và xác nhận kết quả;
 3. Xác định được một số kháng thể đặc biệt khác, giúp đưa ra những chẩn đoán quan trọng chưa thể hiện được trên HEp-2

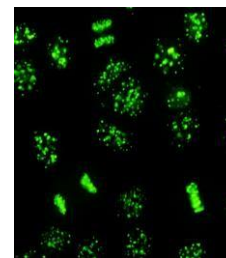
Một số hình ảnh về ANA Pattern ghi nhận trên tế bào HEp – 2



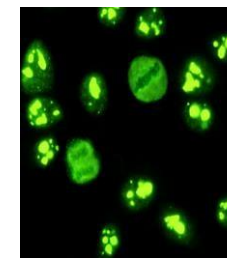
ANA homogen



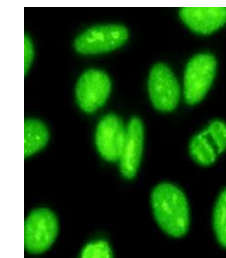
Nuclear dots



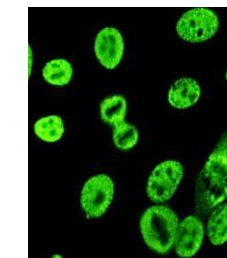
Centromere



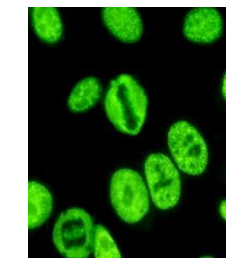
ANA nucleolar



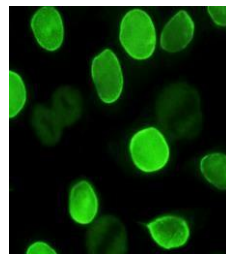
Scl-70



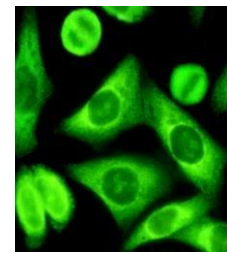
Sm/RNP



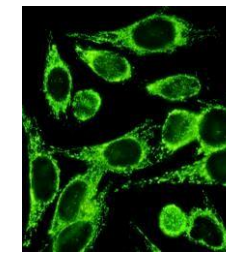
SS-A/SS-B



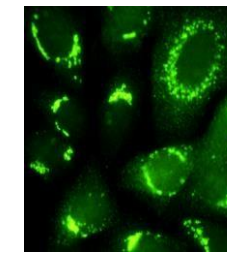
Nuclear memb.



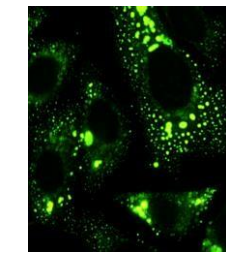
Ribosomes



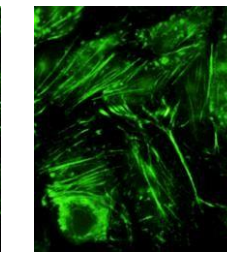
Mitochondria



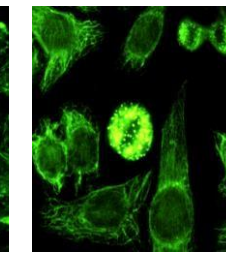
Golgi apparat



Lysosomes

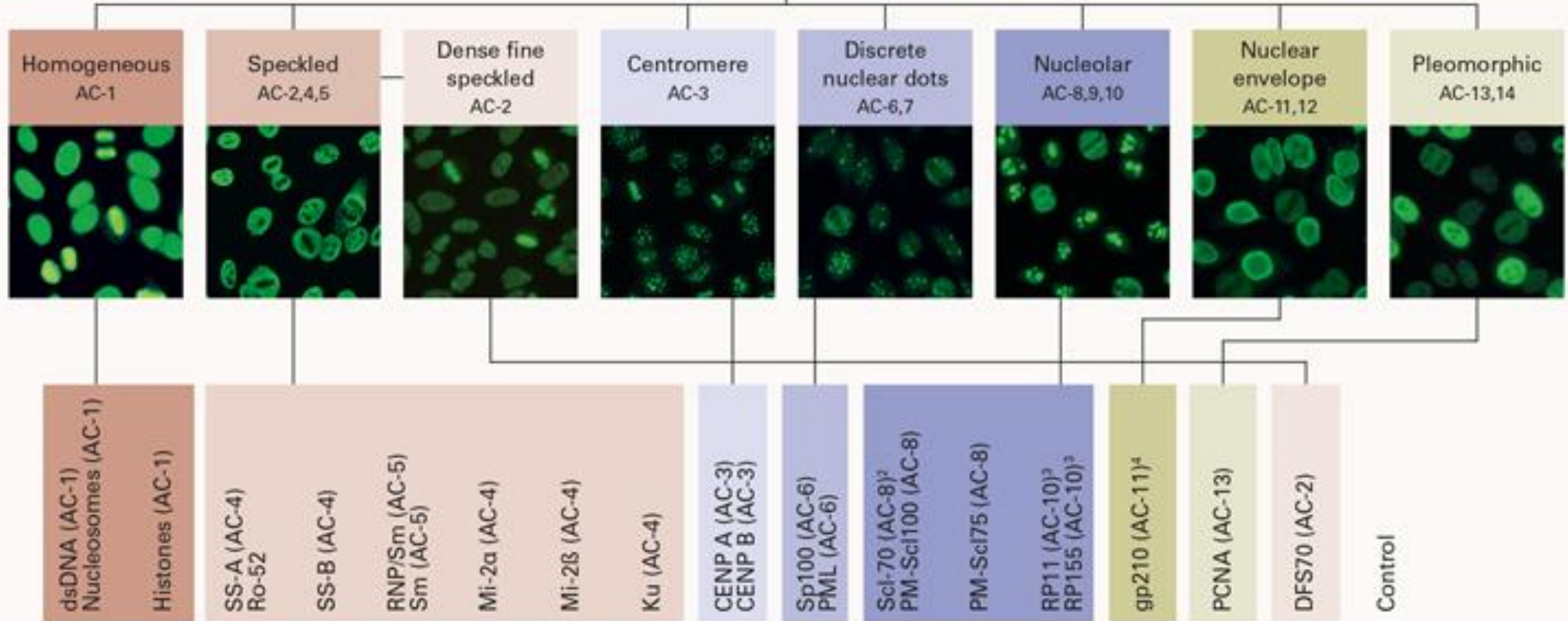


Actin



Vimentin

Nuclear pattern (HEp-2)





English

Português

Español

Italiano

Dutch

Deutsch

简体中文

繁體中文

Français

Türkçe

Русский

Bosanski

Magyar

Ελληνικά

한국어

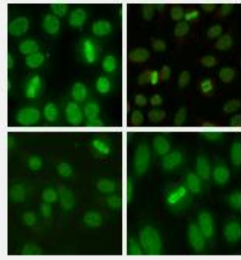
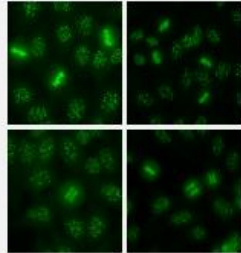
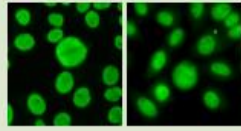
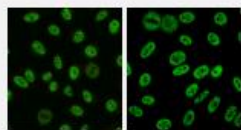
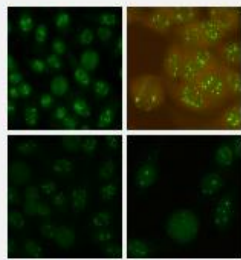
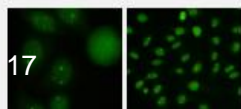
日本語

ไทย

Українська

ANA Patterns - Nuclear Patterns

Code	Pattern	Previous Nomenclature	Description	
AC-1	Nuclear homogeneous	Diffuse	Homogeneous and regular fluorescence across all nucleoplasm. The nucleoli maybe stained or not stained depending on cell substrate. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass intensely stained in a homogeneous hyaline fashion.	
AC-2	Nuclear dense fine speckled	none	Speckled pattern distributed throughout the interphase nucleus with characteristic heterogeneity in the size, brightness and distribution of the speckles. Throughout the interphase nucleus, there are some denser and looser areas of speckles (very	

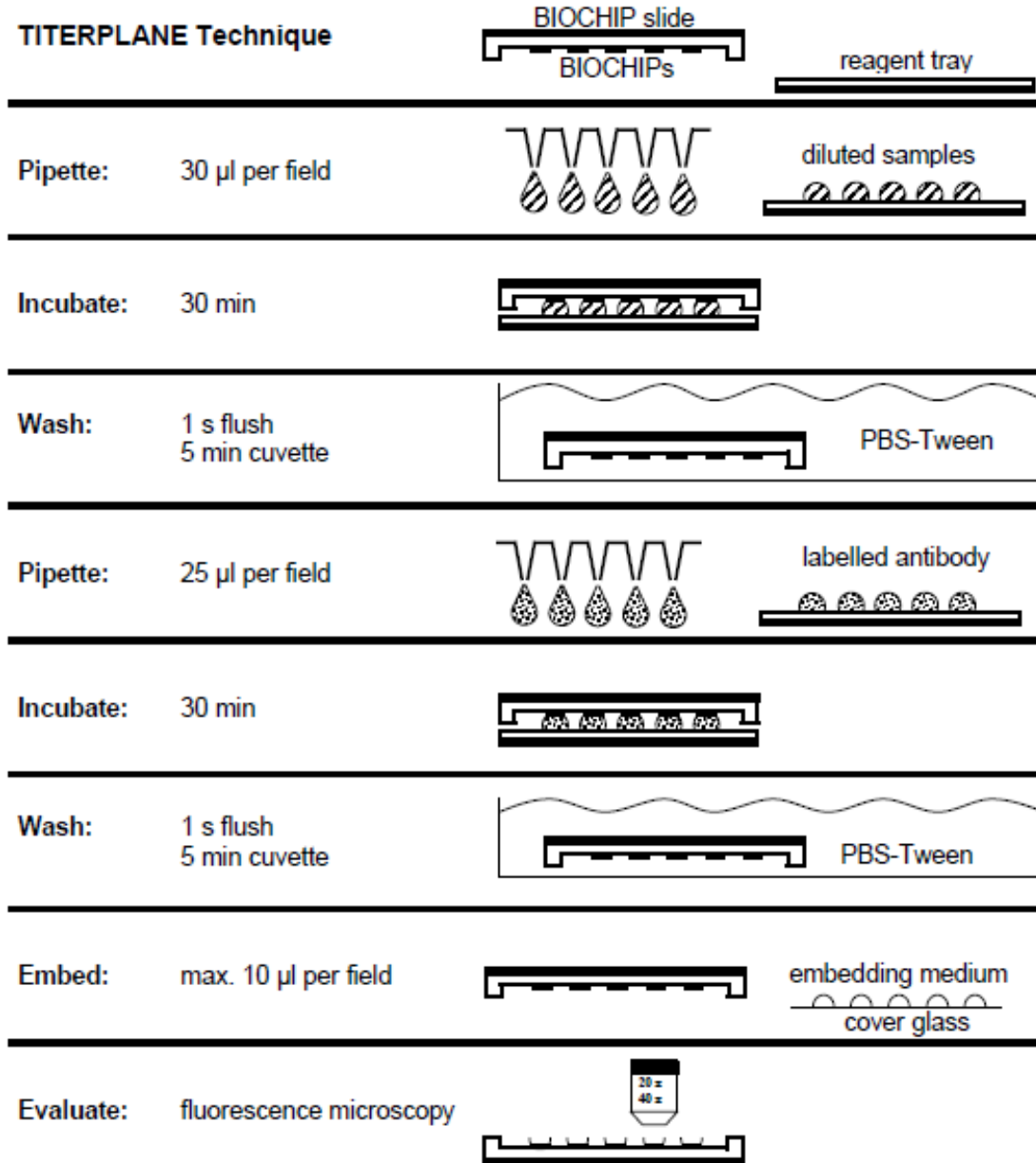
AC-2	Nuclear dense fine speckled	none	Speckled pattern distributed throughout the interphase nucleus with characteristic heterogeneity in the size, brightness and distribution of the speckles. Throughout the interphase nucleus, there are some denser and looser areas of speckles (very characteristic feature). The metaphase plate depicts strong speckled pattern with some coarse speckles standing out.	
AC-3	Centromere	kinetochore	Discrete coarse speckles (40-80/cell) scattered in interphase cells and aligned at the chromatin mass on mitotic cells. e.g. anti-CENP B	
AC-4	Nuclear fine speckled	fine granular	Fine tiny speckles across all nucleoplasm. The nucleoli may be stained or not stained. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass not stained. e.g. anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La	
AC-5	Nuclear large/coarse speckled	spliceosome/nuclear matrix	Coarse speckles across all nucleoplasm. The nucleoli may be stained or not stained. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass not stained. e.g. anti-Sm, anti-U1 RNP	
AC-6	Multiple nuclear dots	6-20 nuclear dots, NSpl, PML bodies	Countable discrete nuclear speckles (6 to 20 nuclear dots/cell). e.g. SP-100	
AC-7	Few nuclear dots	1 to 6 nuclear dots, coiled body, Cajal bodies	Countable discrete speckles (1 to 6 nuclear dots/cell in most cells). These are known as Cajal bodies or coiled bodies. e.g.	



Quy trình thực hiện MD huỳnh quang gián tiếp



MIỀN DỊCH LÂM SÀNG
HCM Society of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
Hội nghị thường niên 2023



Cho 30uL **chứng dương, chứng âm, mẫu BN** vào các ô vị trí trên khay

Úp slide BIOCHIPS lên khay, ủ 30'

Ngâm slide trong beaker nhỏ chứa **PBST 5'**

Nhỏ 25uL **conjugate antibody** lên các ô vị trí trên khay

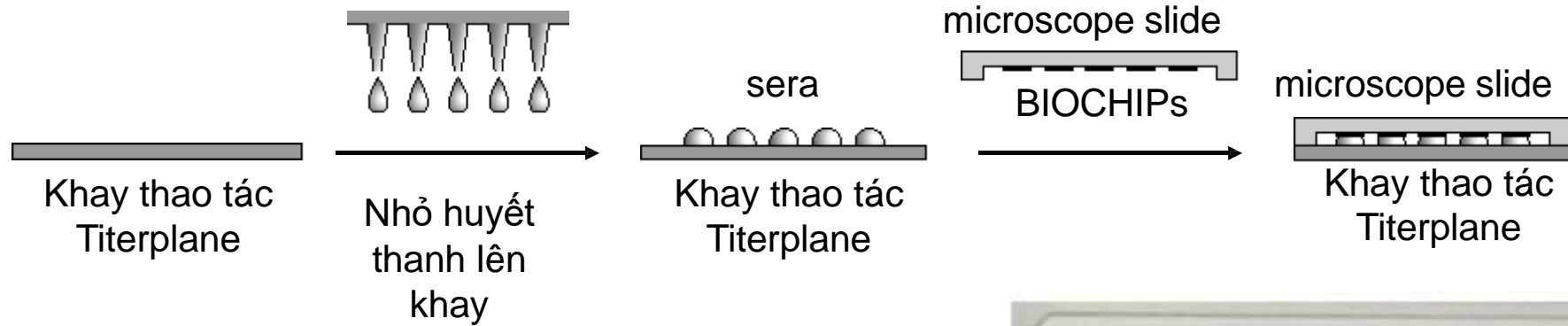
Úp slide BIOCHIPS lên khay, ủ 30'

Ngâm slide trong beaker nhỏ chứa **PBST 5'**

Nhỏ 10uL **glycerol** lên các ô vị trí trên cover glass đã đặt lên khay

Up slide lên cover glass chứa glycerol & đọc KQ

Kỹ thuật TITERPLANE

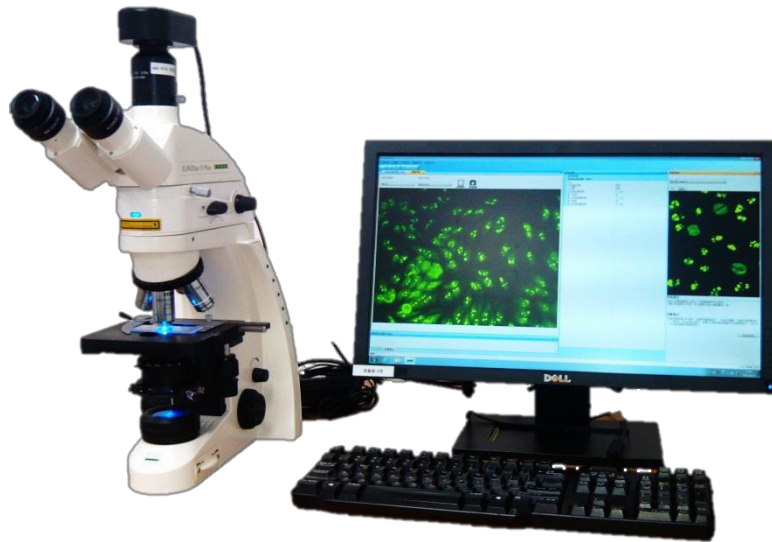


Thuận lợi:

- Bắt đầu tất cả các phản ứng cùng lúc
- Điều kiện xác định như nhau trong suốt quá trình ủ
- Không xảy ra sự bay hơi của hóa chất
- Dễ dàng thao tác



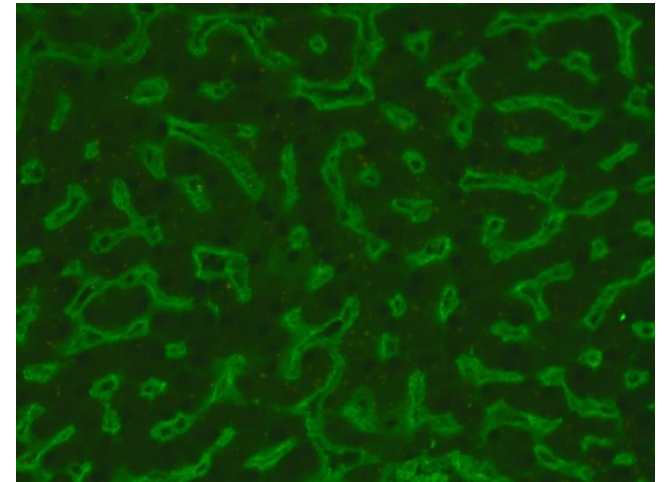
Đọc kết quả và phân tích



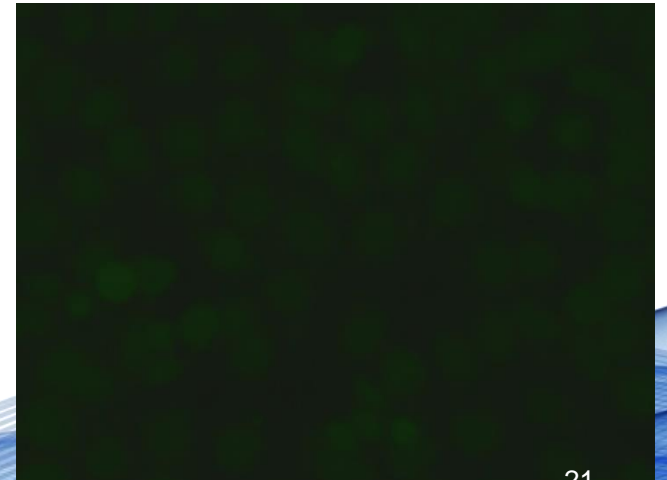
Kết quả sẽ được đọc trên kính hiển vi huỳnh quang (có thể trong phòng tối) có kết nối camera đưa hình ảnh lên máy tính

Cách đọc kết quả IIFT trên kính hiển vi huỳnh quang

- Chọn hơn 1 vị trí để quan sát toàn diện và không bỏ sót bất kỳ trường hợp bất thường nào. Nên đọc tổng thể tại trung tâm và zoom sang 4 góc trên ô BIOCHIP HEP-2 để quan sát rõ.
- Kết hợp đọc kết quả trên những tế bào trưởng thành và đang trong quá trình nguyên phân.
- Kết hợp đọc kết quả trên HEP-2 và trên tế bào gan động vật linh trưởng để xác định lại kết luận một lần nữa, tránh bỏ sót bất thường (nếu có).
- **Lưu ý:** Các trường hợp có thể xảy ra :
 - Mixed pattern kết hợp nhiều pattern trong 1 kết quả
 - Atypical pattern: pattern không điển hình khác với những loại đã từng đọc (trường hợp hiếm)
 - Hiệu giá thấp, ngang ngưỡng: hình ảnh thu nhận được sẽ mờ do nồng độ kháng thể không đủ mạnh.

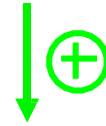


Hiệu giá kháng thể thấp dẫn đến pattern thu được rất mờ có thể trả kết quả âm tính.



Quy trình chẩn đoán sàng lọc bệnh viêm khớp tự miễn ANA

Bệnh nhân có triệu chứng nghi ngờ bệnh
viêm khớp tự miễn cần chẩn đoán?

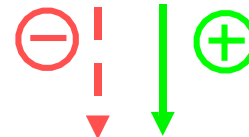


Thực hiện xét nghiệm sàng lọc ANA bằng phương
pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp IIFT



Kết quả ANA âm tính:

- Không cần thực hiện thêm các test tự kháng thể khác
- Thực hiện lại ANA test sau vài tháng



Kết quả ANA dương tính:

- Làm thêm các phương pháp phát hiện tự kháng thể đặc hiệu dựa vào hình ảnh ANA thu được và triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân (IMMUNOBLOT, ELISA)



MIỀN DỊCH LÂM SÀNG
HCM Society of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
Hội nghị thường niên 2023

thank you
many
thanks

**XIN CHÂN THÀNH CẢM ƠN QUÝ VỊ ĐÃ
CHÚ Ý LẮNG NGHE!**