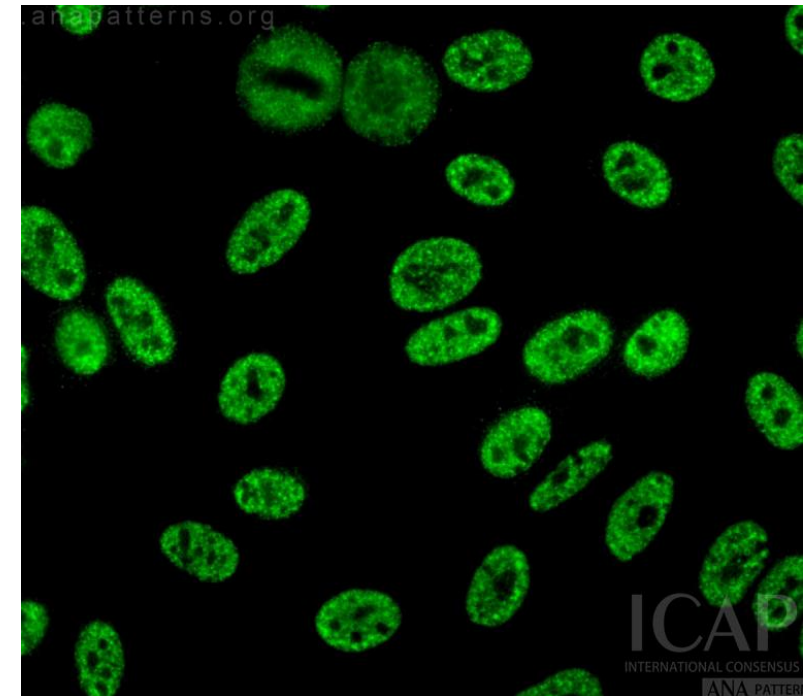




Imunofluorescence

diagnostika autoimunitních onemocnění

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)
Ústav klinické imunologie a alergologie
FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Serologické metody

1. Klasické serologické metody

- Aglutinace (přímá / nepřímá)
- Precipitace (v kapalině, v gelu)

2. **Imunochemické metody s následnou detekcí**

- **Imunofluorescence (přímá / nepřímá)**
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

3. Metody založené na efektorovém účinku protilátek (využívané v klinické mikrobiologii)

- Komplement fixační reakce
- Inhibiční a neutralizační testy

Fluorescence

- Luminiscence



Zdroj:
www.chemiaasvetlo.sk/teoria/chemiluminiscencia/

Jev, při kterém látka emituje záření po absorpci energie - excitačního záření (Fotoluminiscence) nebo při chemické reakci (Chemiluminiscence)



Zdroj: www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html

Fotoluminiscence

Fluorescence

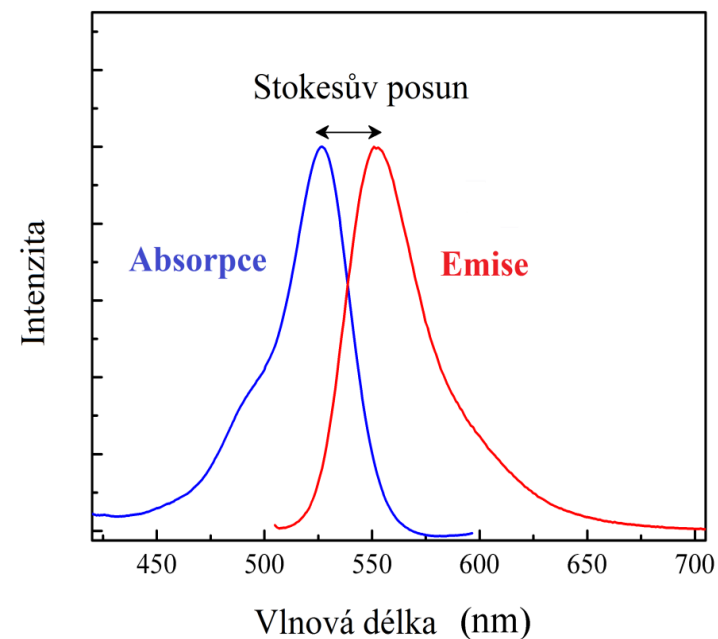
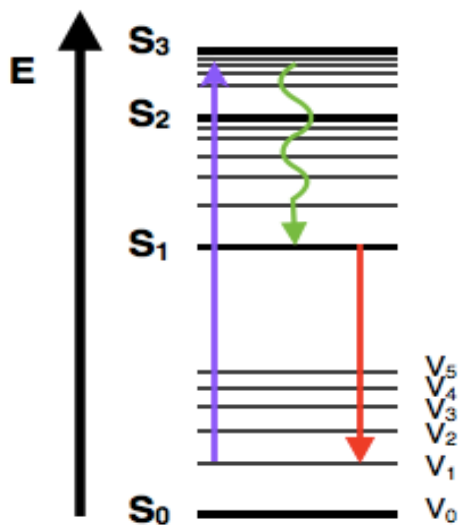
emise záření krátce po excitaci (10^{-8} až 10^{-5} s)

Fosforescence

emise záření trvá delší dobu (10^{-2} s až dni)

Fluorescence

- Látka po absorpci excitačního záření uvolňuje emisní záření o delší vlnové délce (nižší energii) – tento jev se nazývá **Stokesův posun**
- Při návratu elektronů do základní hladiny se část energie **transformuje** do jiných, nefluorescenčních procesů (uvolnění tepla, rezonanční přenos energie na okolní molekuly...)



Imunofluorescence (IF)

využití fluorochromem značených protilátek

➤ Přímá IF

Slouží k detekci **antigenů** – vazba konjugátu přímo na antigen

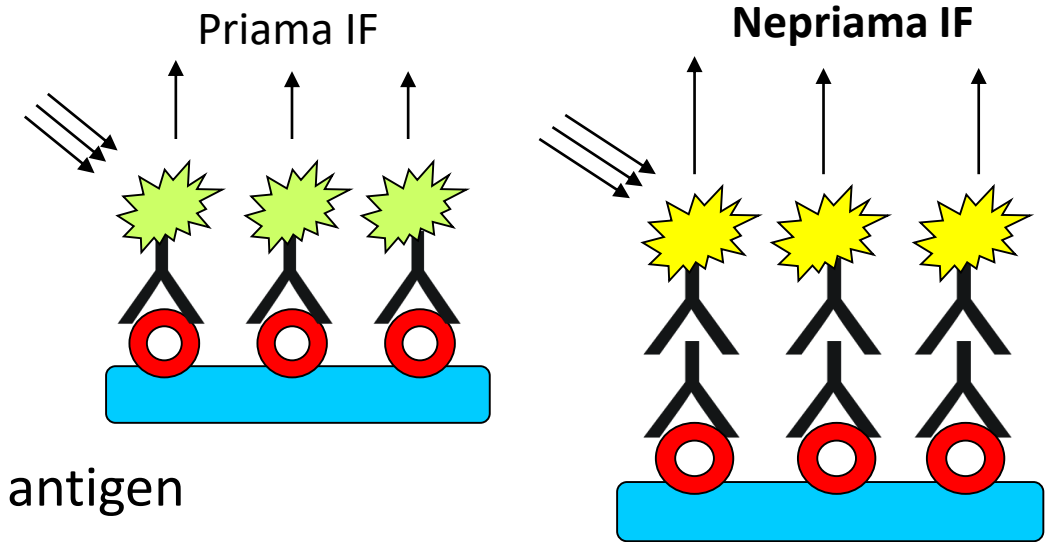
Využití: histologie – prokázání antigenu ve tkáni
mikrobiologie – rychlá detekce patogenů v biologickém materiálu

➤ Nepřímá IF

Používá se k detekci **protilátek** v séru → vazba protilátek a konjugátu v 2 krocích:

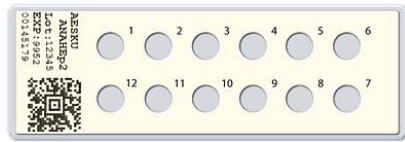
1. Na sklíčko se substrátem se nanese vyšetřovaný materiál (sérum), pokud jsou v něm přítomné hledané protilátky, naváží se na antigenní substrát na sklíčku
2. Nanese se konjugát, který se váže na protilátku příslušné izotypové třídy (IgG/IgA)

Využití: důkaz specifických protilátek, nejčastěji autoprotiátek



Základní princip imunofluorescence (IF) – detekce autoantilátěk

1. Na sklíčko se substrátem (který obsahuje cílové antigeny) se aplikuje naředěné sérum pacienta (1:80 základní ředění) + vzorky pozitivní a negativní kontroly



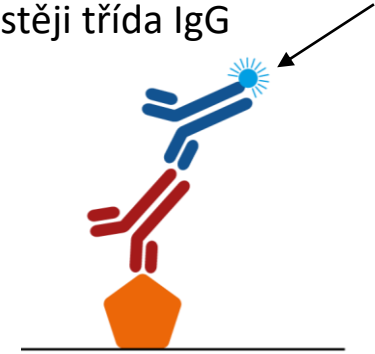
2. Inkubace
30 min v temnu



3. Promytí skel v
PBS+TWEEN – 5 min



4. Aplikace konjugátu – protilátky proti pacientově autoantilátce, je značená fluorochromem (FITC) – nejčastěji třída IgG



5. Inkubace 30 min
v temnu



6. Promytí skel v
PBS+TWEEN – 5 min

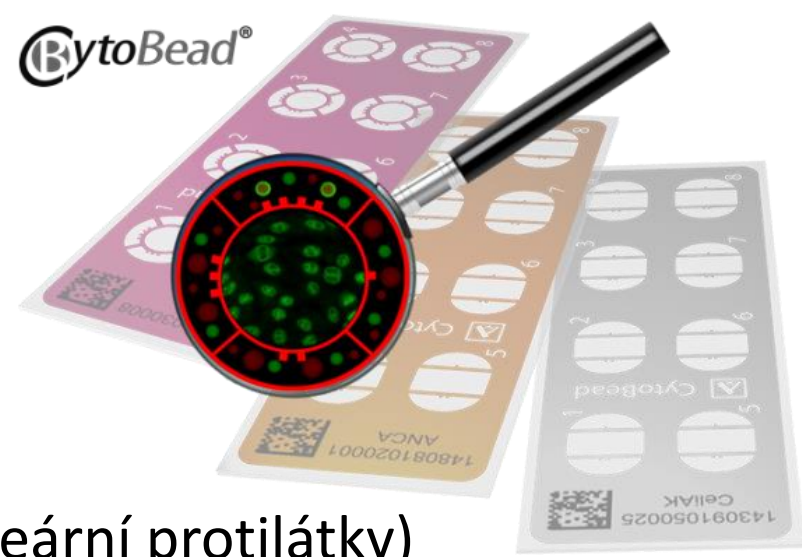
7. Otření hrany skla od přebytečného PBS+TWEEN, na jednotlivé pozice aplikace 1 kapky (cca 10ul) montovacího média - glycerinu



8. Usazení krycího skla, kontrola správného usazení, nutno se vyvarovat bublinám

9. Skla jsou připravena k odečtení na mikroskopu



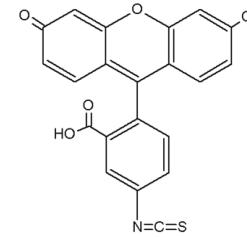


Imunofluorescence

Antigenní substráty používané při nepřímé IF

- **Buňky HEp2** (Human Epithelial) – detekce **ANA** (anti-nukleární protilátky)
 - odvozené z linie HeLa (karcinom děložního čípku)
 - rychle se dělicí buňky, v mitóze pozorovatelná **chromatinová destička** – důležitý znak pro odlišení jednotlivých typů ANA
- **Neutrofilní granulocyty** – detekce **ANCA** (autoprotilátek proti cytoplazmě neutrofilů)
- **Crithidia luciliae** – prvok, detekce protilátek proti **dsDNA**
- **Opičí jícen** – detekce **EMA** (protilátky proti endomysiu)
- **LKS** (liver, kidney, stomach) – detekce **AMA** (anti-mitochondriální Ab), **ASMA** (Ab proti hladkému svalu), **GPC** (gastic parietal cells), **RET** (Ab proti retikulínu) ...
 - kombinace 3 krysích tkání

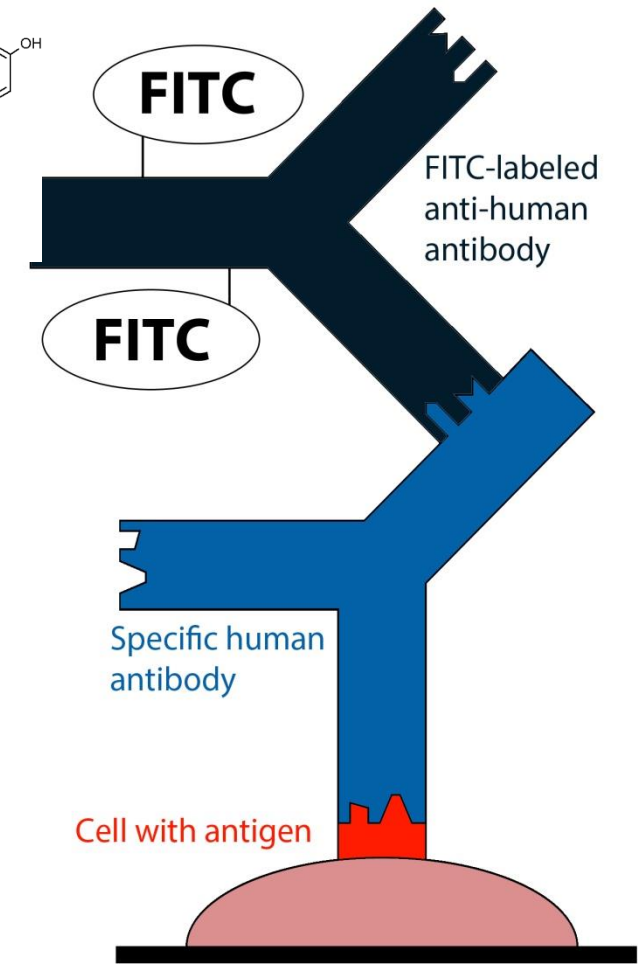
Konjugát



- Protilátka s navázaným fluorescenčním barvivem (fluorochromem)
- Nejčastěji používaný fluorochrom je **FITC** (fluoresceinizothiokyanát)

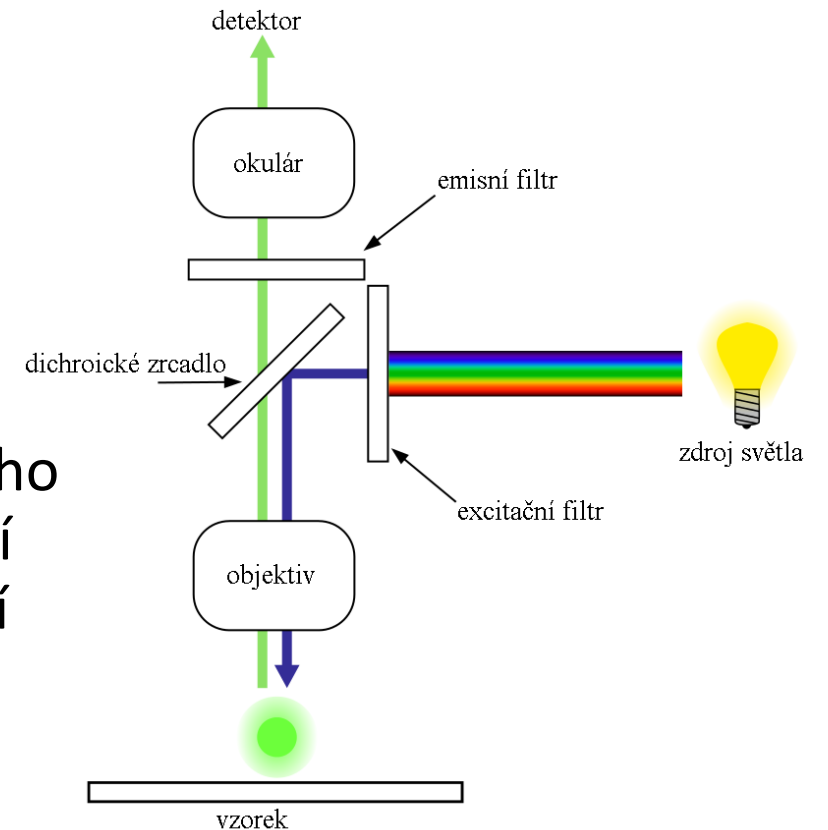
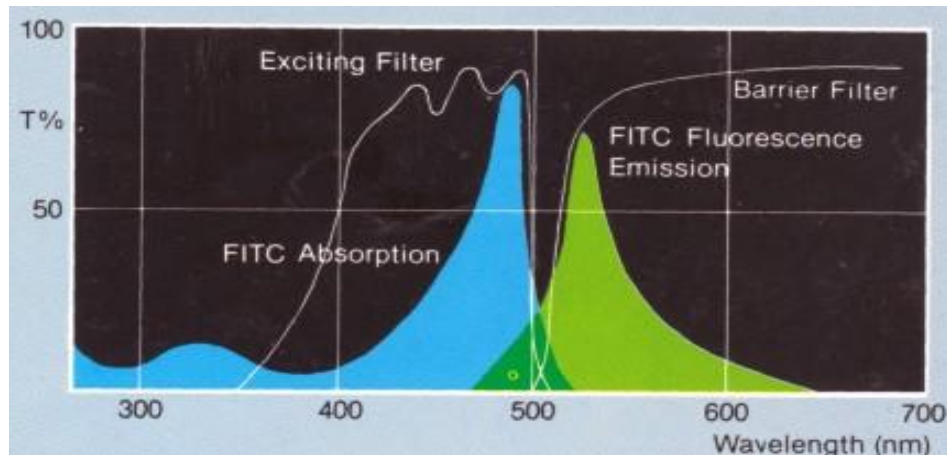
excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (zelené světlo)

- Konjugát se specificky váže jen na imunoglobuliny určité izotypové třídy (**IgG/IgA**) – výběrem konjugátu stanovíme protilátky jen této třídy
- Pro některé autoimunitní onemocnění má klinický význam výskyt autoprotílátek v určité izotypové třídě (např. celiakie – IgA)



Fluorescenční mikroskop

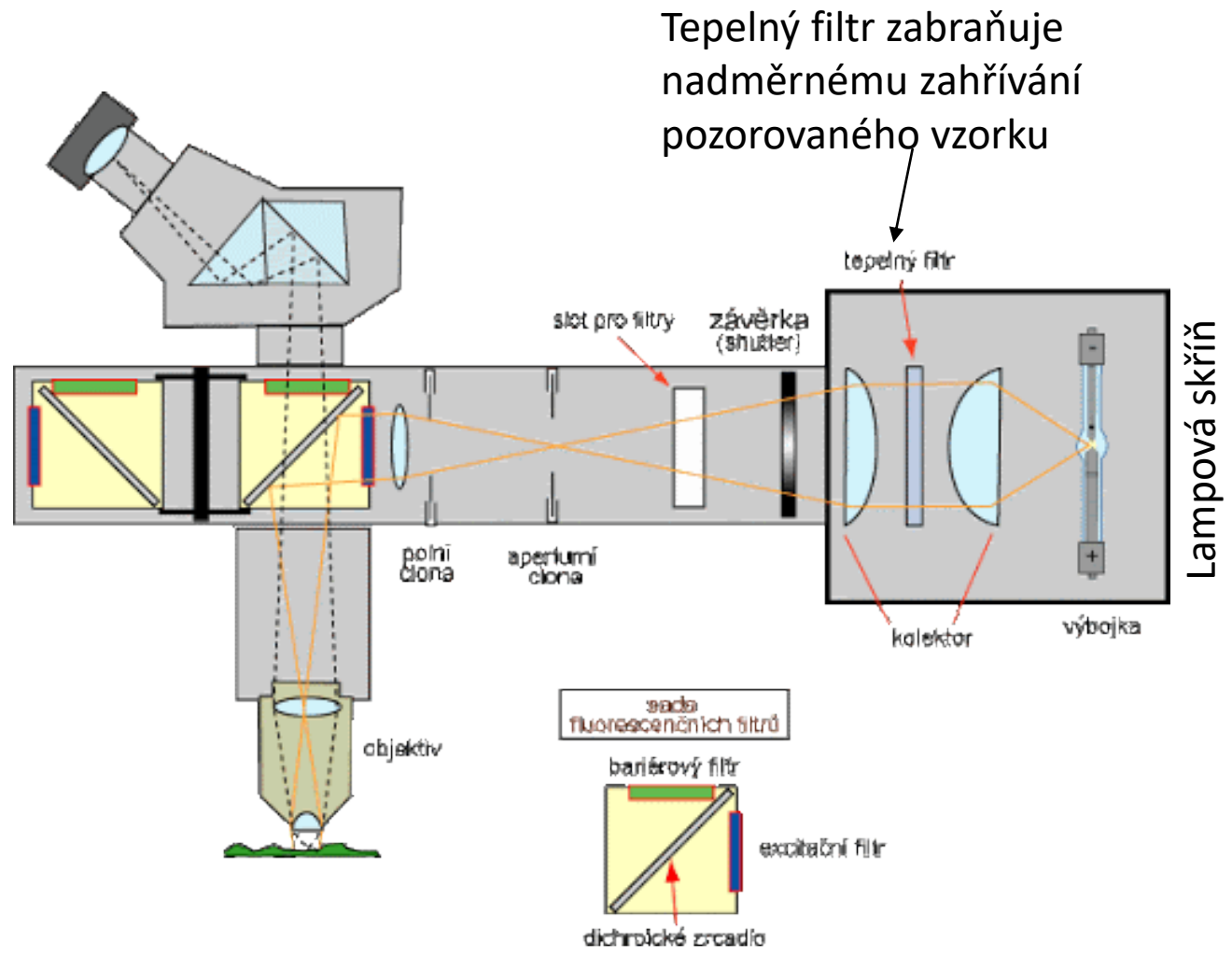
- Zdroj světla – rtuťová výbojka, **LED dioda**
- Excitační filtr – propouští pouze část spektra potřebného pro excitaci fluorochromu a zabraňuje přechodu záření v oblasti emisní vlnové délky, která by vytvářela pozadí
- Emisní (bariérový) filtr – propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního záření



- **Binokulár/trinokulár**
- Jednoduché polarizované světlo
Brightfield, Darkfield, **Fluorescencia**

Součástí moderních fluorescenčních mikroskopů je také počítač s monitorem

Schéma fluorescenčního mikroskopu



Kamera



Laboratorní postup při podezření na autoimunitní onemocnění

- Celý proces začíná v ordinaci lékaře
 - Ordinuje vyšetření na autoprotilátky – na základě kliniky+anamnézy (může určit, zda vyšetření požaduje imunofluorescenčně nebo ELISOU/imunoblotem)
- Do laboratoře přichází krev pacienta se žádankou
- Příjem – příprava séra centrifugací srážlivé krve
- Zamražení sér
- V okamžiku, kdy laboratoř nasbírá dostatečný počet vzorků od pacientů pro konkrétní vyšetření → následuje zahájení vlastního vyšetření

Pozn. Proč čekáme na dostatečný počet vzorků? Napravo je ukázka klasického sklíčka s připraveným substrátem od výrobce – zde na 8 vzorků. Sklo je nutné zpracovat plně obsazené, jinak by vyšetření bylo značně finančně nevýhodné. Při zpracování skla pouze s jednou využitou jamkou bychom o zbylých 7 přišli.



Imunologické vyšetření		
Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 BRNO tel.: 543 183 130, fax: 543 183 143, www.fnusa.cz		
Autoprotilátky proti: <ul style="list-style-type: none"> B2-GP1 centromera citruinované proteiny (CCP) ds-DNA endomysium (EMA) ENA (screening) SS-A(Ro) SS-B(La) Sci-70 Sm/RNP Jo-1 fosfolipidy (AFL IgG, IgM) GAD, IA-2 GBM GPC histony kardiolipin (ACLA IgG, IgM) kardiolipin (ACLA IgA) LC-1 LKM-1 mitochondrie (AMA) mutovaný citruinovaný vimentin (MCV) PLA2 receptor (APLAR) nukleosomy retikulin (IgG, IgA) SLA štítná žláza (TG, TPO) tkáňová transglutamináza (TTG) U1 RNP protilátky proti IgA 	Autoprotilátky: <ul style="list-style-type: none"> ANA (IF) ANA (BLOT) ANCA ASMA RF RF (IgG, IgA, IgM) Buněčné testy <ul style="list-style-type: none"> základní buněčné vyšetření (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+) další CD znaky HLA B27 proliferční testy bronchoalveolární laváž-BAL CD3+ CD4+ CD8+ Fagocytární testy <ul style="list-style-type: none"> burst test stanovení přítomnosti myeloperoxidázy Cirkul. imunokomplexy <ul style="list-style-type: none"> CIK PEG CIK C1q Imunoglobuliny <ul style="list-style-type: none"> IgG IgA IgM IgE 	Imunoglobuliny <ul style="list-style-type: none"> IgD podtřídy IgA (IgA1-IgA2) podtřídy IgG (IgG1-IgG4) kryoglobulin Komplementový systém <ul style="list-style-type: none"> klasická cesta aktivace alternativní cesta aktivace C1 inhibitor kvantitativně C1 inhibitor funkční test C1q C2 C3 C4 C5 MBL Proteiny akutní fáze <ul style="list-style-type: none"> CRP alfa-1-antitrypsin alfa-2-makroglobulin ceruloplasmin orosomukoid prealbumin transferin

Vlastní zpracování vzorku na IF – 2 různé přístupy

Princip zpracování – viz. Slide č. 6

1. Zpracování manuálně

- Manuální zpracování provádí zdravotní laborantka
- Výhody:
 - Rychlejší zpracování v porovnání s automatickou metodou
- Nevýhody:
 - Možnost vzniku lidských chyb, např. záměna vzorku, vznik artefaktů nedodržením návodu



2. Zpracování automaticky – přístroj HELMED

- V současné době se vzhledem k narůstajícímu množství vzorků a snaze eliminovat lidskou chybu upřednostňuje automatické zpracování IF
- Výhody:
 - Eliminace lidských chyb
 - Redukce manuální práce
- Nevýhody:
 - Delší zpracování v porovnání s manuální metodou
 - Přístroj je náročnější na údržbu a zacházení



ANA protilátky

anti-nuclear antibodies

- Jedná se o obsáhlou skupinu autoprotílátek, které jsou zaměřeny vůči různým **jaderným strukturám** (např. centromera, mitotický aparát, DNA, histony..)
- Výskyt u systémových autoimunitních onemocnění
- Jedná o **nejčastěji stanovované** autoprotílátky pomocí IF → odečítá se 5-10 skel/den
- Substrátem pro stanovení ANA protilátek jsou **Hep-2 buňky**
- Podskupinou ANA jsou ENA protilátky – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (jedná se o takové antigeny jádra buněk, které mají vyšší Mr a lze je extrahovat → např. SSA, SSB, Jo-1, Scl-70...)
- ENA protilátky – stanovují se ELISOU/ImunoBlotem

ANA (Anti Nuclear Antibodies)



- Výskyt při různých **systemových autoimunitních onemocněních** (systemový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, ...)



Fluorescenční obraz v mikroskopu může vypadat stejně nebo podobně u různých protilátek – pokud vidíme určitý obraz, **nevíme ještě, o jakou autoprotlátku se jedná** (na jaký antigen se váže), k jejímu bližšímu určení mohou pomoci jiné metody (ELISA, ImunoBlot)

ANA protilátky – ředění vzorků

- Stanovení ANA protilátek – sérum pacienta se vždy ředí v základu 1:80



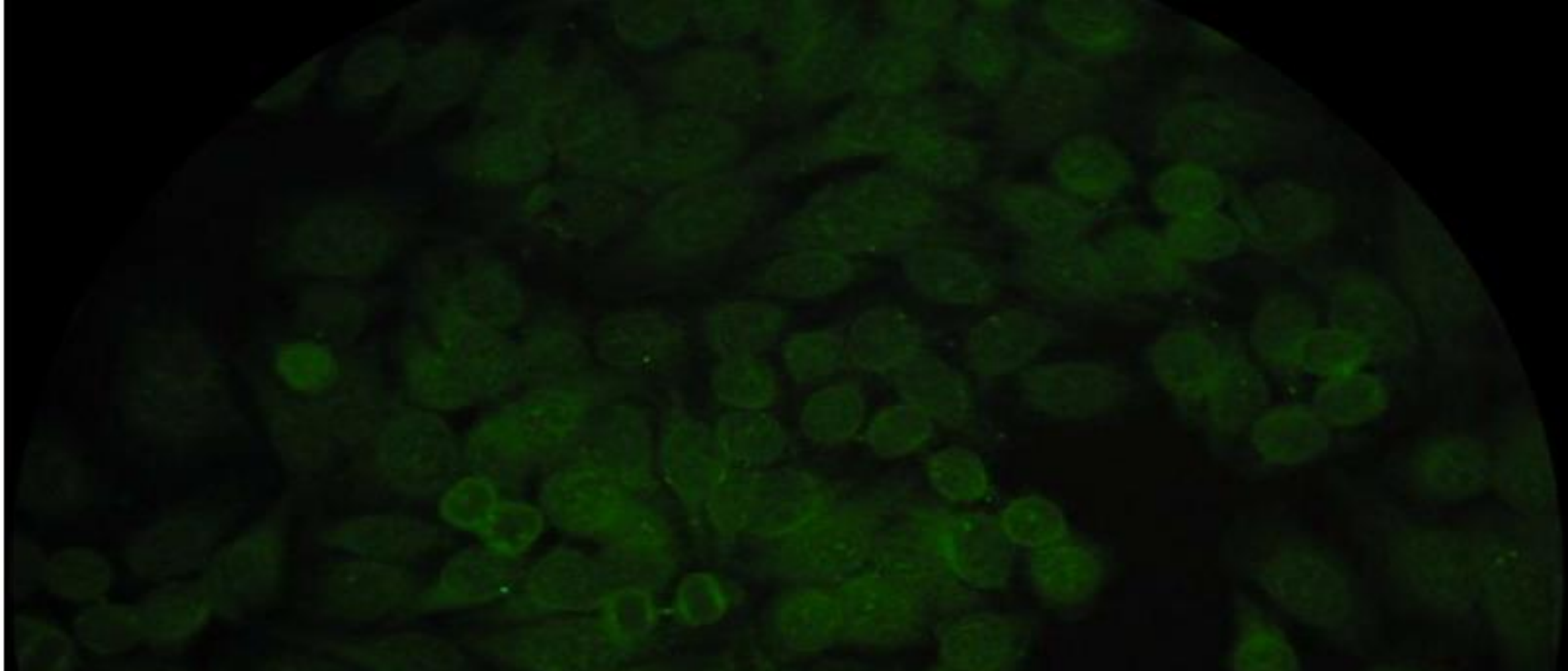
První čtení - odečtení IF při ředění 1:80



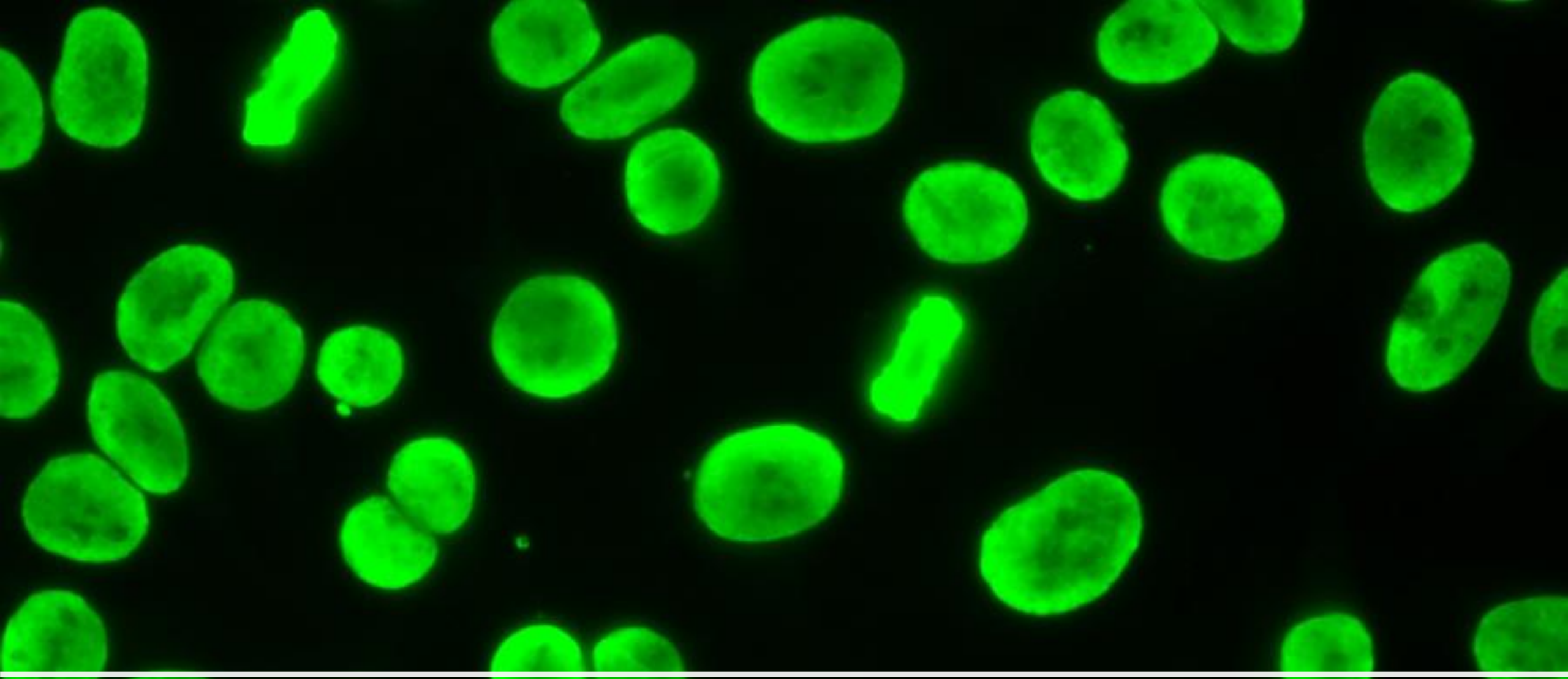
Pokud je vzorek pozitivní, odečítající VŠ indikuje vyšetření opakovat druhý den s vyšším ředěním (1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) – ředění záleží na intenzitě fluorescence daného vzorku a vyžaduje zkušenosti odečítajícího



Po zpracování skel s vyšším ředěním následuje druhé čtení. Pokud je vzorek pozitivní i při ředění 1:1280 → výsledek se vydává jako „vyšší než 1280“



Hep2 buňky – negativní obraz



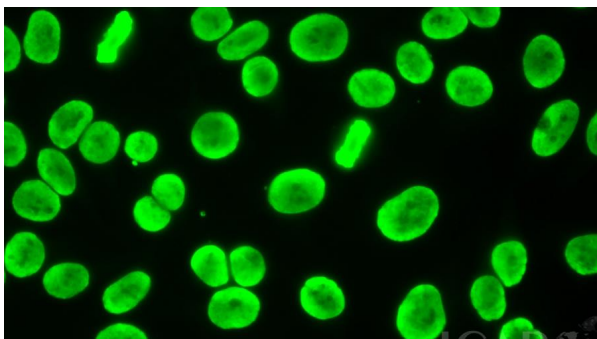
ANA – typ homogenní

diagnóza: **SLE**, léky indukovaný lupus, juvenilní idiopatická **artritida** (antigeny: dsDNA, chromatin, nukleosomy, histony)

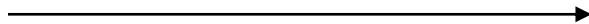
ANA – homogenní typ fluorescence

- U homogenního typu fluorescence svítí celé jádro Hep-2 buněk
- Nelze rozlišit, zda jsou přítomné autoprotílátky namířeny vůči dsDNA nebo proteinům asociovaným s DNA (histony apod.)
- Proto si laboratoř může v některých případech sama doordinovat další vyšetření → znovu provede IF takto pozitivních vzorků, ale s jiným substrátem – prvok *Crithidia luciliae*
- Pokud v prvokovi svítí pouze kinetoplast a jádro → jedná se o autoprotílátky proti dsDNA → typické pro **SLE** (systémový lupus erythematosus)

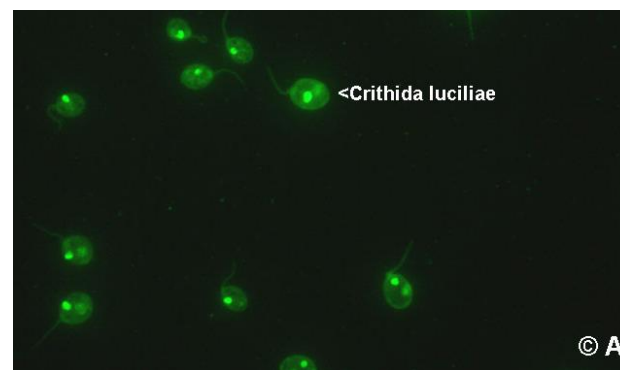
1. ANA protílátky – homogenní typ fluorescence




2. Sérum pacienta aplikováno na substrát *Crithidium luciliae*



3. Pokud je pozitivní kinetoplast a jádro → jedná se o protílátky proti dsDNA

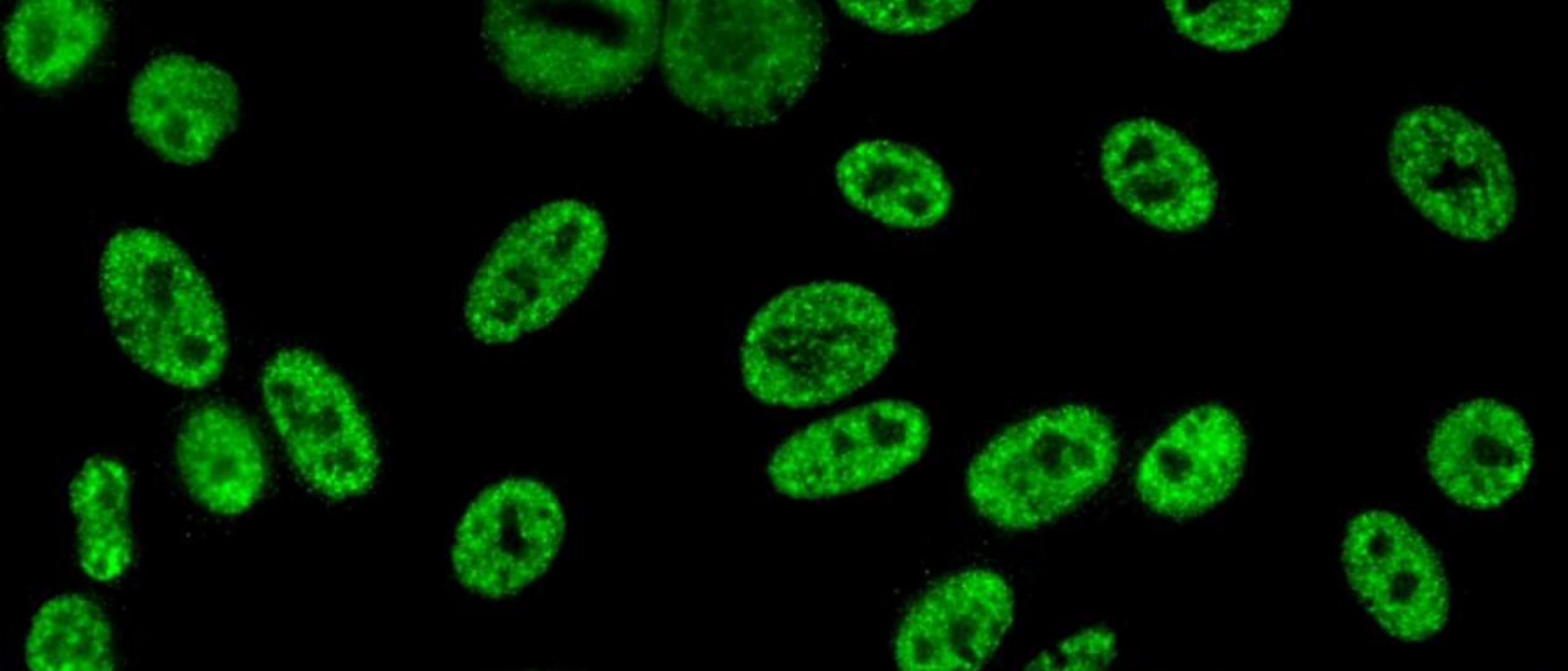


A fluorescence microscopy image showing several Crithidia luciliae cells. The cells are stained with a green fluorescent dye that highlights the dsDNA in the kinetoplast. The cells are scattered across the field of view, with some showing multiple kinetoplasts. The background is dark, making the green fluorescence stand out.

<dsDNA in the kinetoplast
positively stained

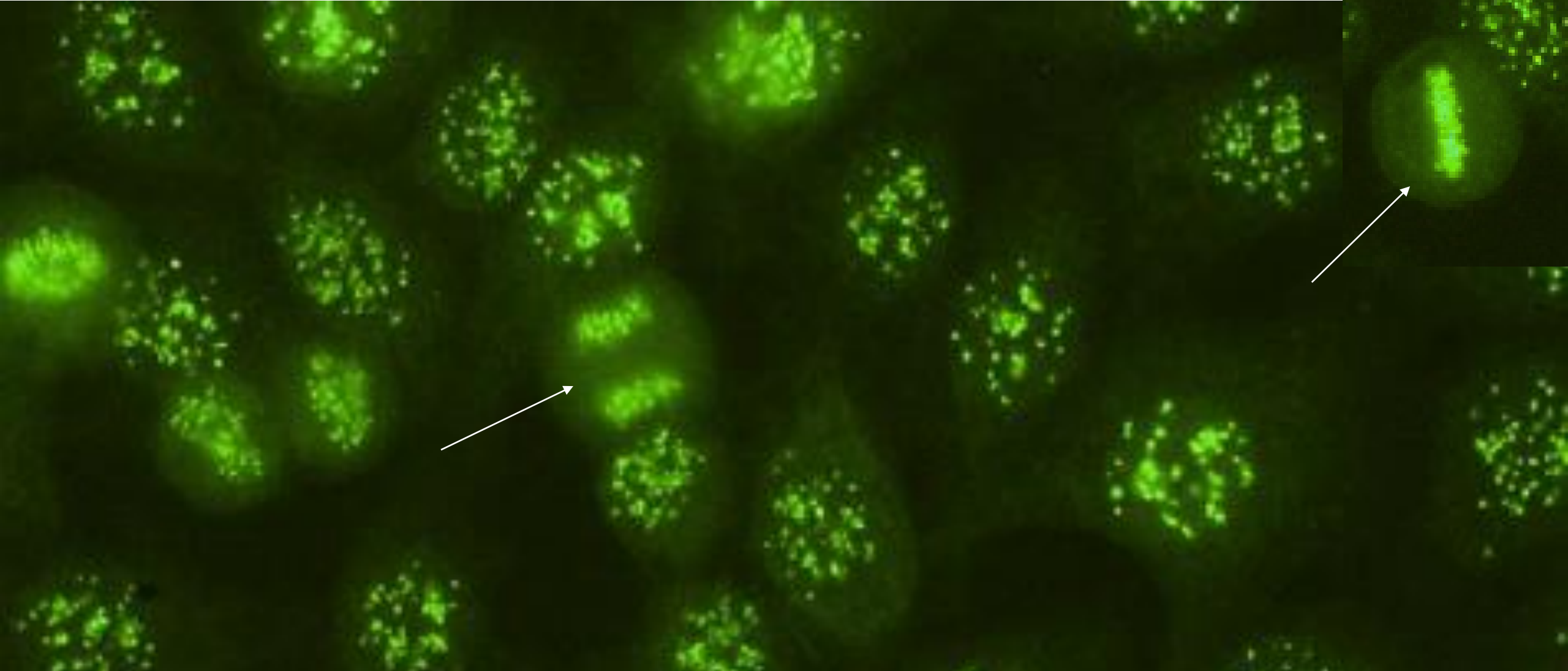
<Crithida luciliae

Prvok Crithidia luciliae – antigen je dsDNA



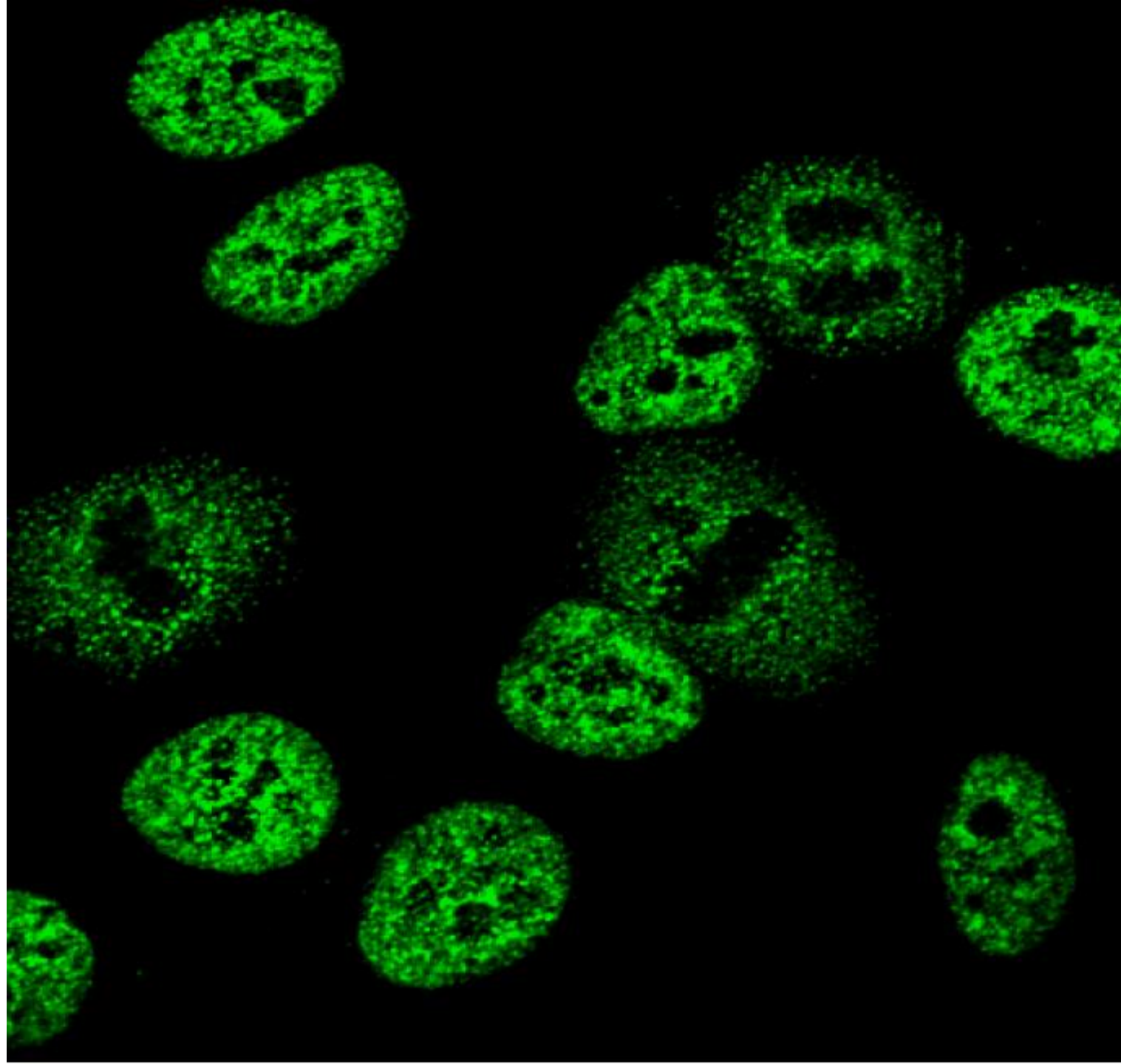
ANA – typ zrnitý (antigeny: ribonukleoproteiny ENA – Sm, SSA, SSB, U1-RNP)

diagnóza: smíšené onemocnění pojiva, Sjogrenův sy.



ANA – typ centromerický
diagnózy: CREST syndrom, systémová sklerodermie

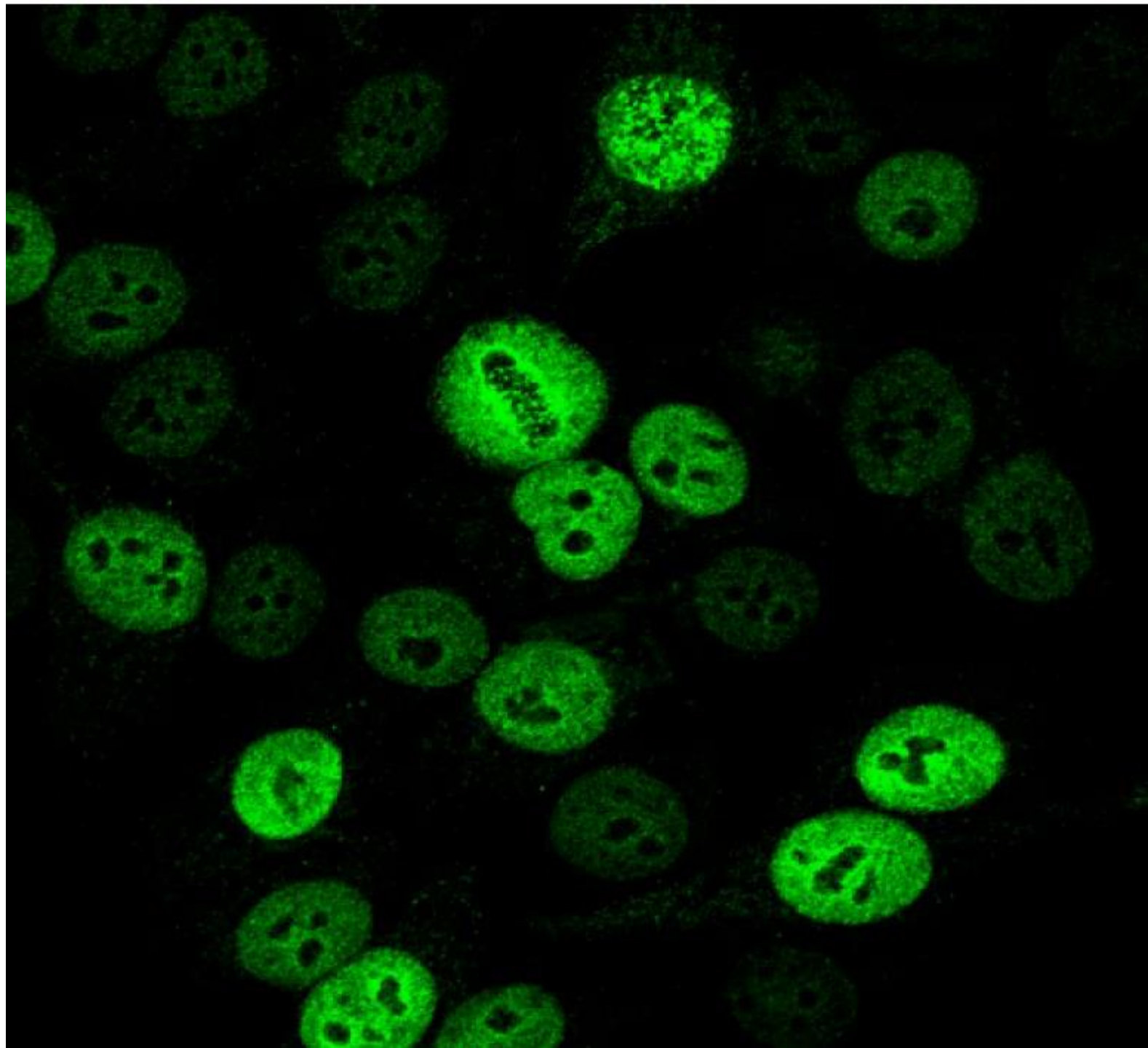
ANA typ granulární



PCNA

proliferating cell nuclear antigen

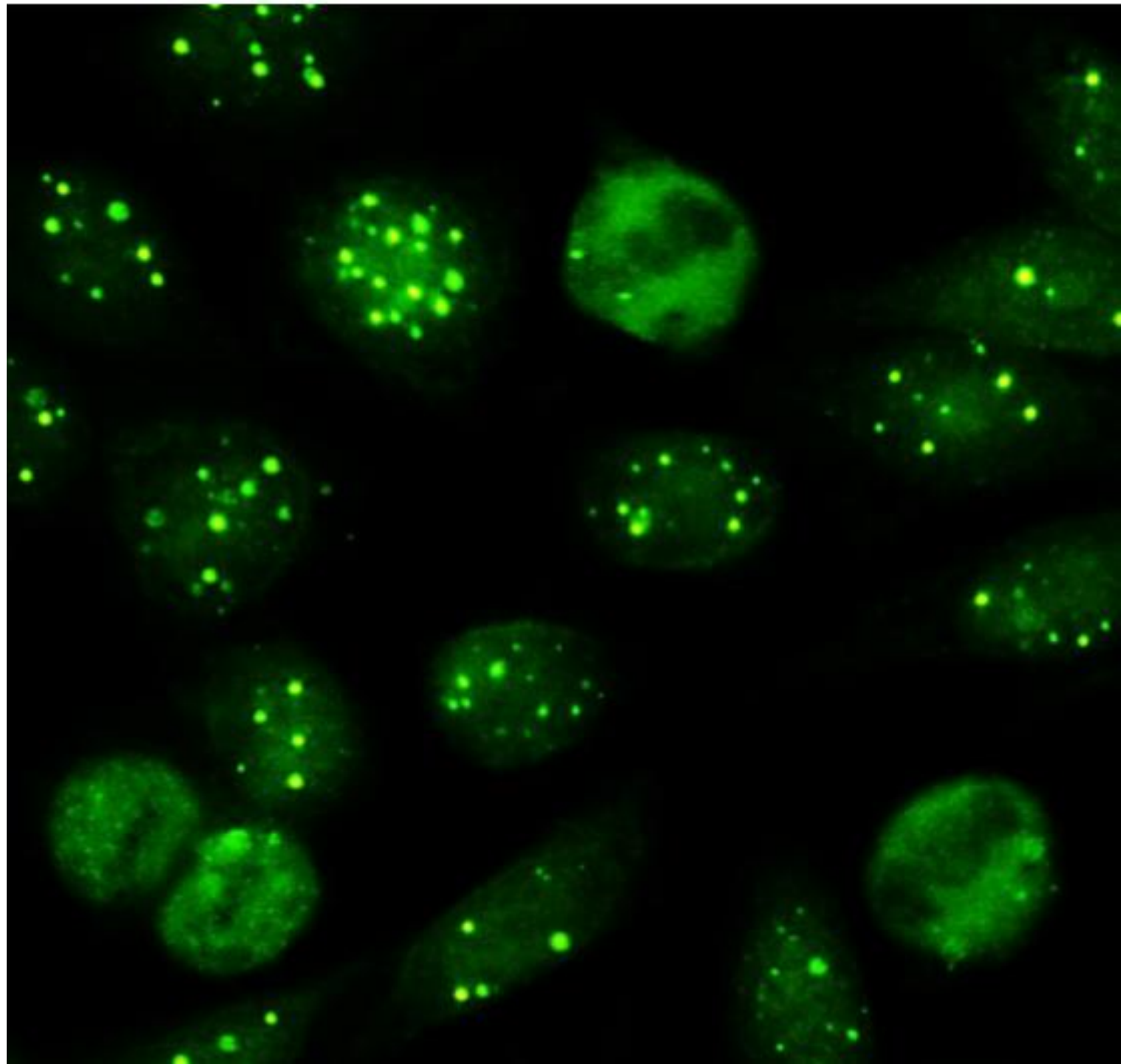
- Klinická asociace: SLE – 3%
- Dělicí se buňky v S fázi pozitivní
- Klidové buňky v G0 fázi negativní



ANA

četné jaderné tečky

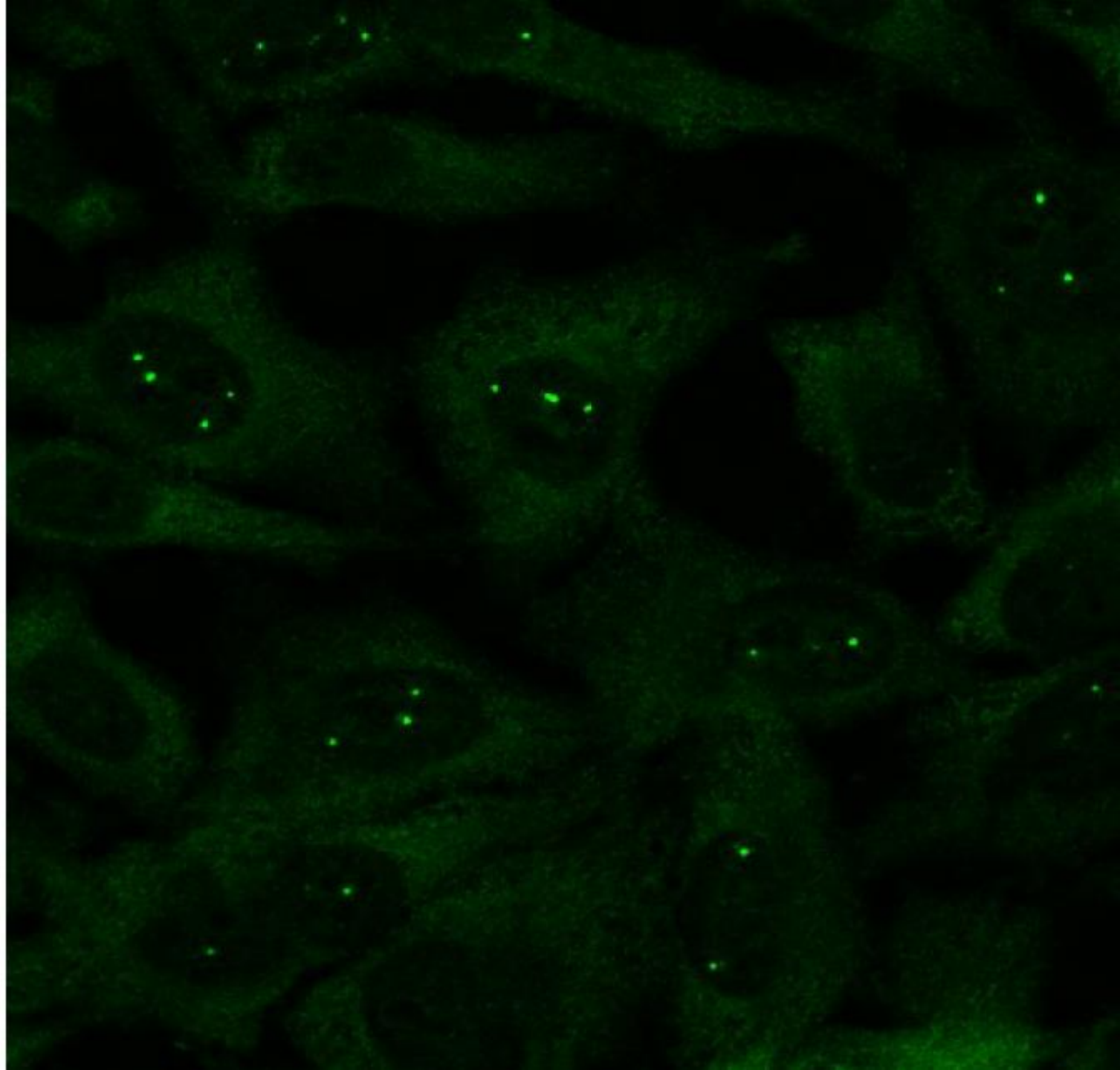
- Antigeny: protein Sp100, Gp210
- Klinická asociace: primární biliární cirhóza
- Pacienti s tímto onemocněním negativní na AMA → svědčí pro horší prognózu onemocnění

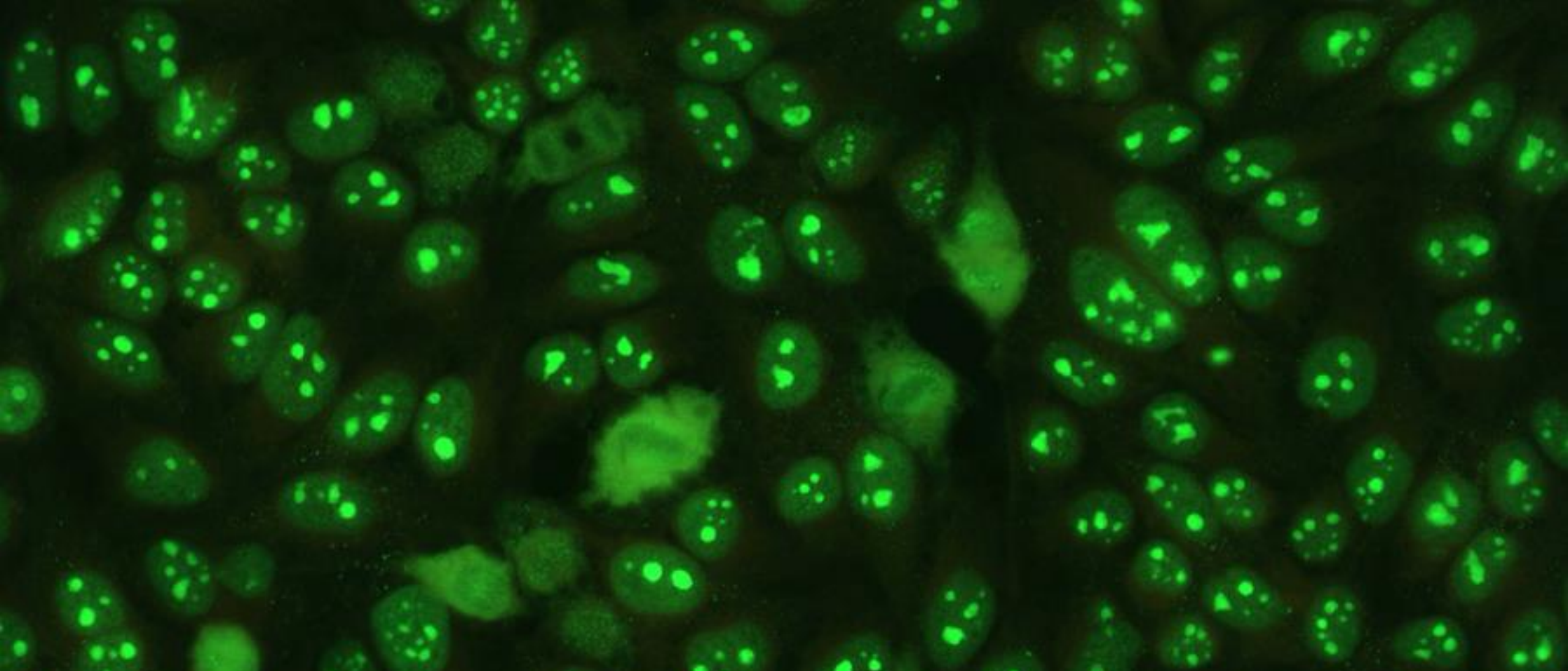


ANA

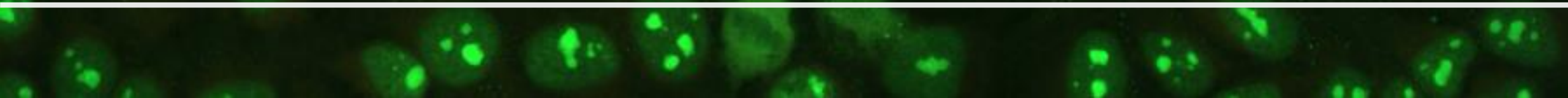
ojedinělé jaderné
tečky

- Antigen: coilin p-80
- Klinická asociace: autoimunitní a virová onemocnění jater





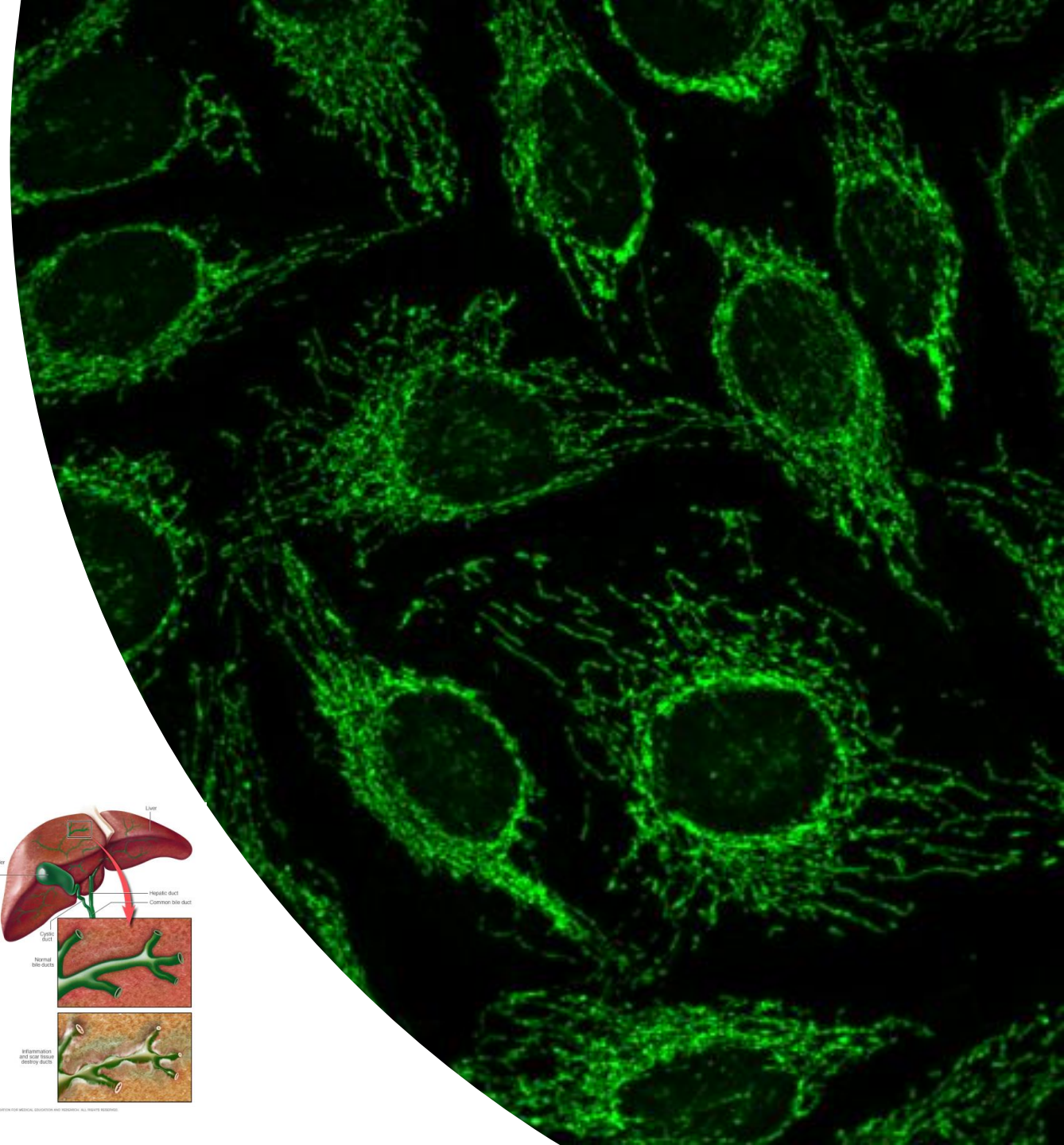
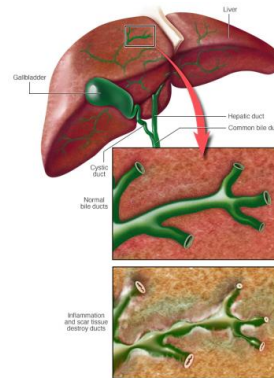
ANA – typ nukleolární (jadéřkový)
diagnóza: systémová sklerodermie



Hep-2 buňky - kromě fluorescence v jádře lze sledovat i fluorescenci v cytoplasmě

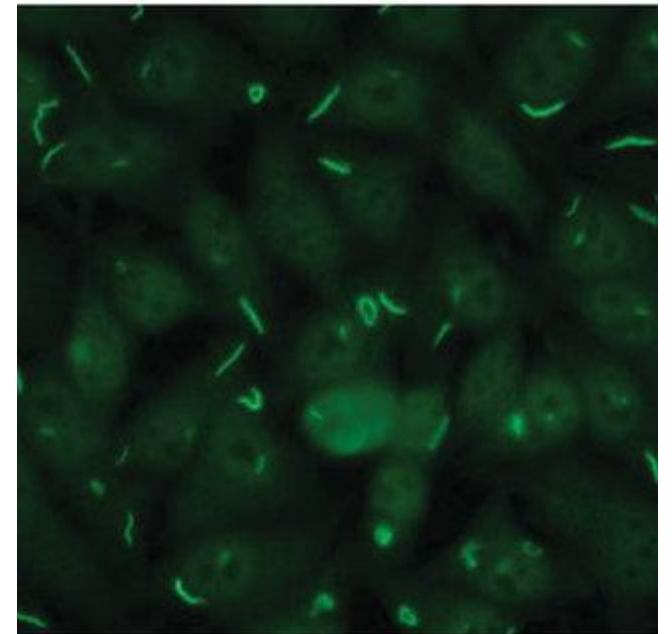
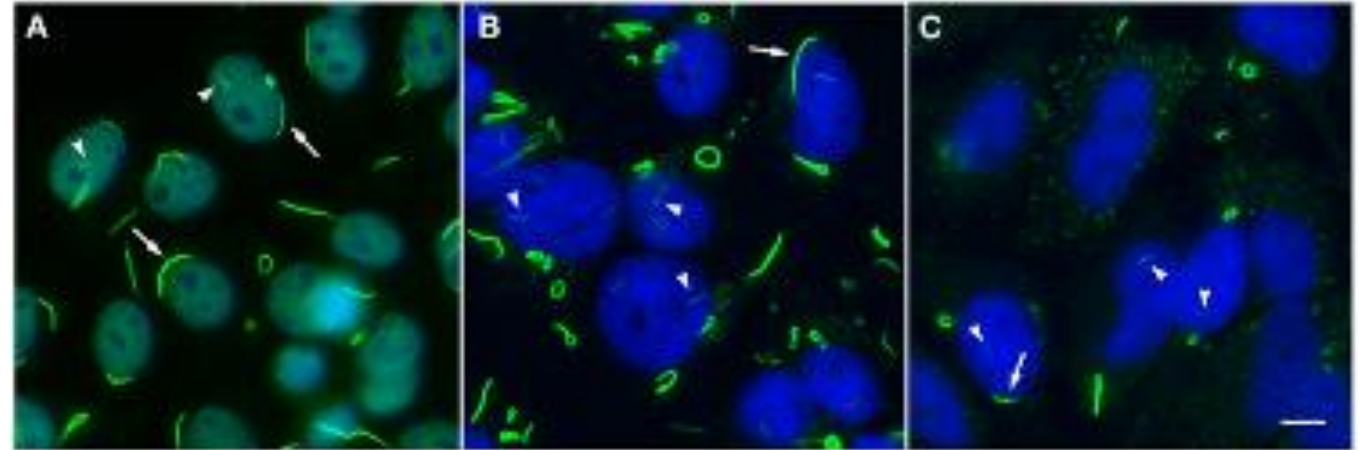
V cytoplasmě HEp2 buněk je možné pozorovat i další typy fluorescence – např. **mitochondriální – AMA** (anti-mitochondrial antibodies) – výskyt u onemocnění **primární biliární cirhóza**

Ale hlavním substrátem pro diagnostiku primární biliární cirhózy je **LKS** (liver, kidney, stomach)!



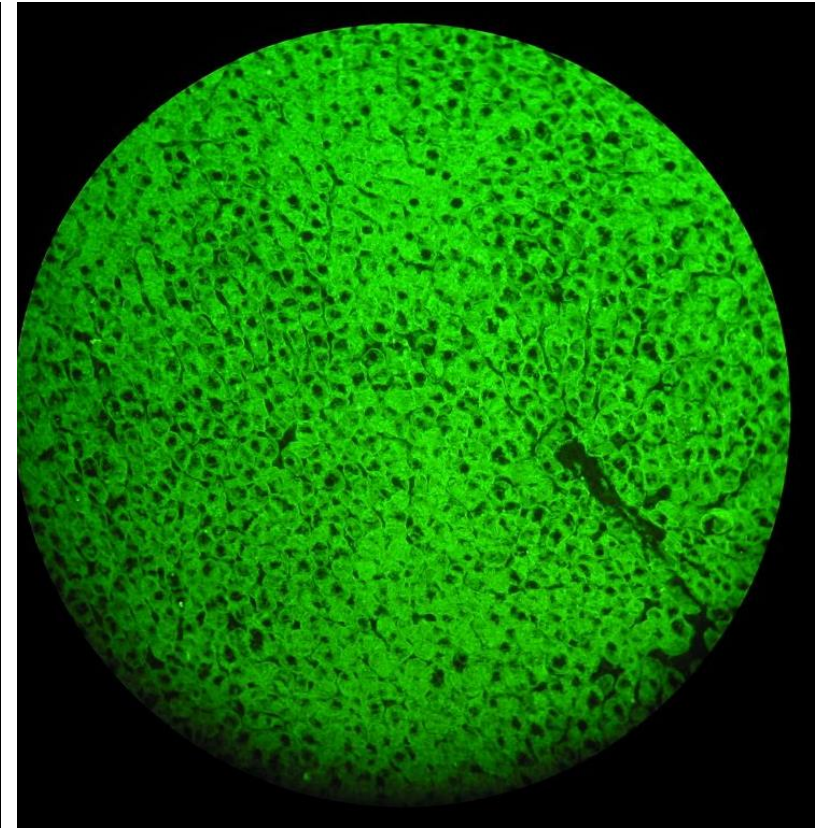
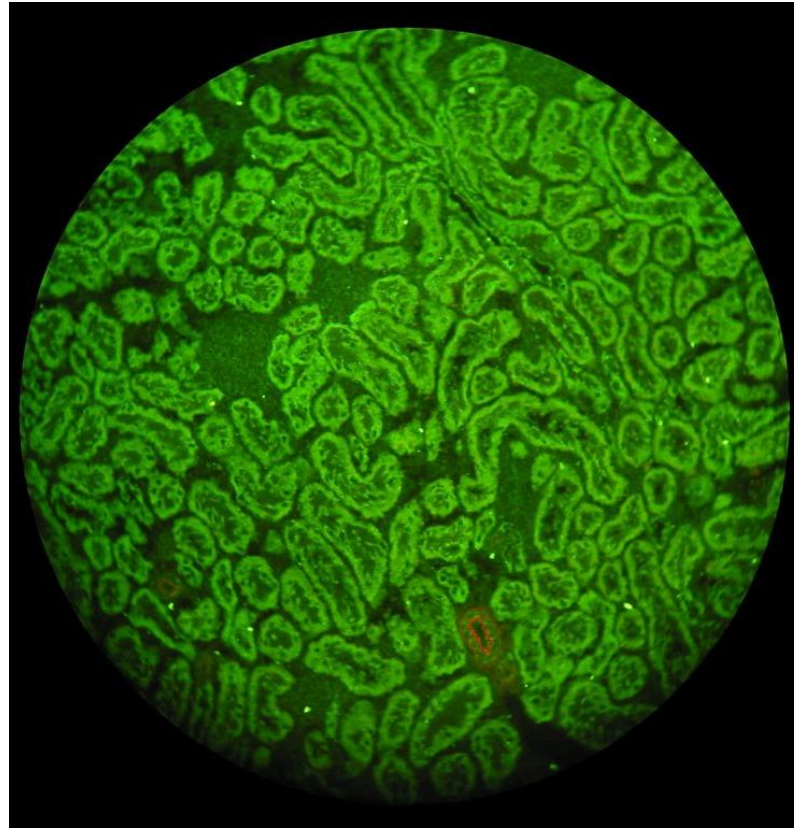
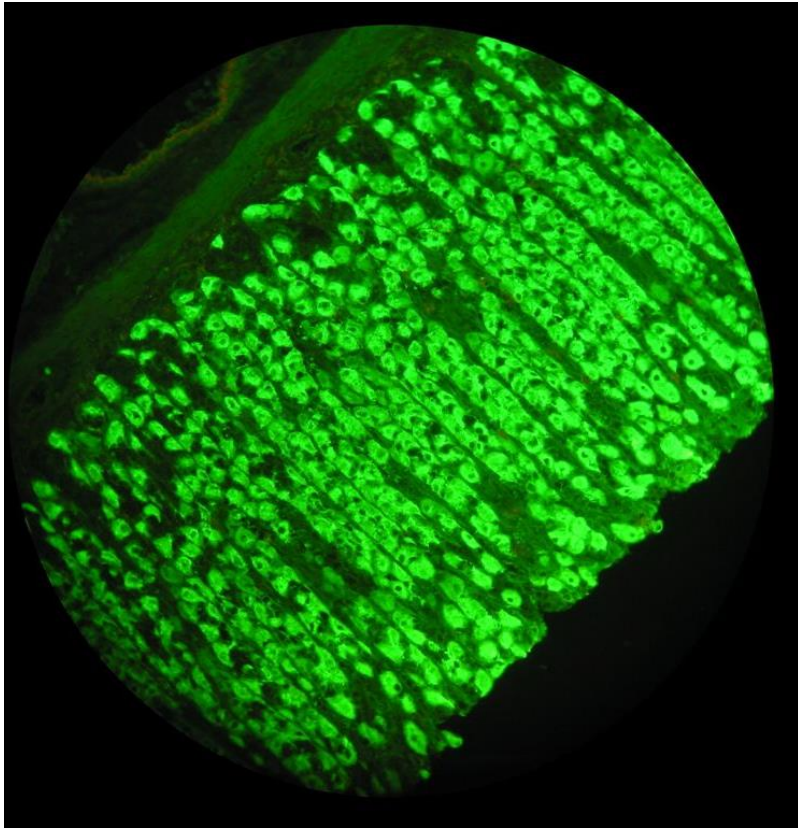
Nejaderné obrazy IF

- Obraz tyčinek a kroužků „rods and rings“
- „Lochmanovi červi“
- Asociace: u pacientů po terapii interferonem a ribavirinem při hepatitidě C
- Antigen: neznámý



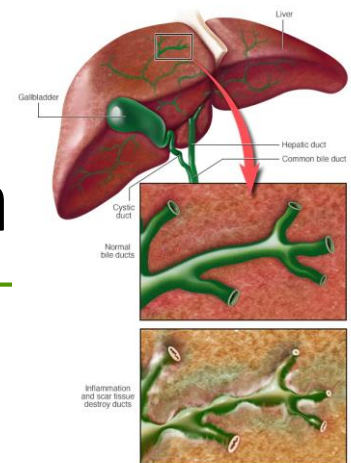
Substrát LKS

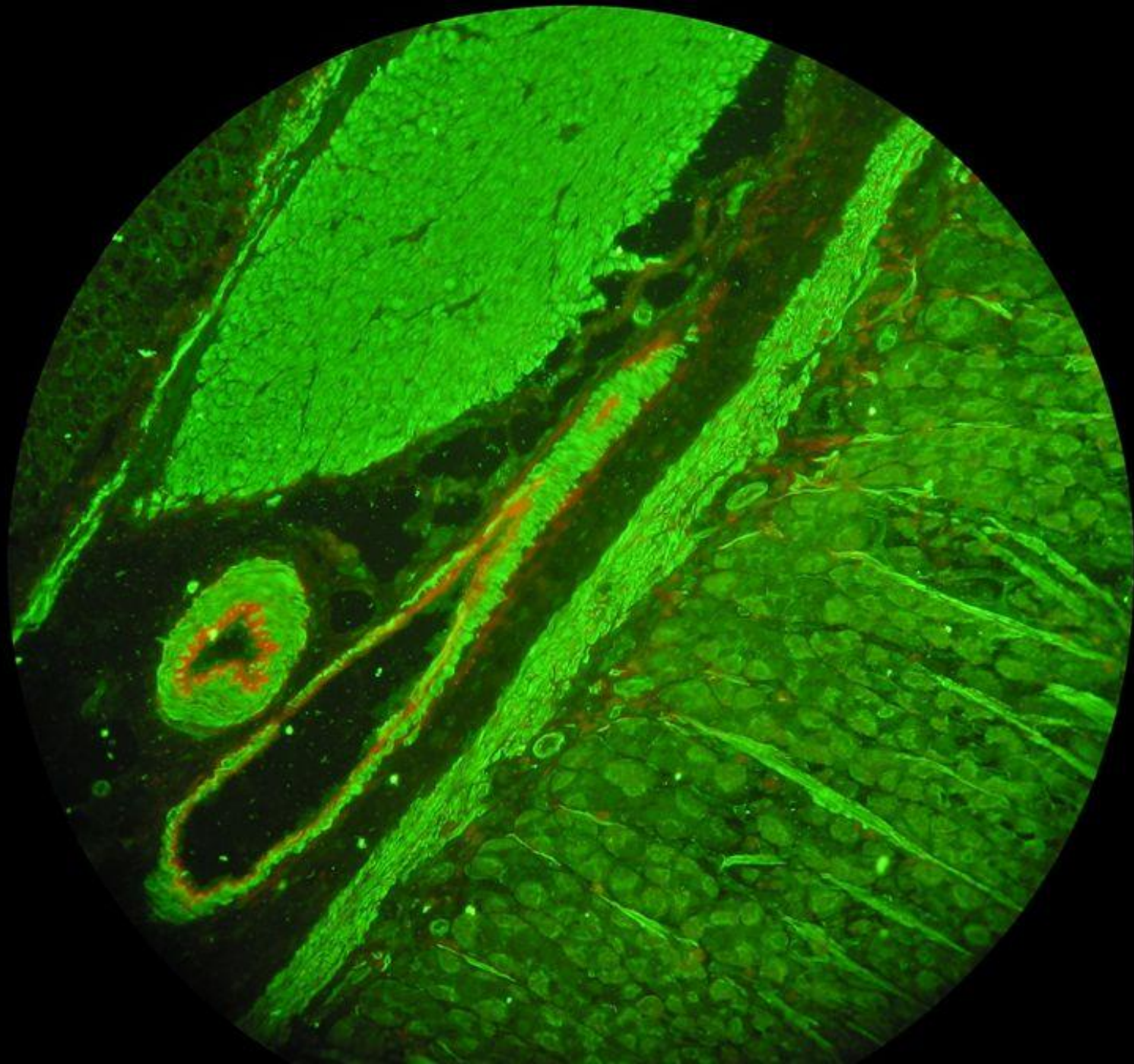
- Kombinace 3 krysích tkání
 - játra (Liver)
 - ledviny (Kidney)
 - žaludek (Stomach)
- Pozorujeme protilátky:
 - AMA (antimitochondriální) – primární biliární cirhóza
 - ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitní hepatitidy
 - GPC (proti parietálním buňkám žaludku) – prim. perniciózní anémie
 - RET (proti retikulinu) – celiakie (kontrola dodržování diety), mohou být pozitivní i u Crohnovy choroby



AMA (antimitochondriální Ab) – křysí žaludek, ledviny, játra

Mitochondrie jsou orgány obsažené v buňkách všech tkání – proto při přítomnosti AMA protilátek bude viditelná pozitivita ve všech třech typech tkáně.





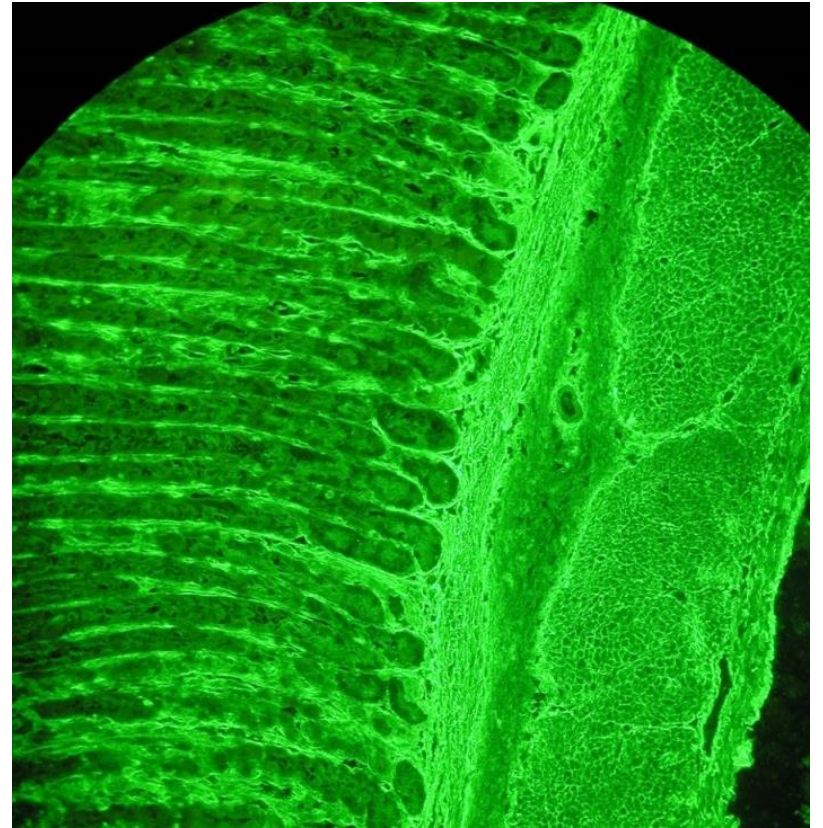
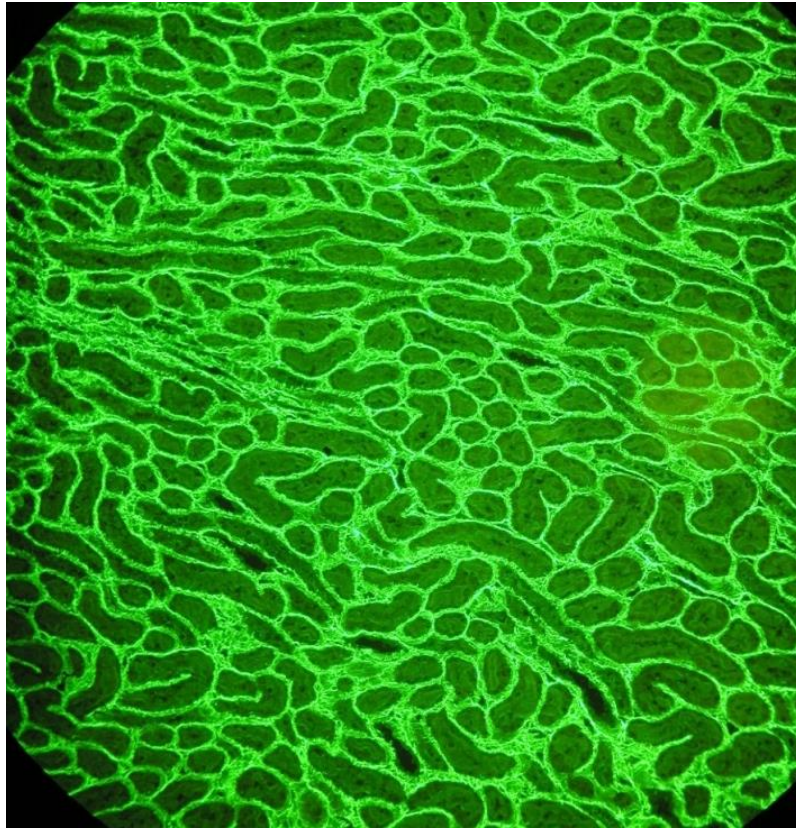
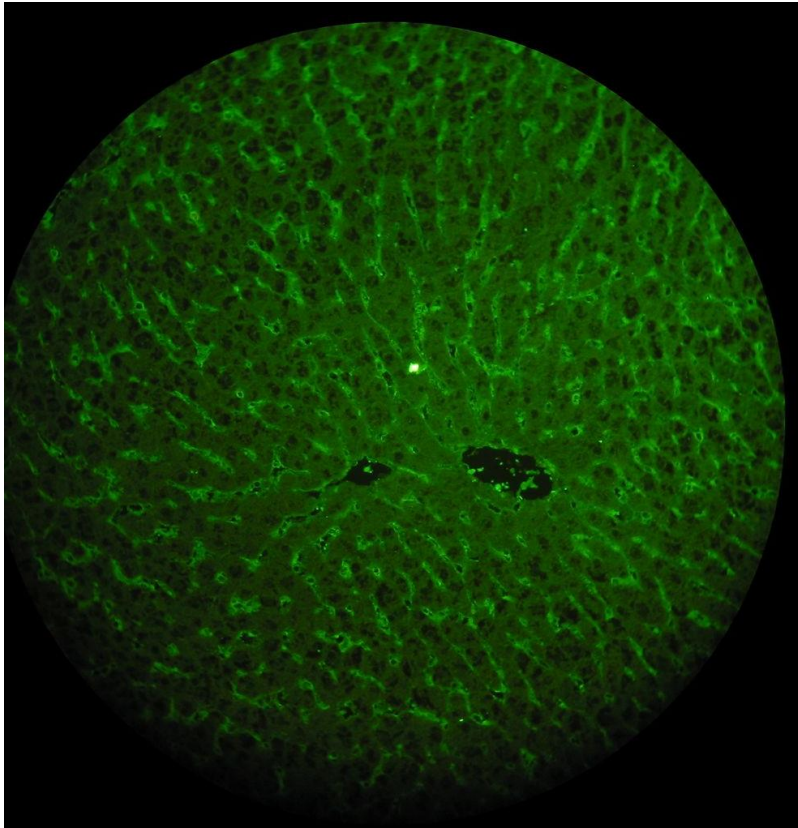
ASMA

(proti hladkému svalu)

– krysí žaludek

Při pozitivě ASMA svítí pouze struktury obsahující hladkou svalovinu, např.

- Cévy
- Stěna žaludku



RET (proti retikulinu) – krysí žaludek, ledviny, játra

Retikulin je mezibuněčnou složkou mezenchymální tkáně se značným množstvím antigenních determinant, protilátky jsou většinou ve třídě IgG, eventuálně IgA.

GPC = anti-Gastric Parietal Cell antibodies

Protilátky proti parietálním buňkám žaludku

- Výskyt u **perniciózní anemie**

- Přítomnost protilátek proti **parietálním buňkám žaludku**

(mohou se tvořit i autoprotiátky proti **vnitřnímu faktoru**, který parietální buňky produkují a který je nezbytný pro transport vitamínu B12 přes střevní sliznici, popř autoprotiátky, které blokují komplex vnitřní faktor+vitamin B12)

- Důsledek:

- Nedostatek vitamínu B12 (=kobalamin), který je nutný pro syntézu DNA

- Rozvíjí se megaloblastová anemie (viz. učebnice hematologie)

- Klinické příznaky

- Typické postižení jazyka – „Vyhlazený“ jazyk

- Subikterus

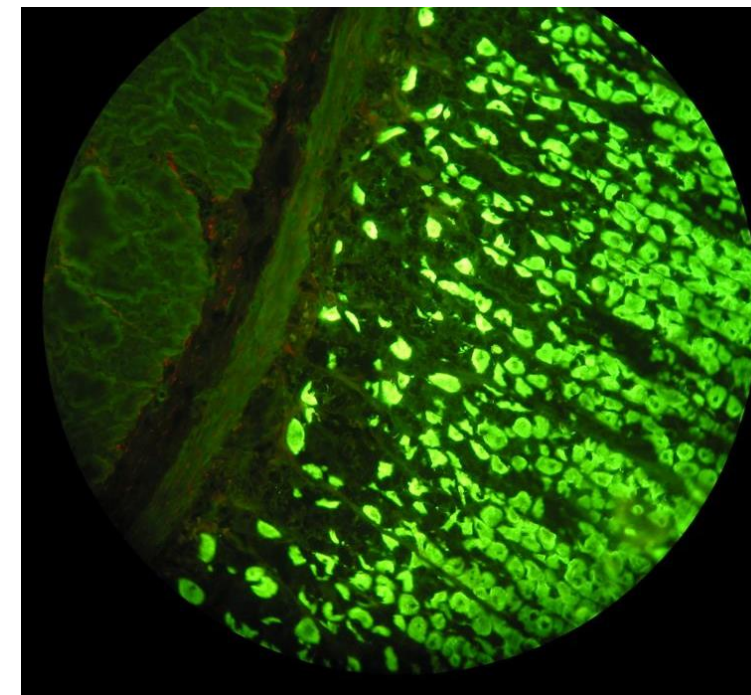
- Symetrické parestezie končetin

- Nechutenství, průjemy

- Perniciózní anemie bývá spojena s atrofickou gastritidou, častějším vývojem rakoviny žaludku a taktéž kolorektálního karcinomu

- Léčba – suplementace chybějících vitaminů – B12+kyselina listová

Substrát – krysí žaludek



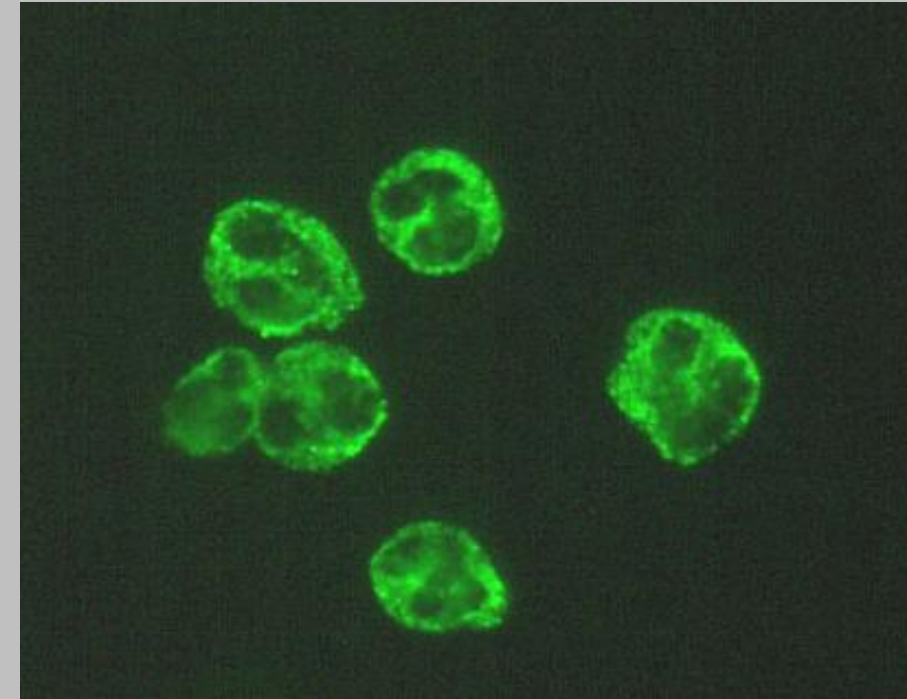
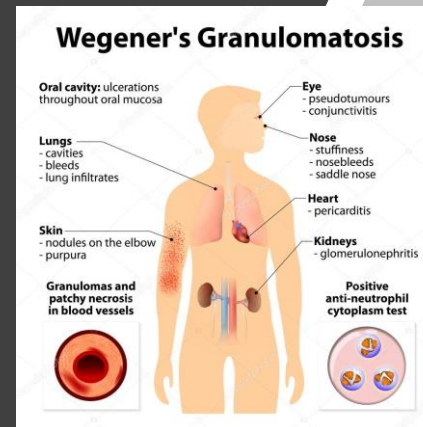
ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilů)

- Skupina protilátek proti některým vnitřním cytoplazmatickým strukturám neutrofilů
(**myeloperoxidáza, proteináza 3**, elastáza, laktoferin...)
- Vyskytují se obecně u **autoimunitních vaskulitid**
- Existuje několik typů positivity ANCA imunofluorescence (IF):
 - **pANCA** – perinukleární IF → antigenem je myeloperoxidáza (MPO) – **progresivní sklerotizující cholangitida, polyarteritidy**
 - **cANCA** – cytoplazmatická IF → antigenem je proteináza 3 (PR3) – **Wegenerova granulomatóza!**
 - **aANCA** – atypická IF – různé antigeny (elastáza, lysozym...) - má vazbu na ulcerózní kolitidu
- Substrát pro IF: ethanolem fixované neutrofilní granulocyty
- Kromě IF se pANCA a cANCA stanovují také ELISOU!

ANCA (protilátky proti cytoplasmě neutrofilů)

pANCA – perinukleární – antigenem je MPO (myeloperoxidáza)

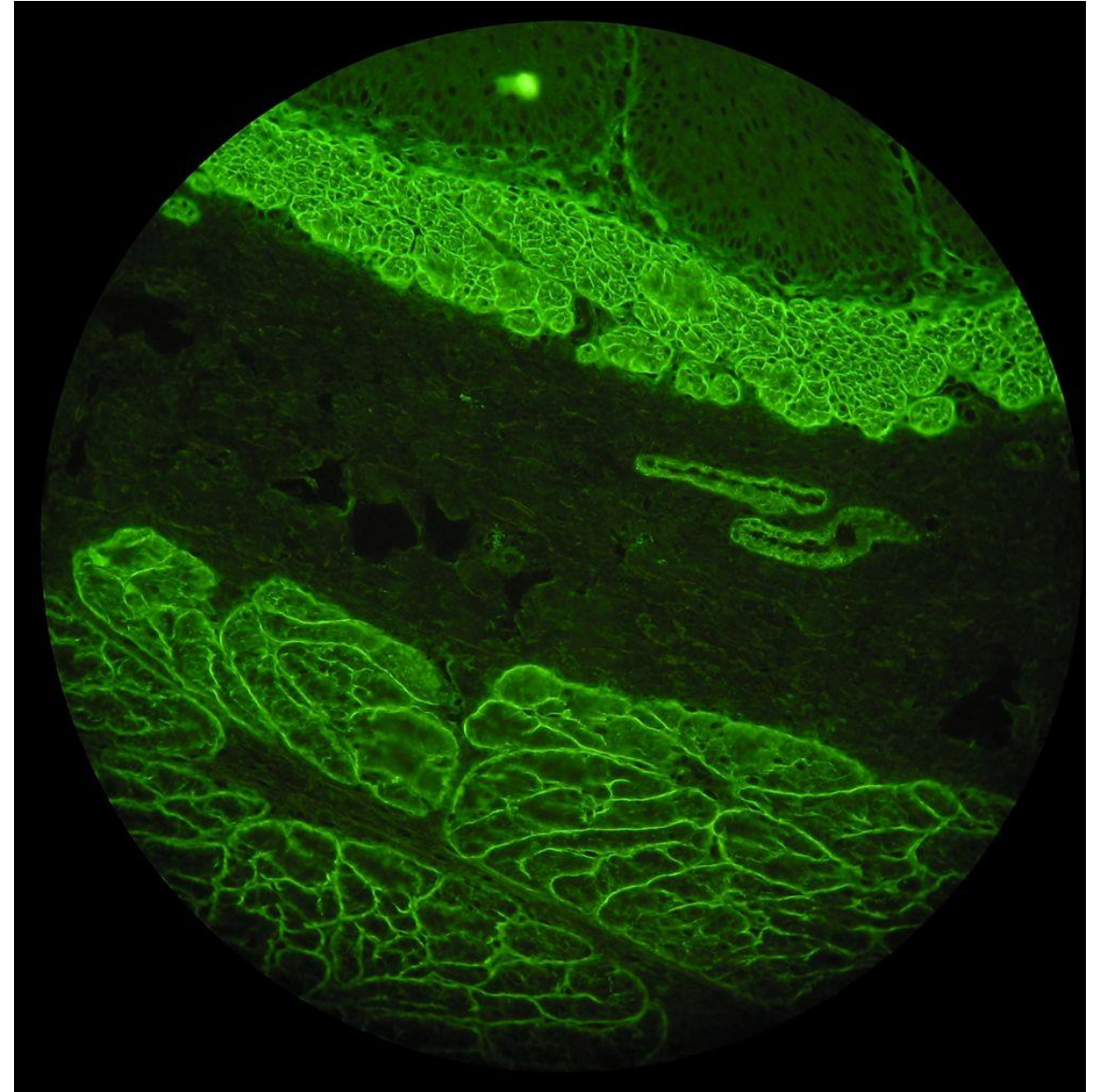
Atypická ANCA – různé antigeny (elastáza, lysozym, katepsin)



cANCA – cytoplazmatická – antigenem je PR3 (proteináza 3) – typická pro Wegenerovu granulomatózu s polyangitidou
pozitivní = vážná diagnóza = okamžite hlásit

EMA (protilátky proti endomysiu)

- Na řezu opičího jícnu
- Ag je TTG (tkáňová transglutamináza) (též lze stanovit ELISOU)
- Výskyt u *celiakie* (hlavně IgA)



Diagnostika celiakie

- 1) Stanovení celkového IgA
- 2) Nepřímá imunofluorescence – EMA – protilátky proti endomysiu → jedná se o nespecifické vyšetření – odhalí autoprotiátky proti určité tkáňové struktuře – zde endomysium
- 3) Zda se jedná konkrétně o protilátky proti tkáňové transglutamináze – anti-TTG (třída IgA, popř. IgG u nemocných s IgA deficitem) – ELISA

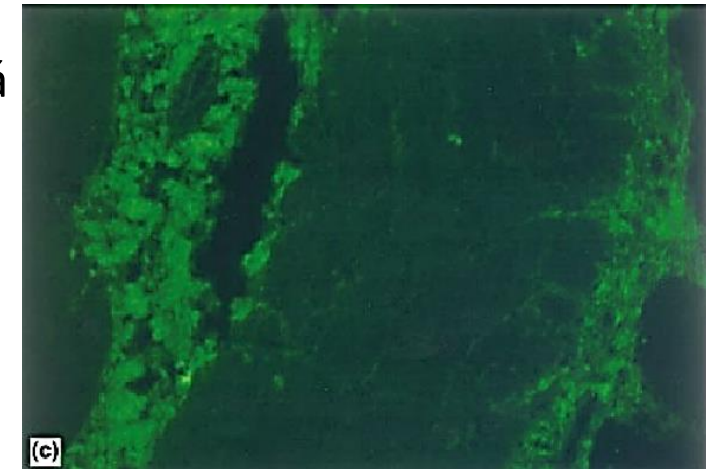
Imunologická laboratoř provádí pouze screening celiakie



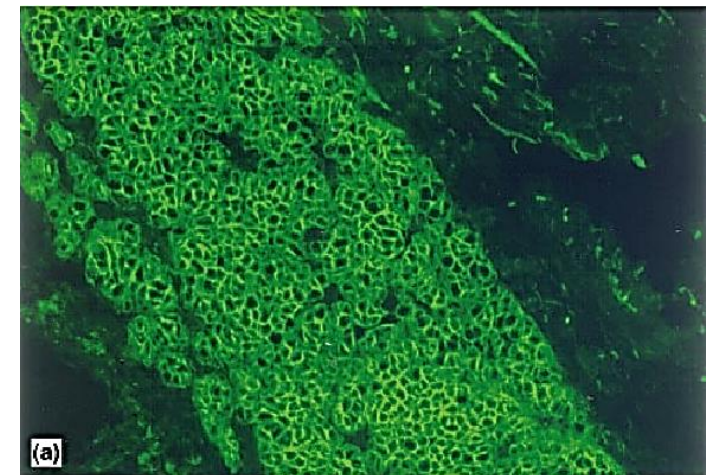
4) Definitivní potvrzení celiakie: gastroenterolog

- Enterobiopsie – odběr vzorků tkáně tenkého střeva na histologii →
 - Histologie - atrofie klků tenkého střeva
 - Histochemie - deficit enzymů kartáčového lemu enterocytů
 - **Změny na sliznici pouze u aktivní a tiché formy celiakie**
 - **Latentní forma** celiakie má pozitivní sérologii avšak normální architekturu sliznice!

Negativní obraz



Pozitivní obraz



Zvláštní postavení – ASCA protilátky

- Nejedná se o autoprotiátky (nejsou namířeny proti strukturám těla vlastním)
- Jedná o protilátky proti kvasince *Saccharomyces cerevisiae*
- Stanovení **ASCA** slouží k diferenciální diagnostice nespecifických střevních zánětů
 - **Crohnova choroba – ASCA pozitivní až v 81% případů** (+ pANCA pouze 18%)
 - Ulcerózní kolitida – ASCA pozitivní jen v 22% případů (+ pANCA až 70%)
- ASCA protilátky se stanovují ELISOU, ne imunofluorescencí!

Imunofluorescence

- Zlatý standard
- Na prvním místě– každá imunologická laboratoř by měla poskytovat stanovení autoprotilátek IF metodou
- Kombinace s **ELISA + ImunoBlot**
- Interpretace výsledků:
 - záleží na typu IF
 - pozitivní/negativní nebo titr Ab
 - **Pozor** – hladiny autoprotilátek narůstají s **věkem** (zvýšené hladiny tedy nemusejí nutně znamenat autoimunitní onemocnění)
 - Avšak u dětí jsou zvýšené hladiny patologické vždy

Protokol imunofluorescence

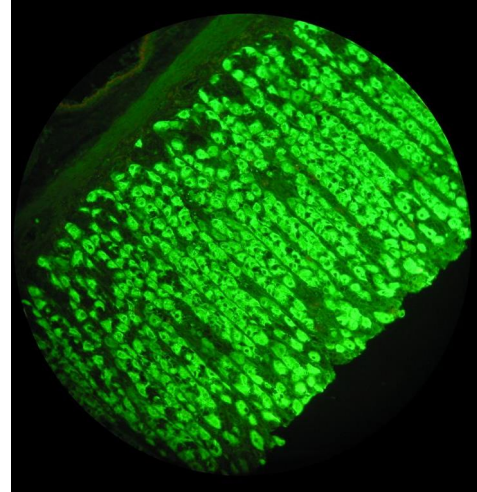
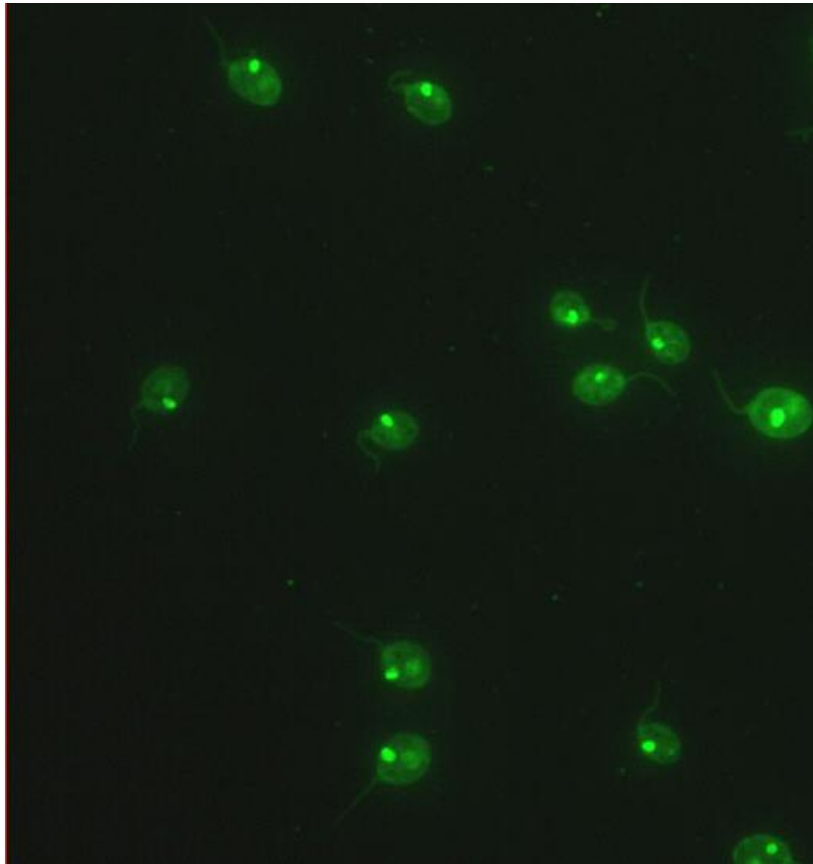
- 2 obrázky imunofluorescencí – popsat:
 - O jaký substrát se jedná, jaké skupiny autoprotilátek na něm lze stanovit
 - Jaká struktura na preparátu svítí
 - O jakou autoprotilátku by se mohlo jednat
 - U jakého (jakých) onemocnění ji nacházíme
 - Vybrat nejčastější onemocnění, se kterým je daná autoprotilátka asociována a stručně popsat
 - Klinika
 - Jaké další laboratorní vyšetření byste u pacienta s tímto onemocněním provedli (není nutné se vázat jen na imunologická vyšetření)

Společné otázky všem skupinám

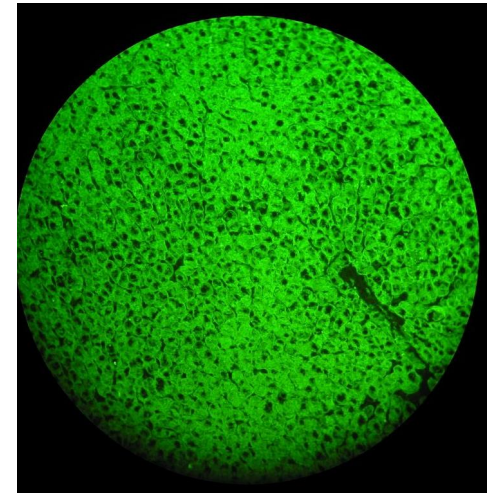
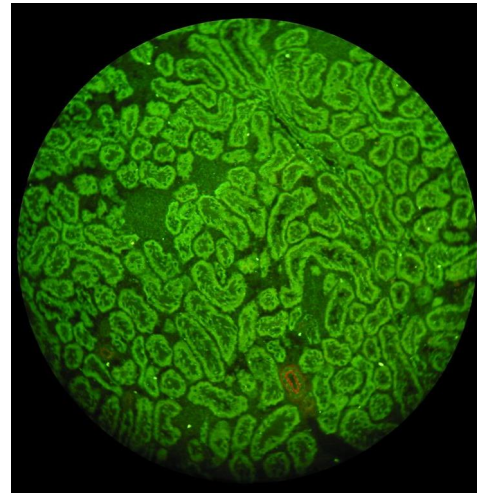
- Pokud je imunofluorescence pozitivní, stačí pro uzavření diagnózy pouze toto vyšetření?
- Pokud ne, jaká další vyšetření by byla potřeba? Bere se ohled na klinické příznaky?
- Hraje roli u stanovení autoprotilátek věk? Pokud ano jak?

Skupina 1 a 5

Obrázek A1

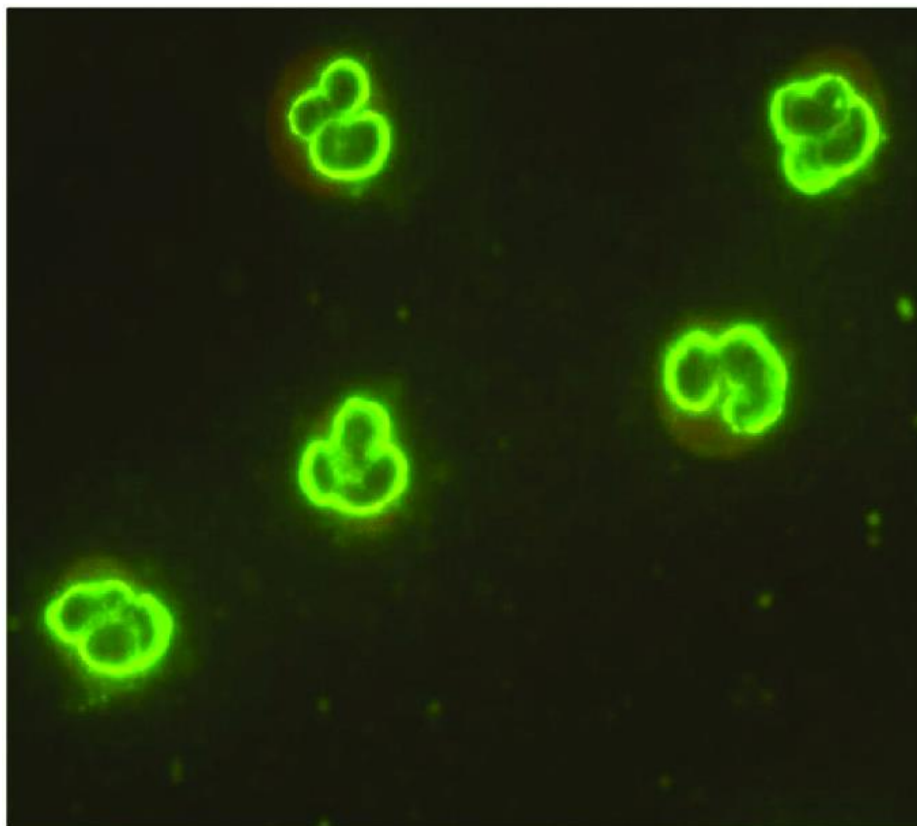


Obrázek A2:
kombinace 3 tkání
(jakých?), pozitivitu
vidíme ve všech třech

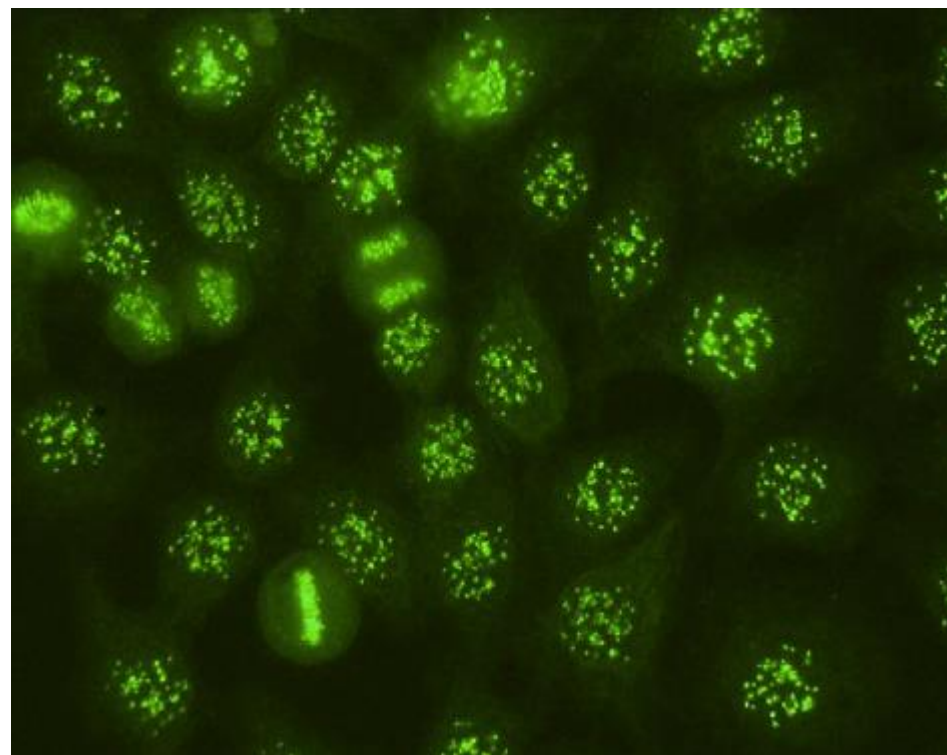


Skupina 2 a 6

Obrázek A2

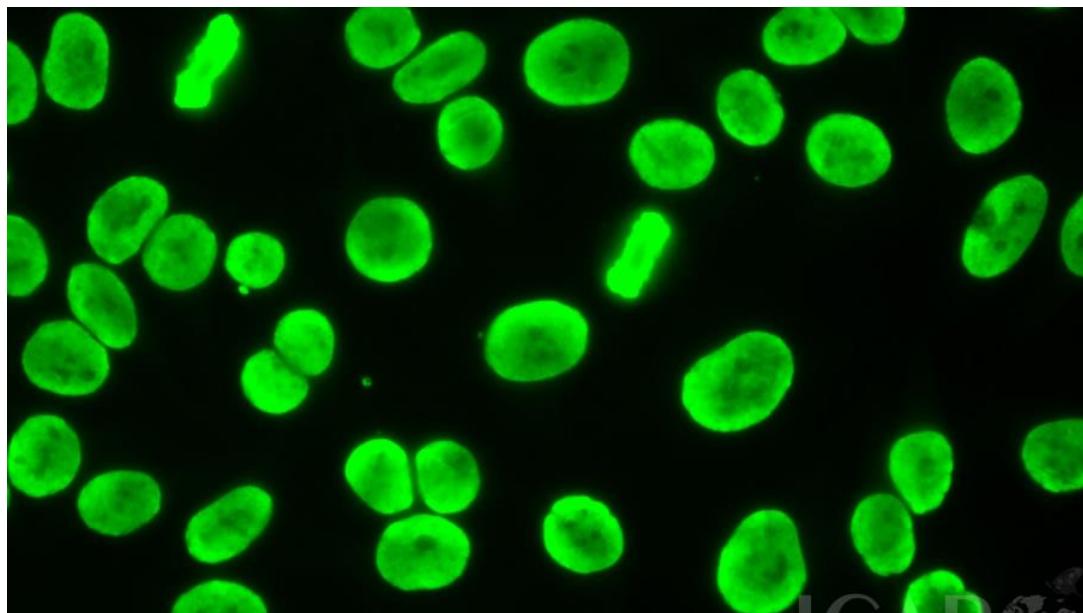


Obrázek 2B

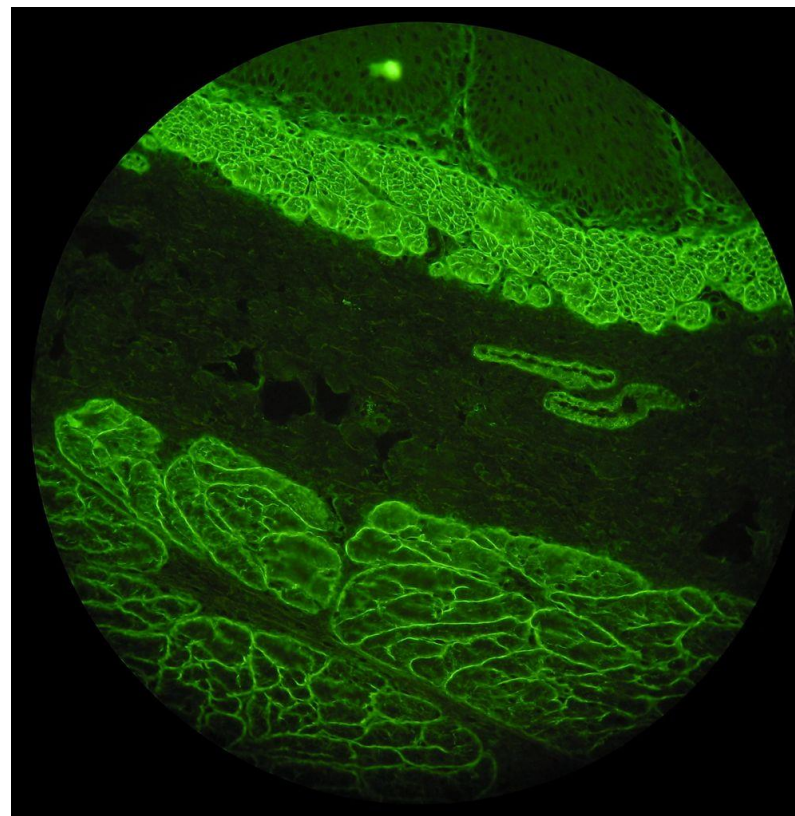


Skupina 3 a 7

Obrázek 3A

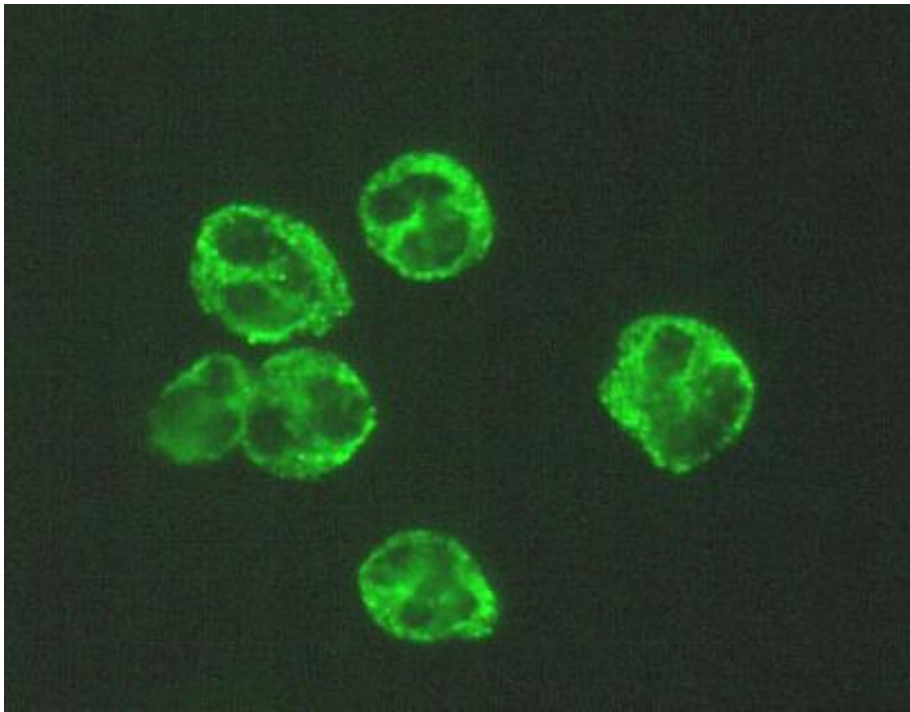


Obrázek 3B: opičí jícen



Skupina 4 a 8

Obrázek 4A



Obrázek 4B

Stěna
žaludku

Stěna
arterie a
vény

