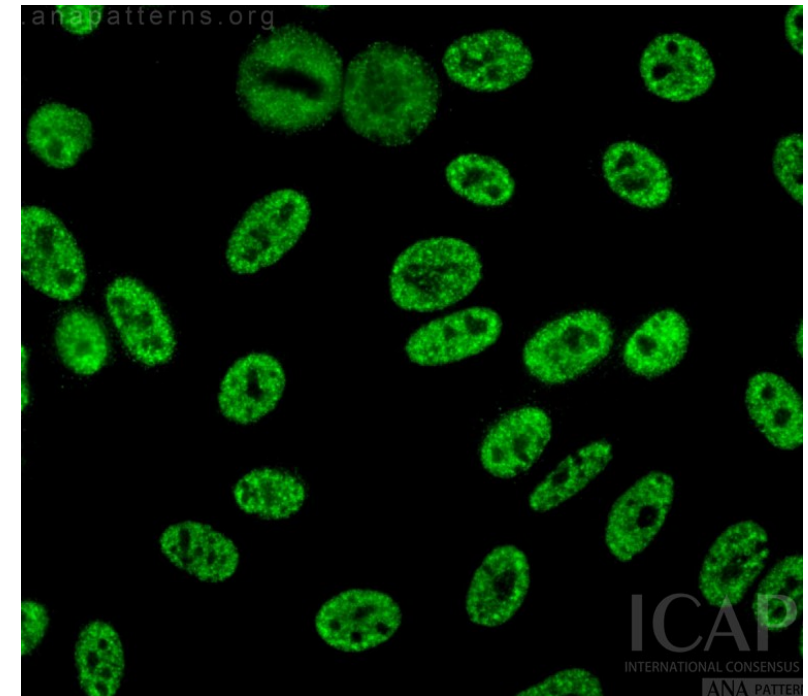




Imunofluorescence

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

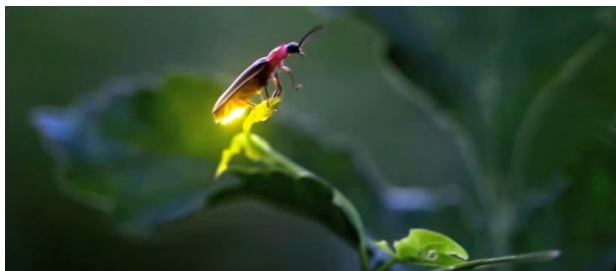
Fluorescence

- 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

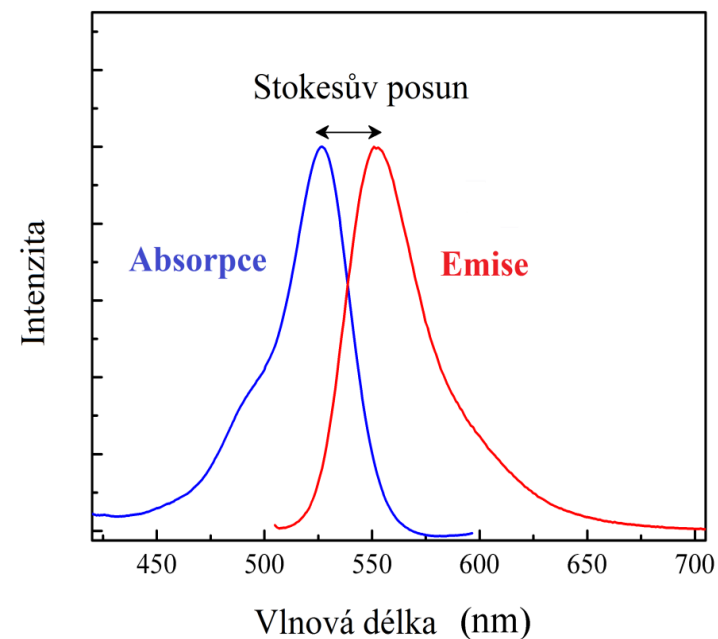
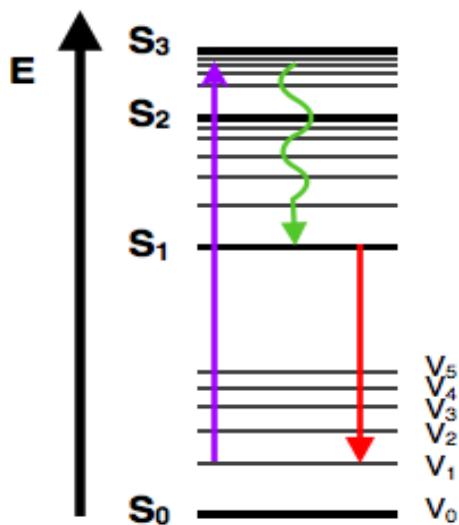
emise záření krátce po excitaci (10^{-8} až 10^{-5} s)

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

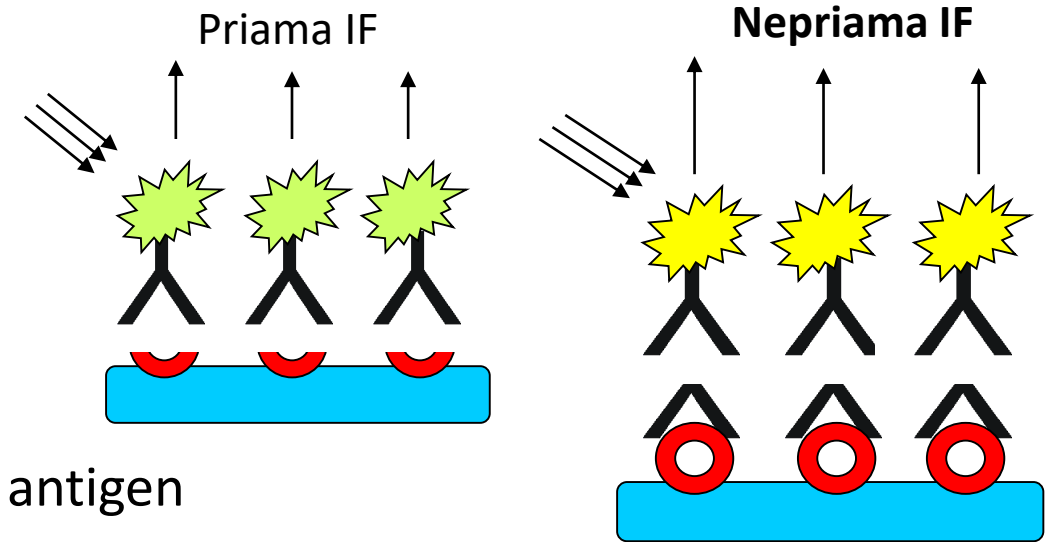
Využití: histologie – prokázání antigenu ve tkáni
mikrobiologie – rychlá detekce patogenů v biologickém materiálu

➤ Nepřímá IF

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

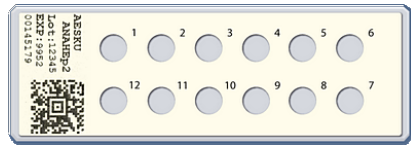
1. Na sklíčko se substrátem se nanese vyšetřovaný materiál (sérum), pokud jsou v něm přítomné hledané protilátky, naváží se na antigenní substrát na sklíčku
2. Nanese se konjugát, který se váže na protilátku příslušné izotypové třídy (IgG/IgA)

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

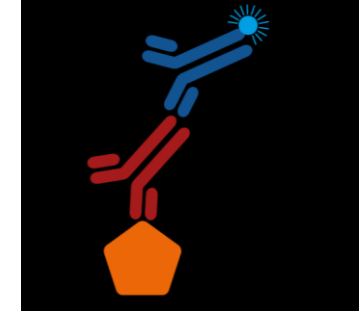
2. Pokud autoantitělům v séru pacienta je cílový antigen přítomen v antigenním substrátu (řez tkáně)



3. Promytí skel v
PBS+TWEEN – 5 min



4. Aplikace fluorescenčně značených sekundárních antitěl (FITC) – nejčastěji

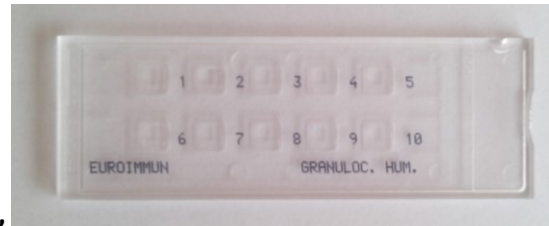


5. Inkubace 30 min
v temnu



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



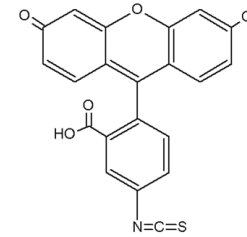
Imunofluorescence



Antigenní substráty používané při nepřímé IF

- **Buňky HEp2** (Human Epithelial) – detekce **ANA** (anti-nukleární protilátky)
 - odvozené z linie HeLa (karcinom děložního čípku)
 - rychle se dělící 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 svaly), **GPC** (gastic parietal cells), **RET** (Ab proti retikulínu) ...
 - kombinace 3 potkaních tkání

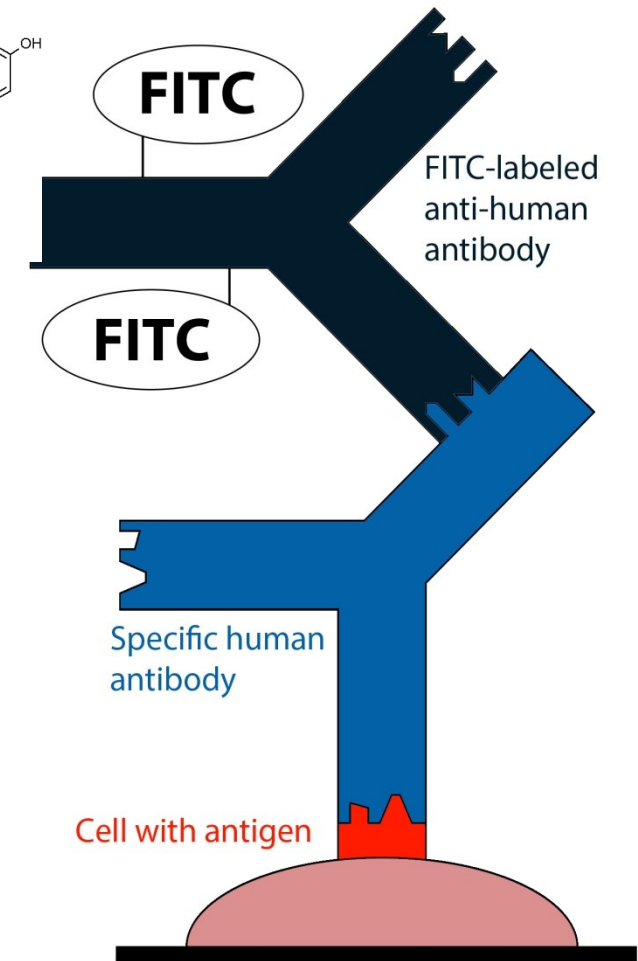
Konjugát



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

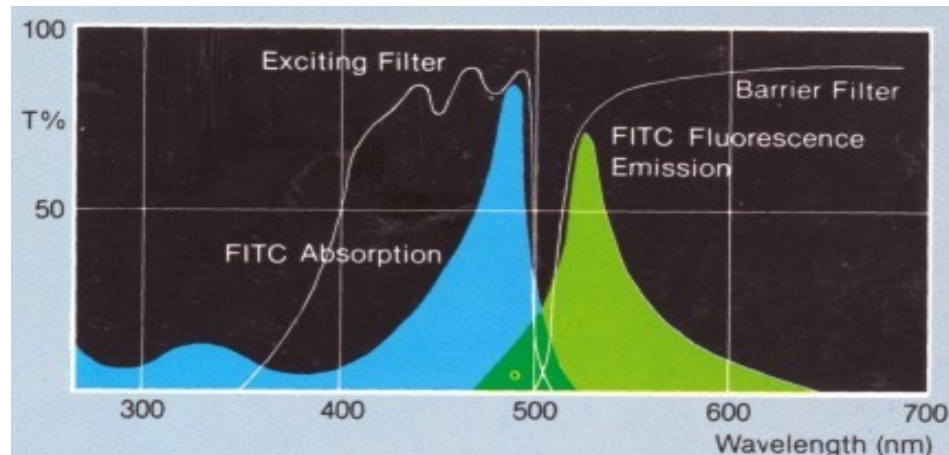
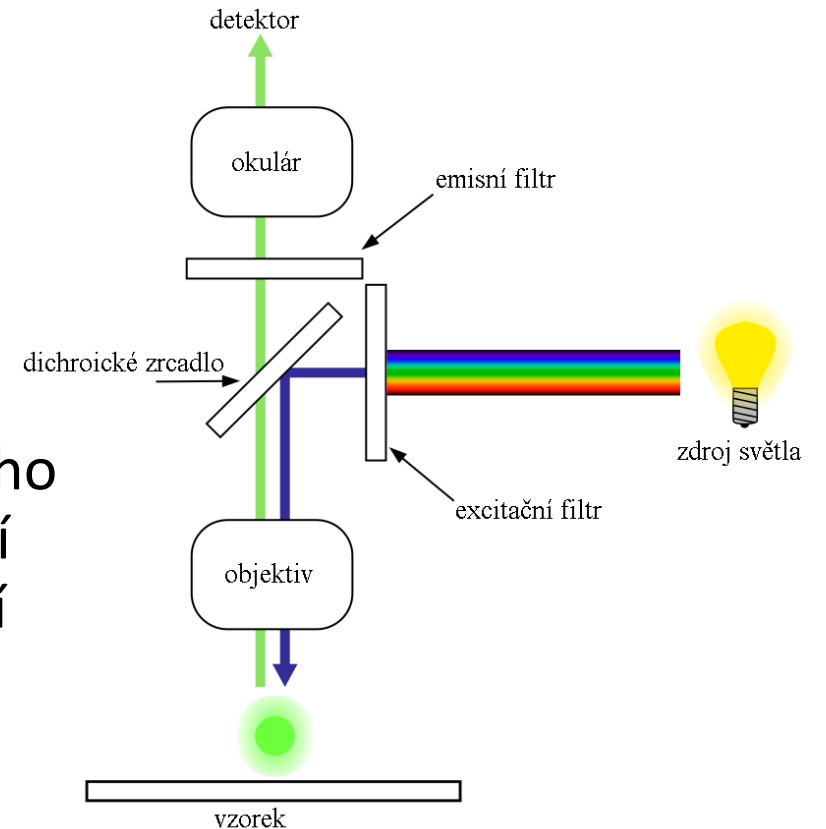
excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (zelené světlo)

- 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 autoprotilátek v určité izotypové třídě (např. celiakie – IgA)



Fluorescenční mikroskop

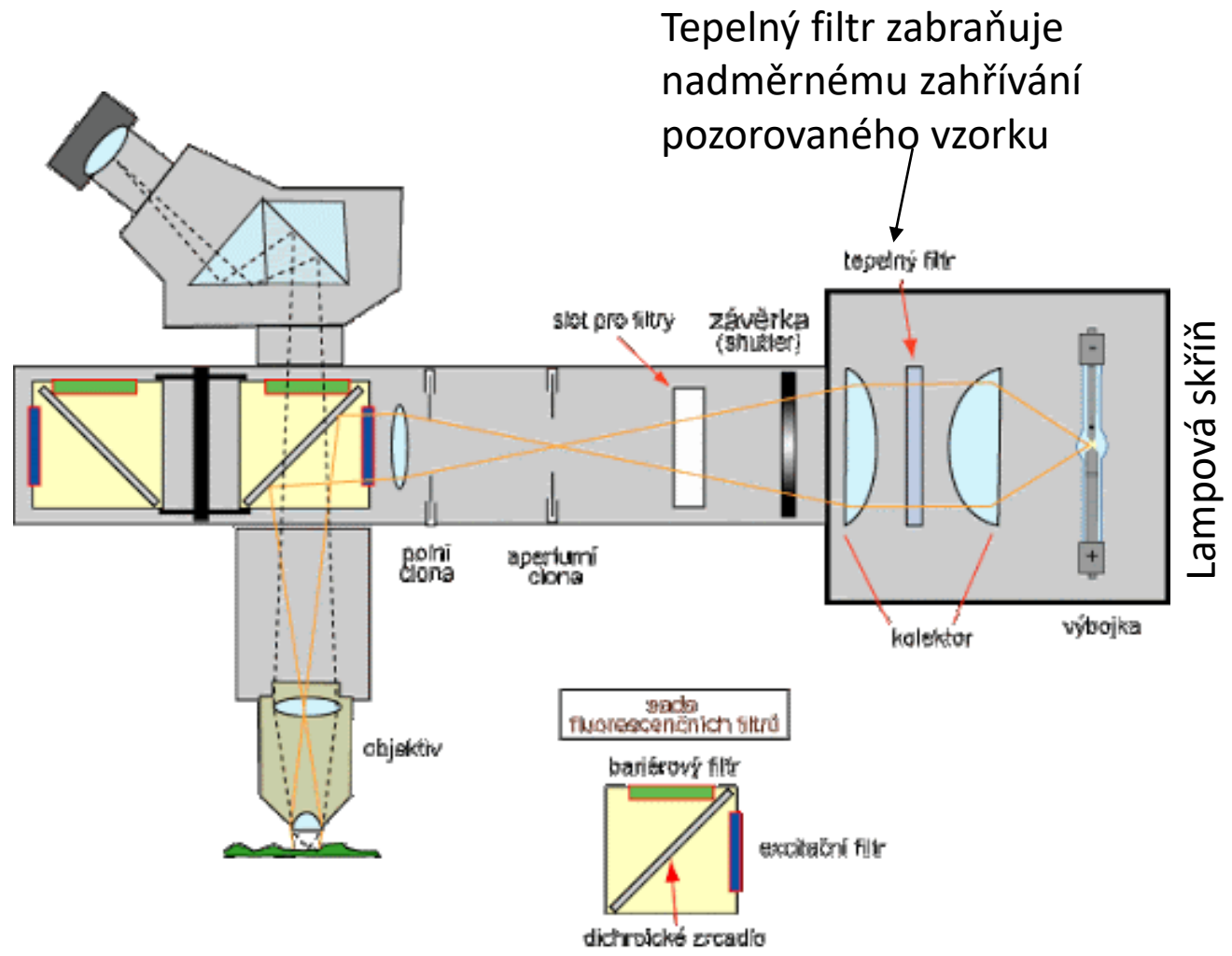
- Zdroj světla – rtuťová výbojka, **LED dioda**
- Excitační filtr – propouští pouze část spektra potřebného pro excitaci fluorochromu a zabraňuje přechodu záření v oblasti emisní vlnové délky, která by vytvářela pozadí
- Emisní (bariérový) filtr – propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu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



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

Součástí moderních fluorescenčních mikroskopů je také počítač s monitorem

Schéma fluorescenčního mikroskopu



Laboratorní postup při podezření na autoimunitní onemocnění

- Celý proces začíná v ordinaci lékaře
 - Ordinuje vyšetření na autoprottilátky – 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		
Autoprottilátky 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 prottilátky proti IgA 	Autoprottilátky: <ul style="list-style-type: none"> ANA (IF) ANA (BLOT) ANCA ASMA RF RF (IgG, IgA, IgM) 	Imunoglobuliny <ul style="list-style-type: none"> IgD podtřídy IgA (IgA1-IgA2) podtřídy IgG (IgG1-IgG4) * kryoglobulin
	Buněčné testy <ul style="list-style-type: none"> základní buněčné vyšetření (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+) CD14+ HLADR+ * další CD znaky HLA B27 * proliferační testy * bronchoalveolární laváž-BAL CD3+ CD4+ CD8+ 	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
	Fagocytární testy <ul style="list-style-type: none"> * burst test * stanovení přítomnosti myeloperoxidázy 	Proteiny akutní fáze <ul style="list-style-type: none"> CRP alfa-1-antitrypsin alfa-2-makroglobulin ceruloplasmin orosomukoid prealbumin transferin
	Cirkul. imunokomplexy <ul style="list-style-type: none"> CIK PEG CIK C1q 	Imunoglobuliny <ul style="list-style-type: none"> IgG IgA IgM IgE

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 autoprotilátek, které jsou zaměřeny vůči různým **jaderným strukturám** (např. centromera, mitotický aparát, DNA, histony..)
- Výskyt u **systémových** autoimunitních onemocnění
- Jedná o nejčastěji stanovované autoprotilátky 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



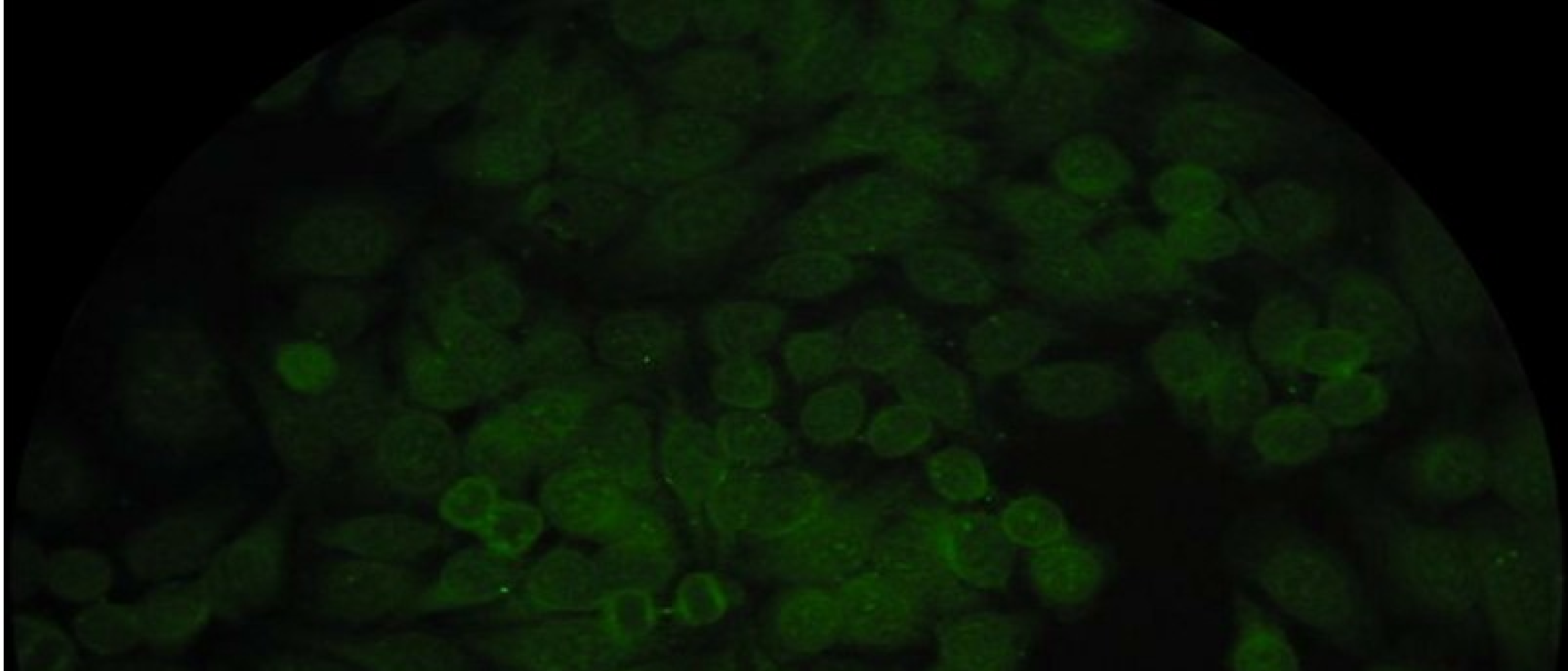
První čtení - odečtení IF při ředění 1:80



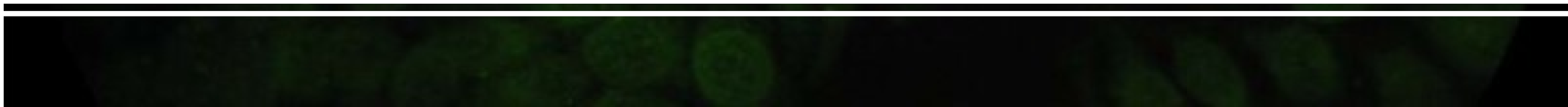
Pokud je vzorek pozitivní, odečítající VŠ indikuje vyšetření opakovat druhý den s vyšším ředěním (1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) – ředění záleží na intenzitě fluorescence daného vzorku a vyžaduje zkušenosti odečítajícího

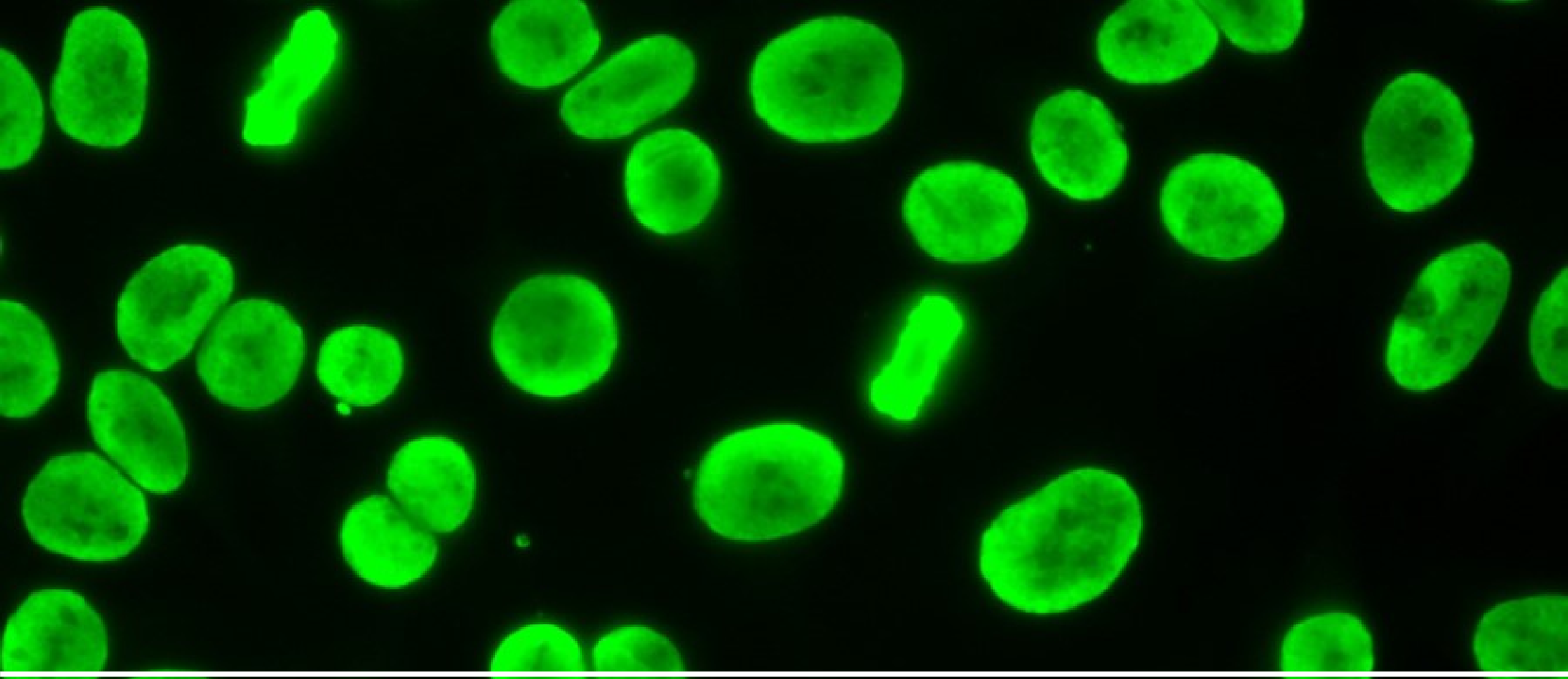


Po zpracování skel s vyšším ředěním následuje druhé čtení. Pokud je vzorek pozitivní i při ředění 1:1280 → výsledek se vydává jako „vyšší než 1280“



Hep2 buňky – negativní obraz





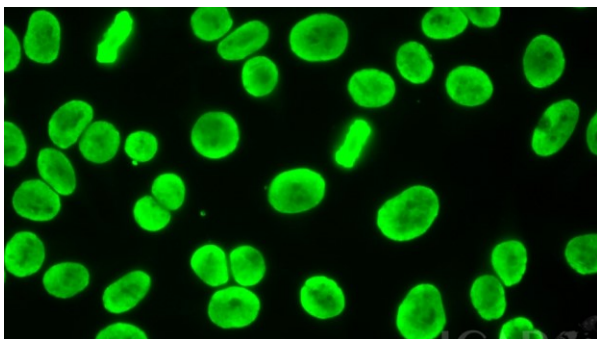
ANA – typ homogenní

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

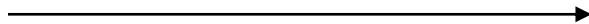
ANA – homogenní typ fluorescence

- U homogenního typu fluorescence svítí celé jádro Hep-2 buněk
- Nelze rozlišit, zda jsou přítomné autoprotiátky 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 autoprotiátky proti dsDNA → typické pro **SLE** (systémový lupus erythematosus)

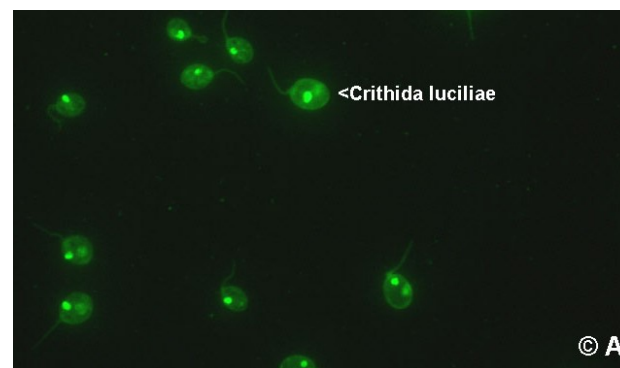
1. ANA protiátky – homogenní typ fluorescence

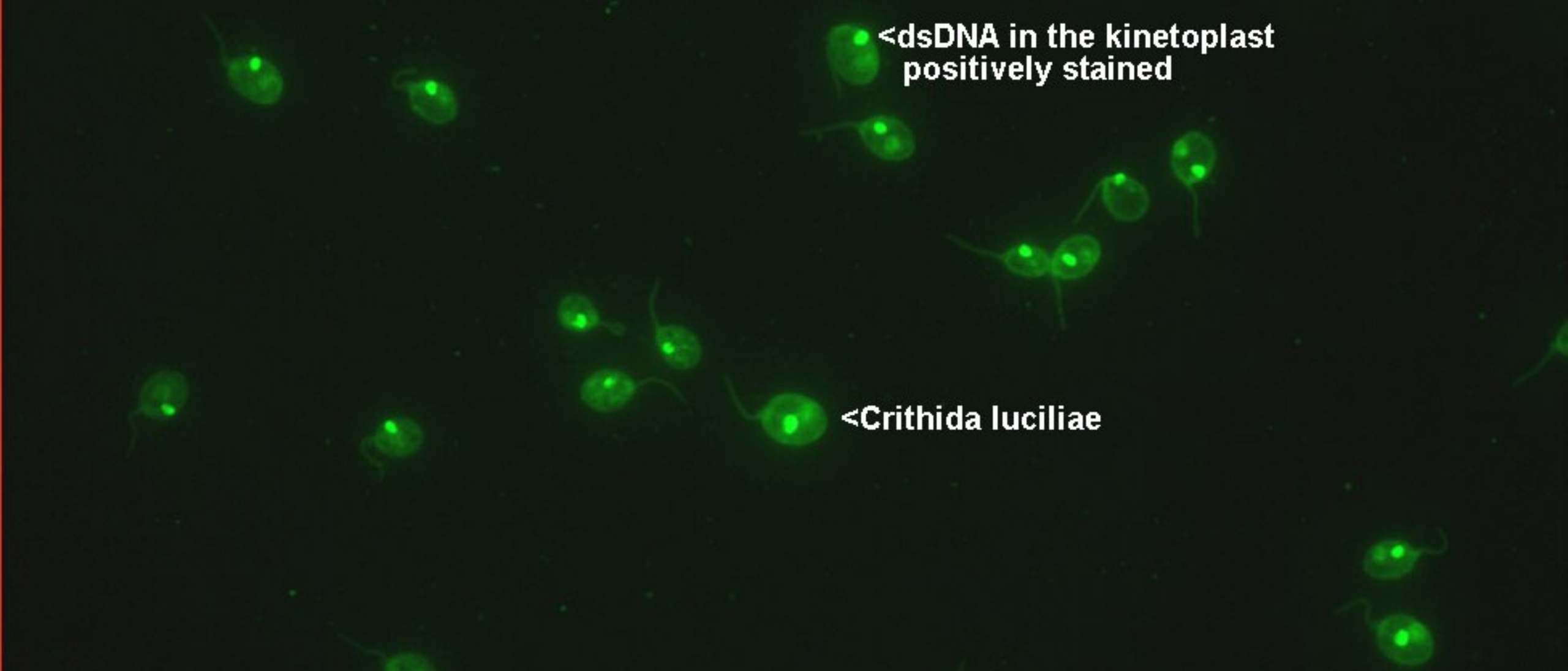


2. Sérum pacienta aplikováno na substrát *Crithidium luciliae*



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

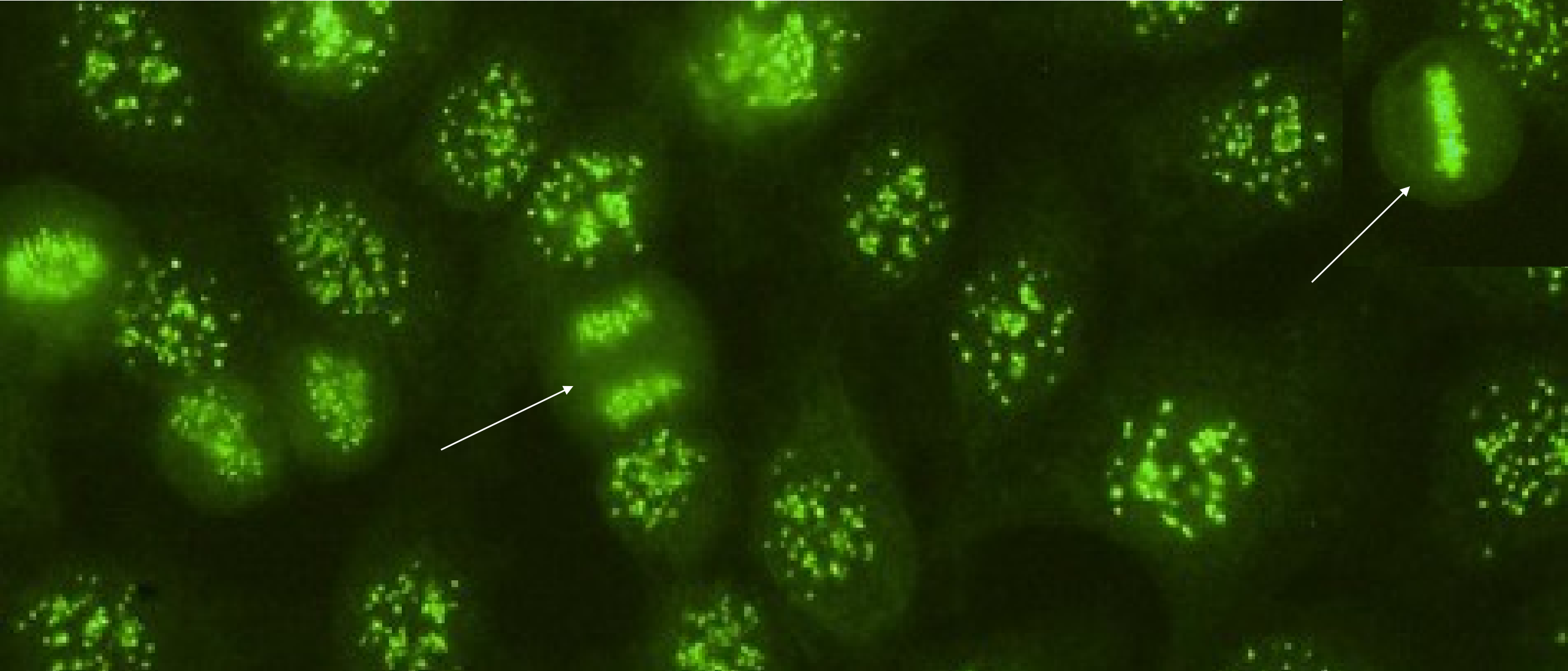




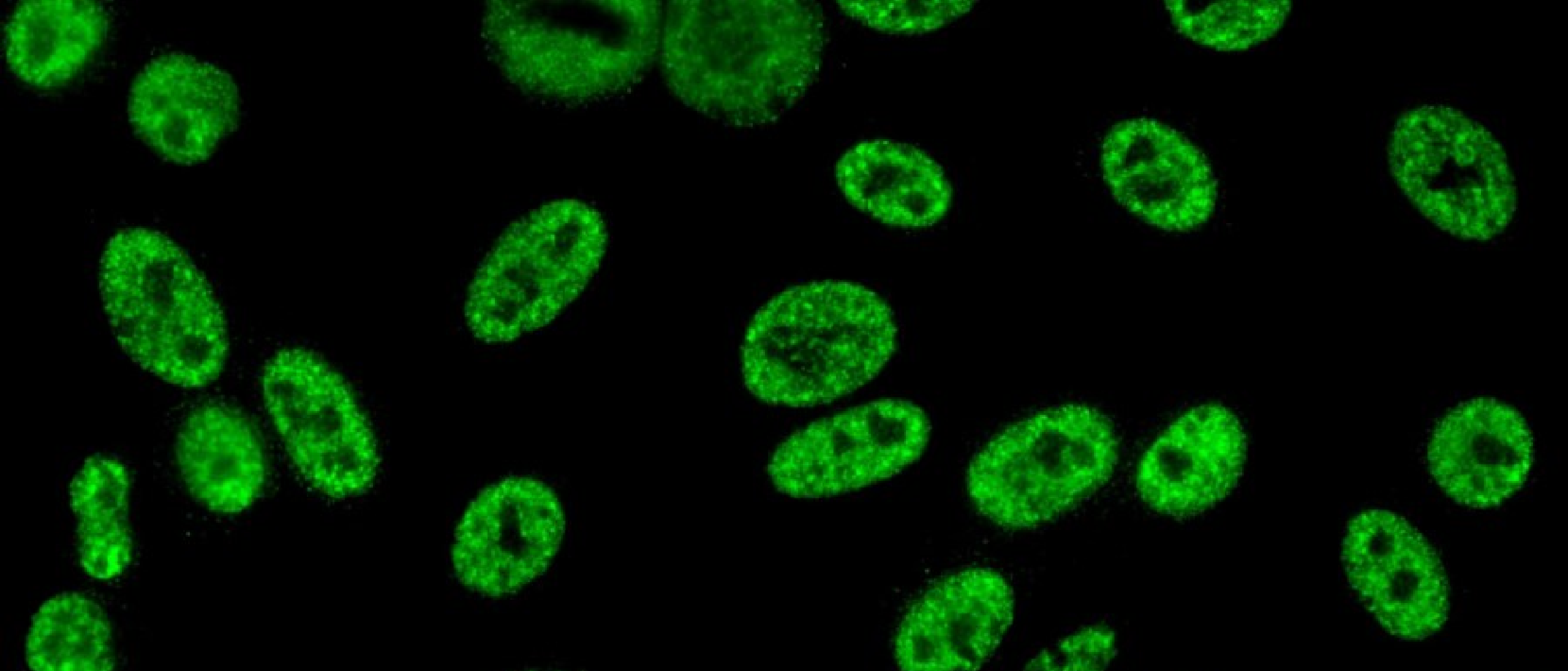
<dsDNA in the kinetoplast
positively stained

<Crithida luciliae

Prvok Crithidia luciliae – antigen je dsDNA



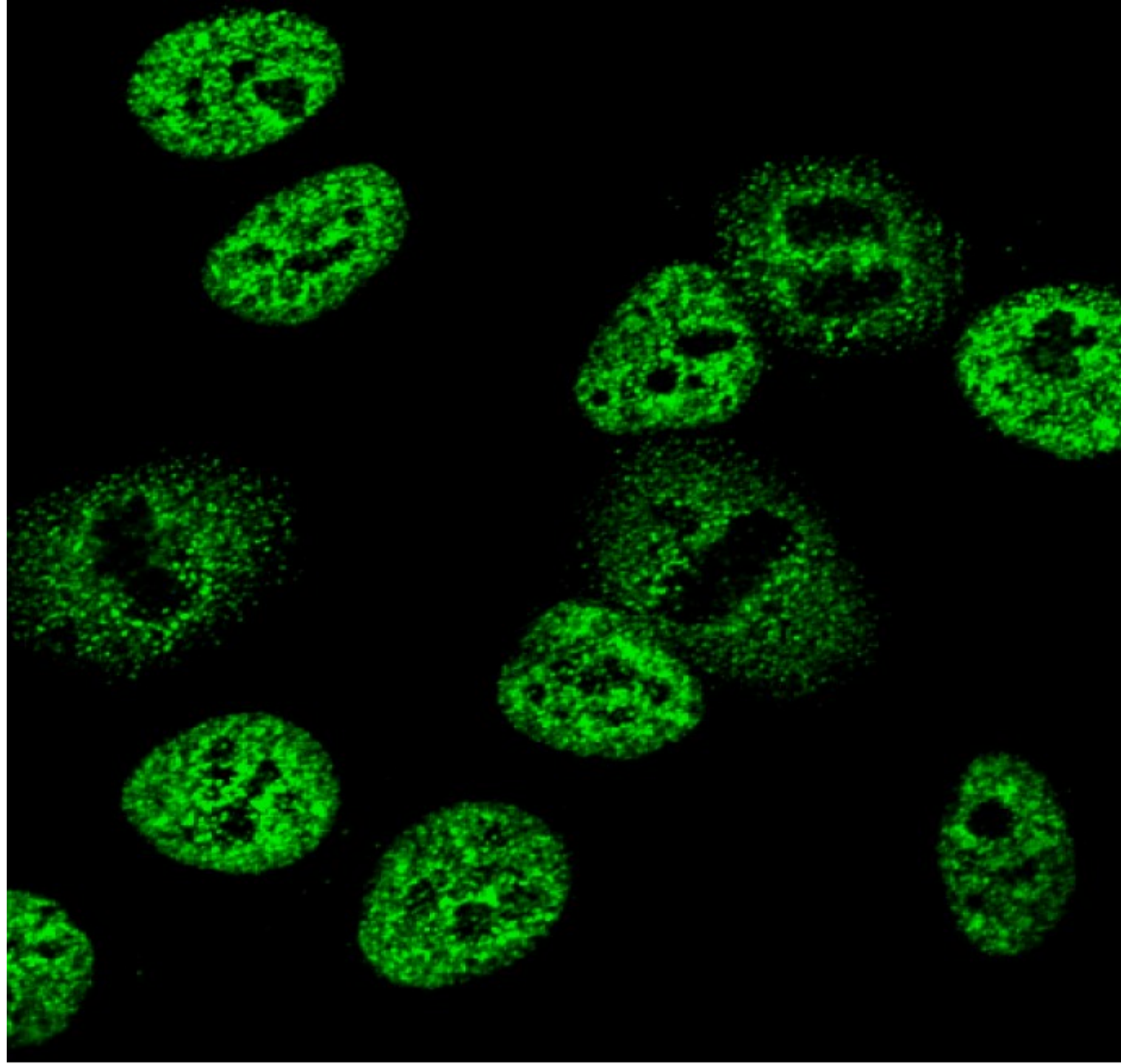
ANA – typ centromerický
diagnózy: CREST syndrom, systémová sklerodermie



ANA – typ granulární / zrnitý (antigeny: skupina ENA – např. Sm, SSA, SSB, U1-RNP)

diagnóza: smíšené onemocnění pojiva, Sjogrenův sy.

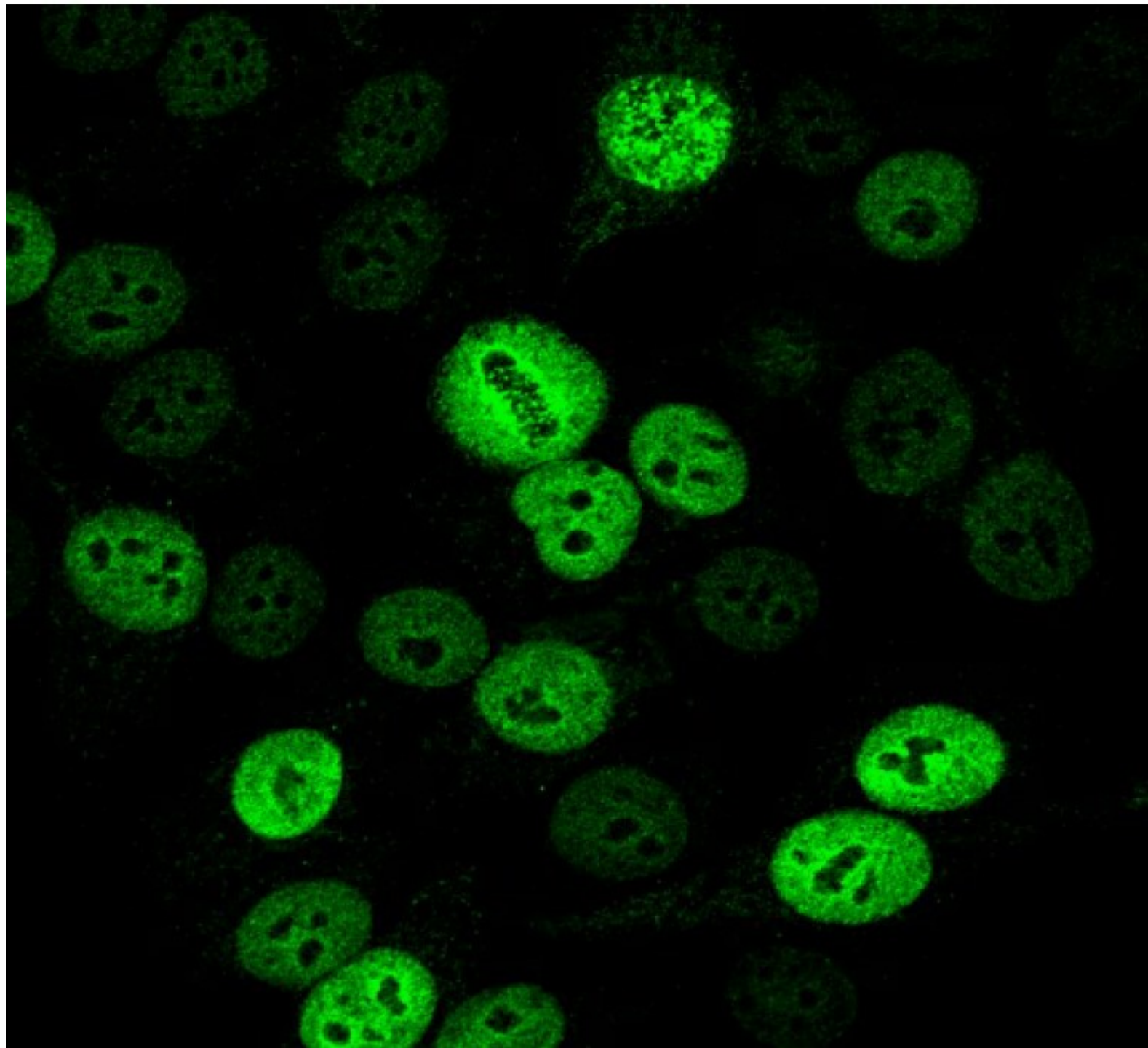
ANA typ
granulární/zrnitý



PCNA

proliferating cell nuclear antigen

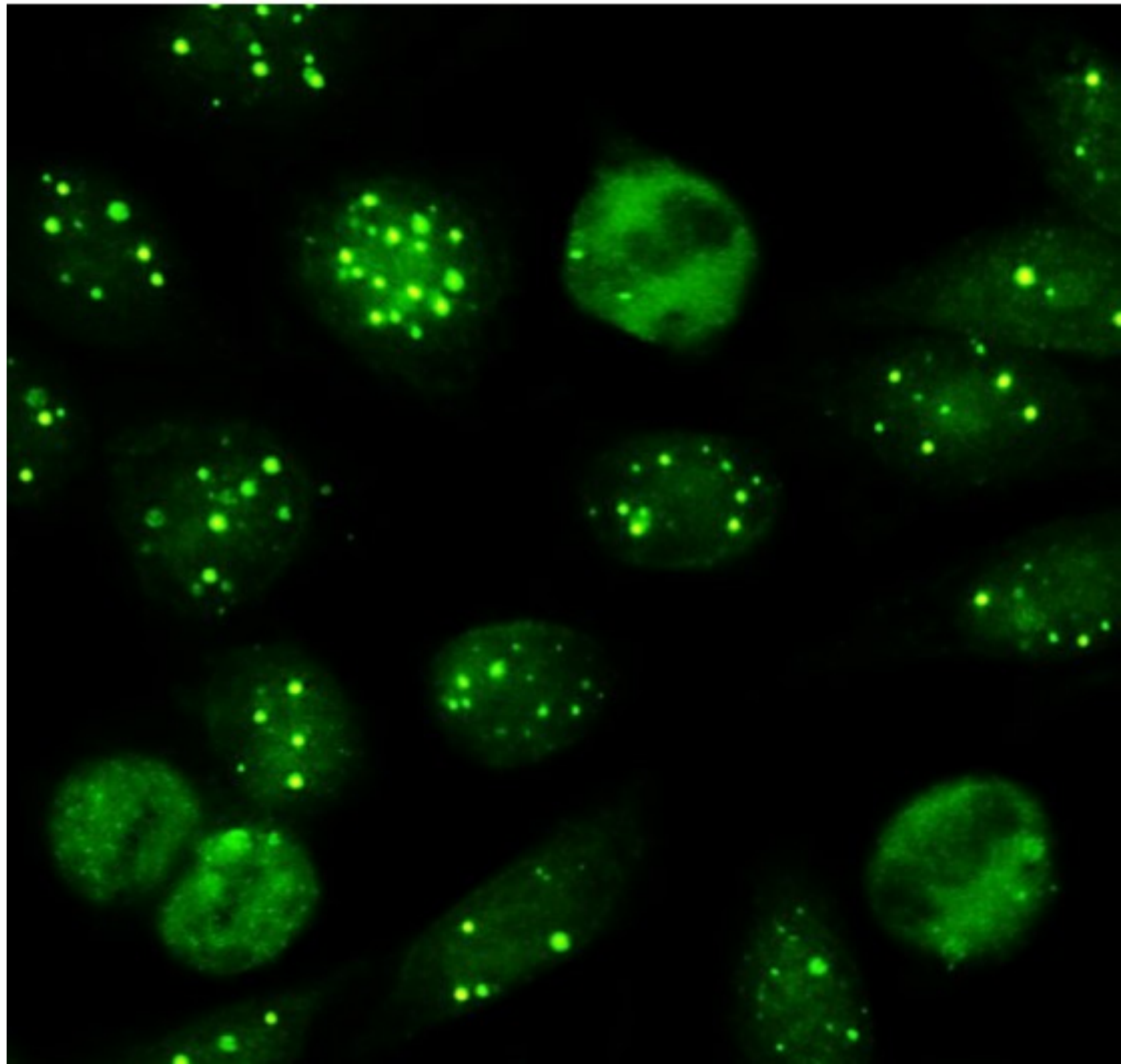
- Klinická asociace: SLE – 3%
- Dělicí se buňky v S fázi pozitivní
- Klidové buňky v G0 fázi negativní



ANA

četné jaderné tečky

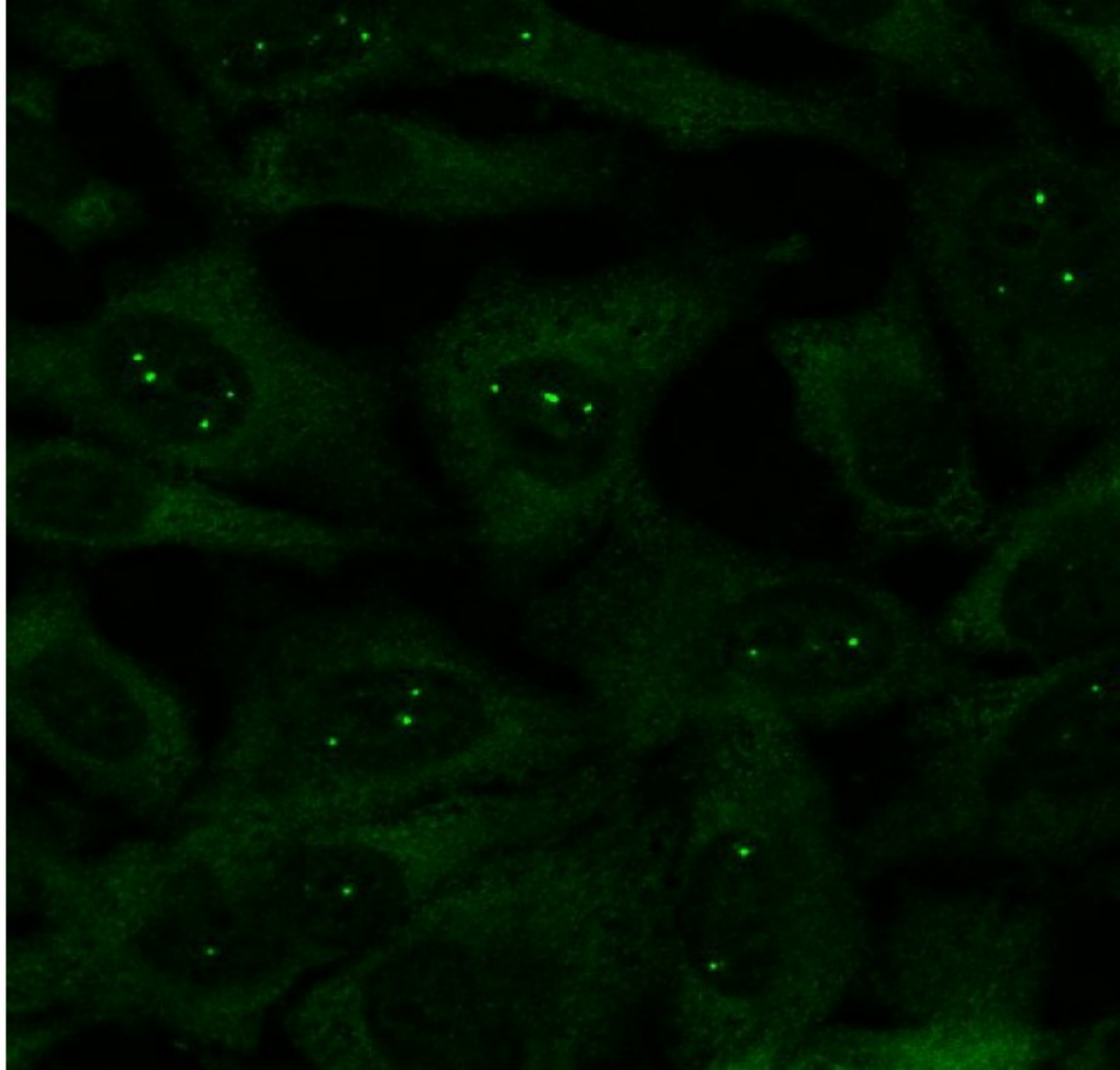
- 6 a více teček
- Antigeny: protein Sp100, Gp210
- Klinická asociace: primární biliární cirhóza
- Pacienti s tímto onemocněním negativní na AMA → svědčí pro horší prognózu onemocnění

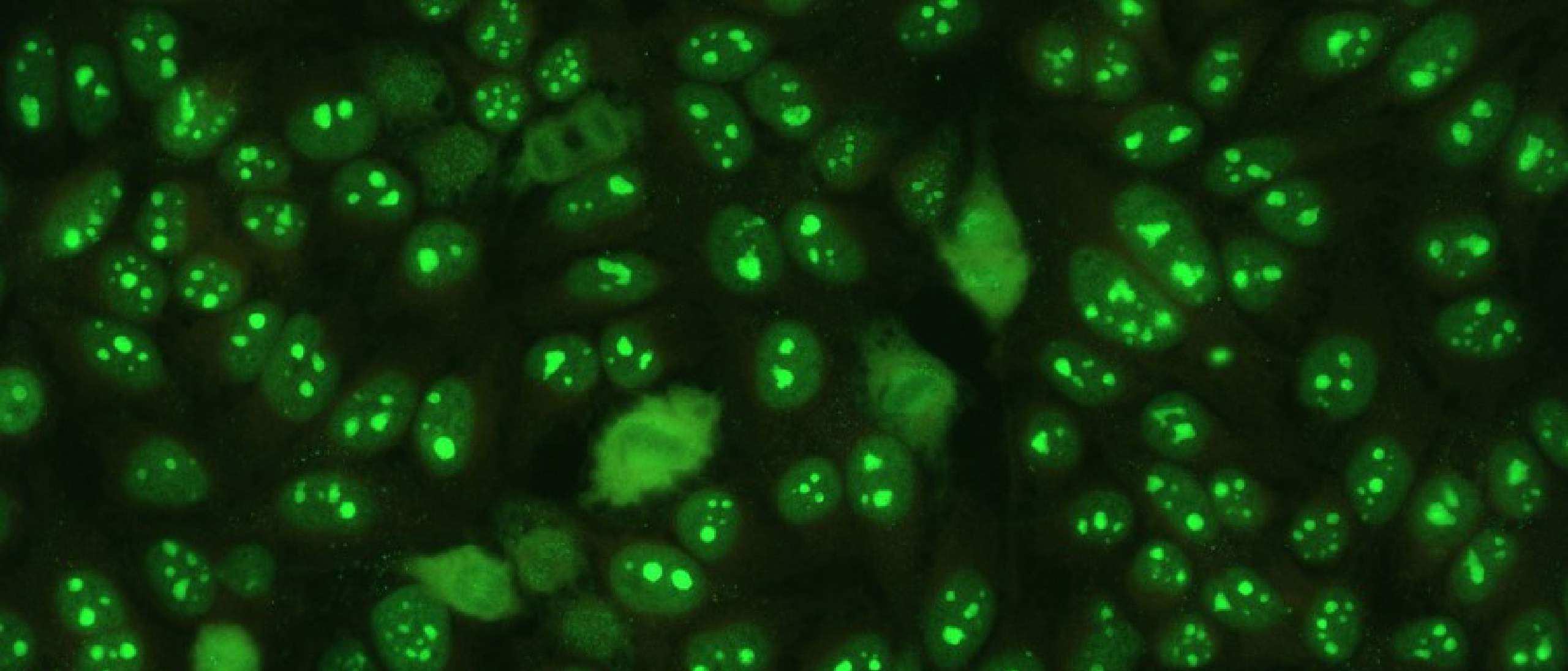


ANA

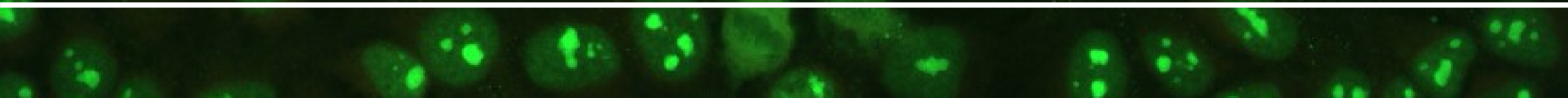
ojedinělé jaderné tečky

- 2-5 teček
- Antigen: coilin p-80
- Klinická asociace: autoimunitní a virová onemocnění jater





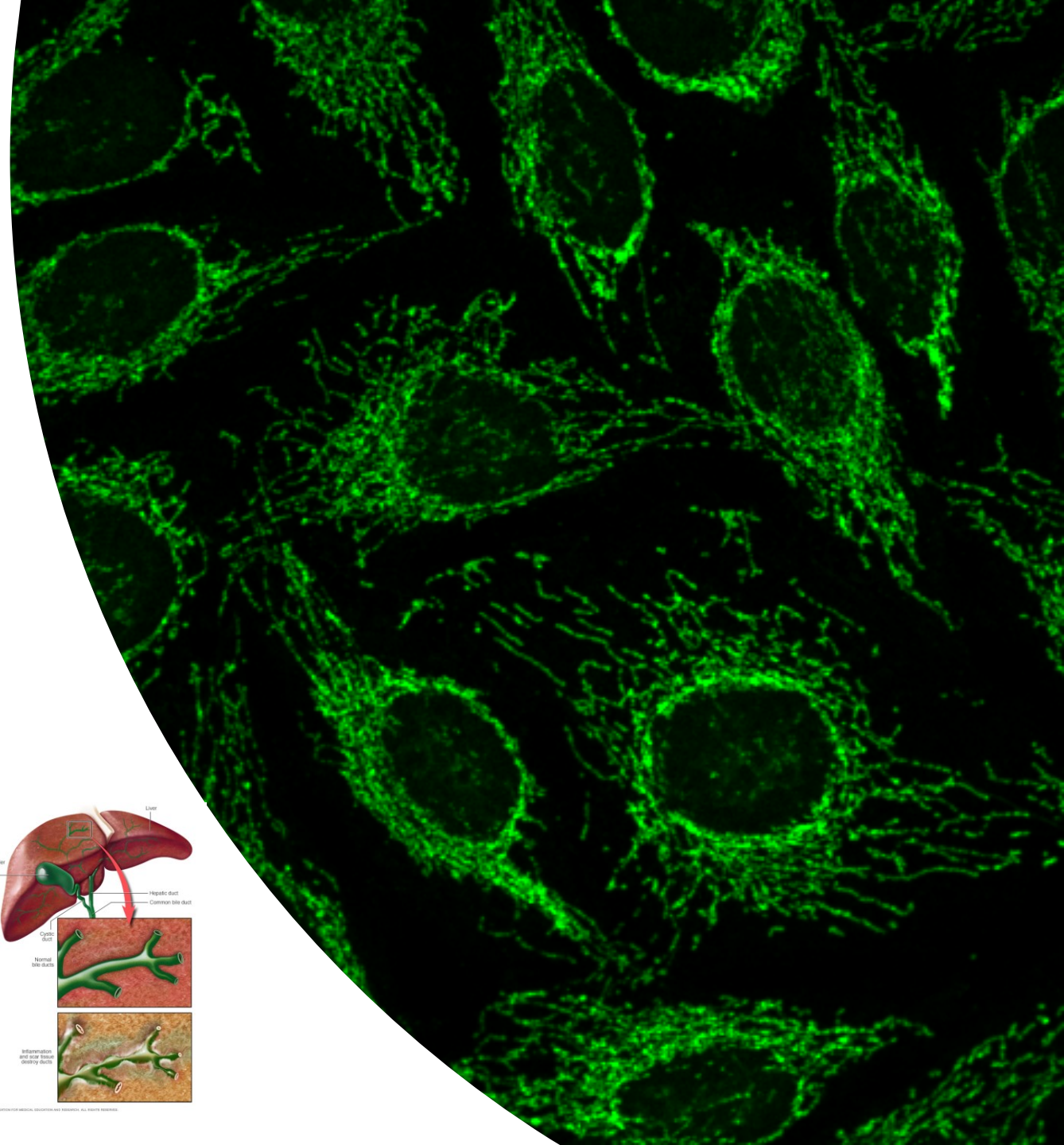
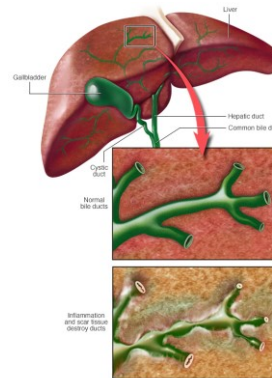
ANA – typ nukleolární (jadéřkový), antigenů je více, např. RNA polymeráza 1
diagnóza: systémová sklerodermie



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

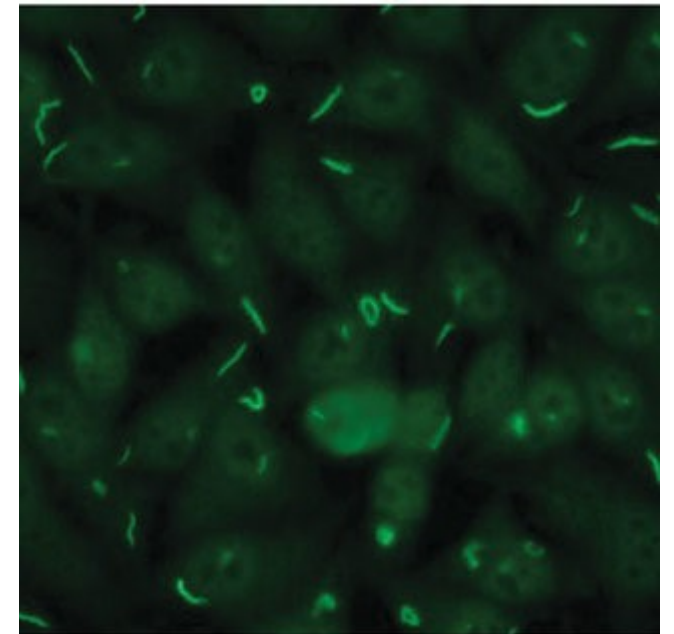
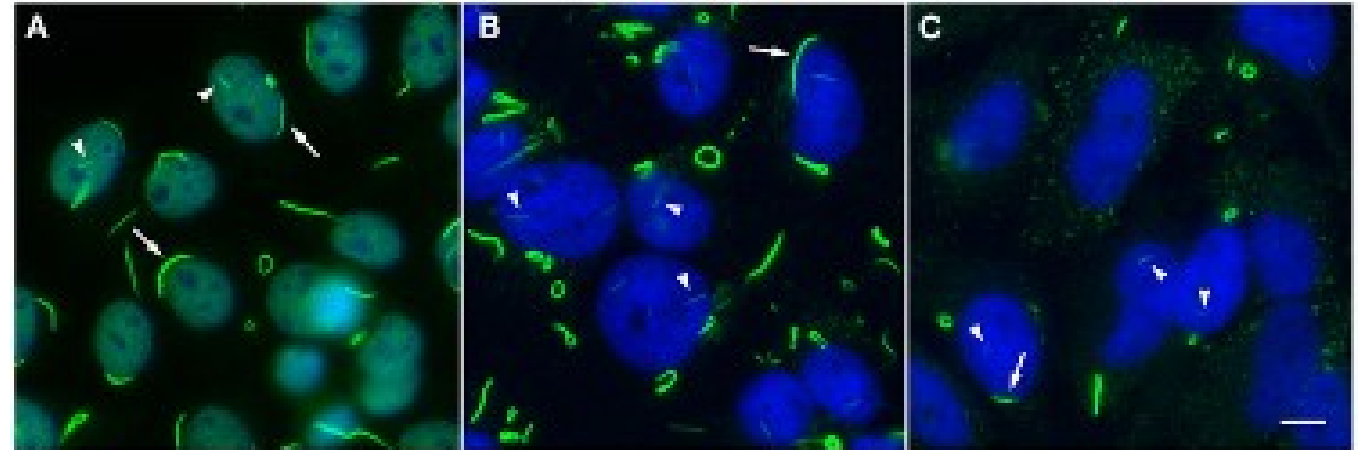
V cytoplazmě HEp2 buněk je možné pozorovat i další typy fluorescence – např. **mitochondriální – AMA** (anti-mitochondrial antibodies) – výskyt u onemocnění **primární biliární cirhóza**

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



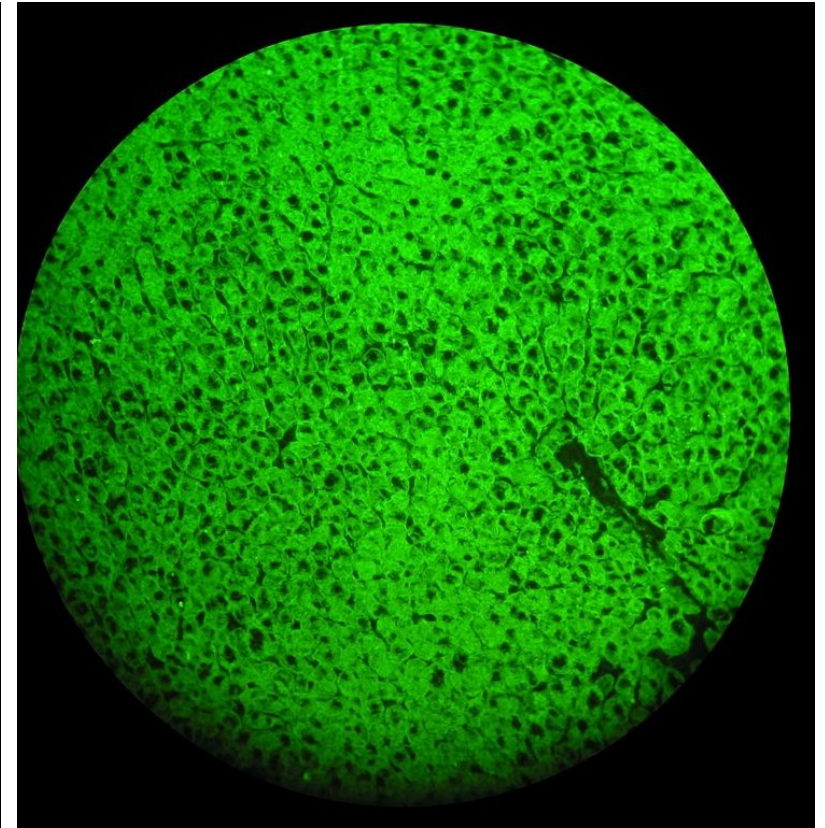
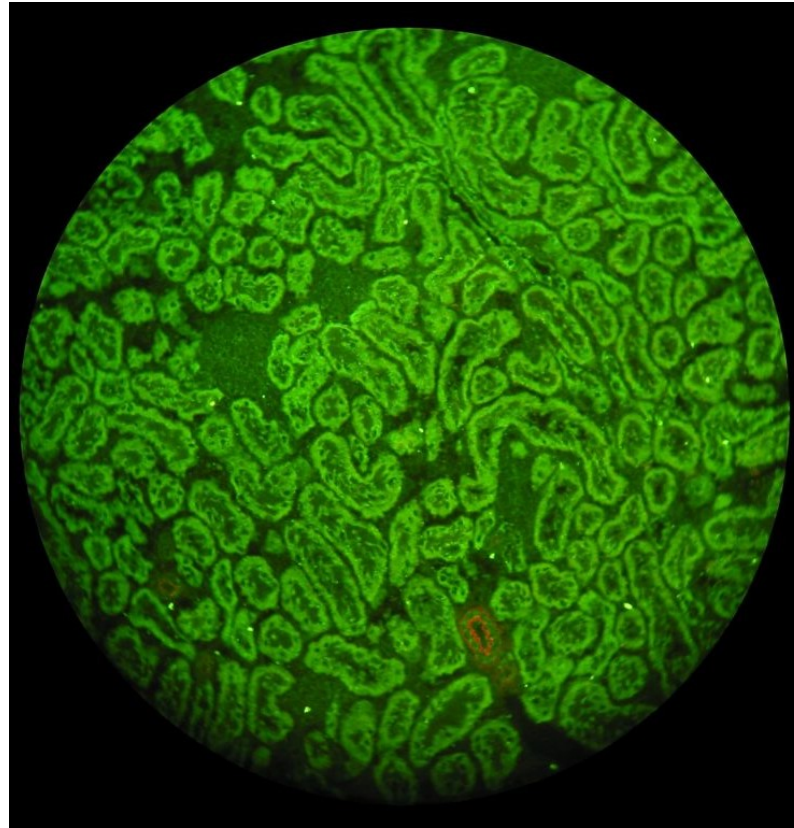
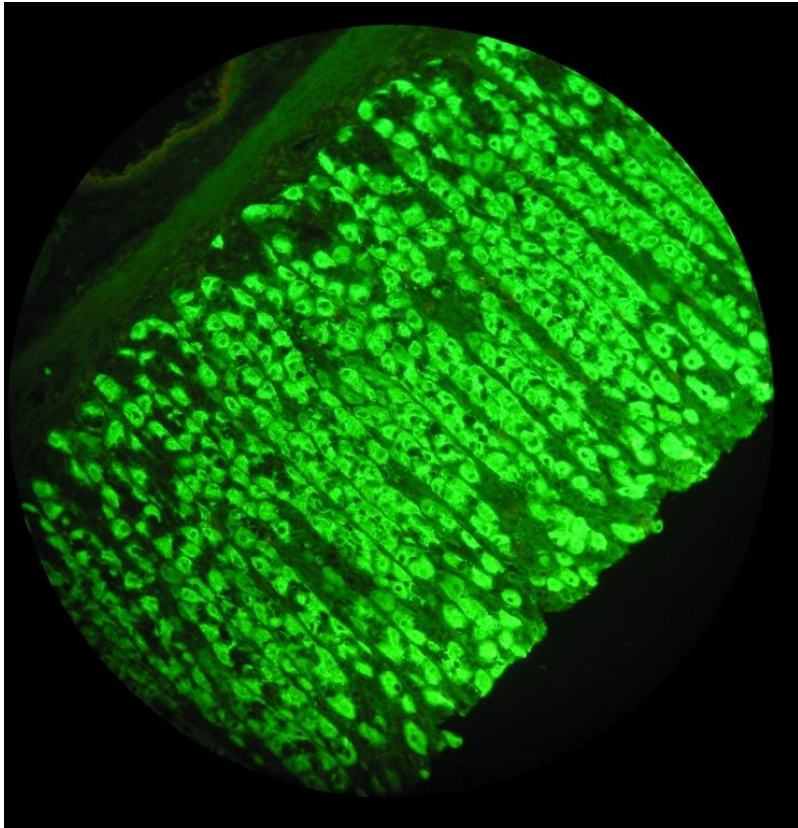
Nejaderné obrázky IF

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



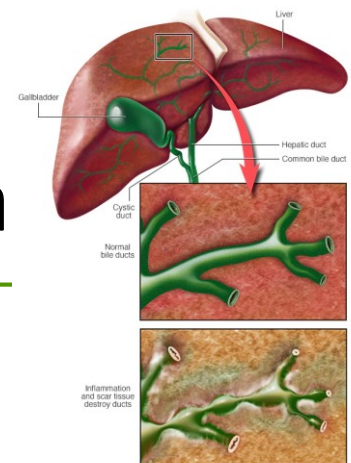
Substrát LKS

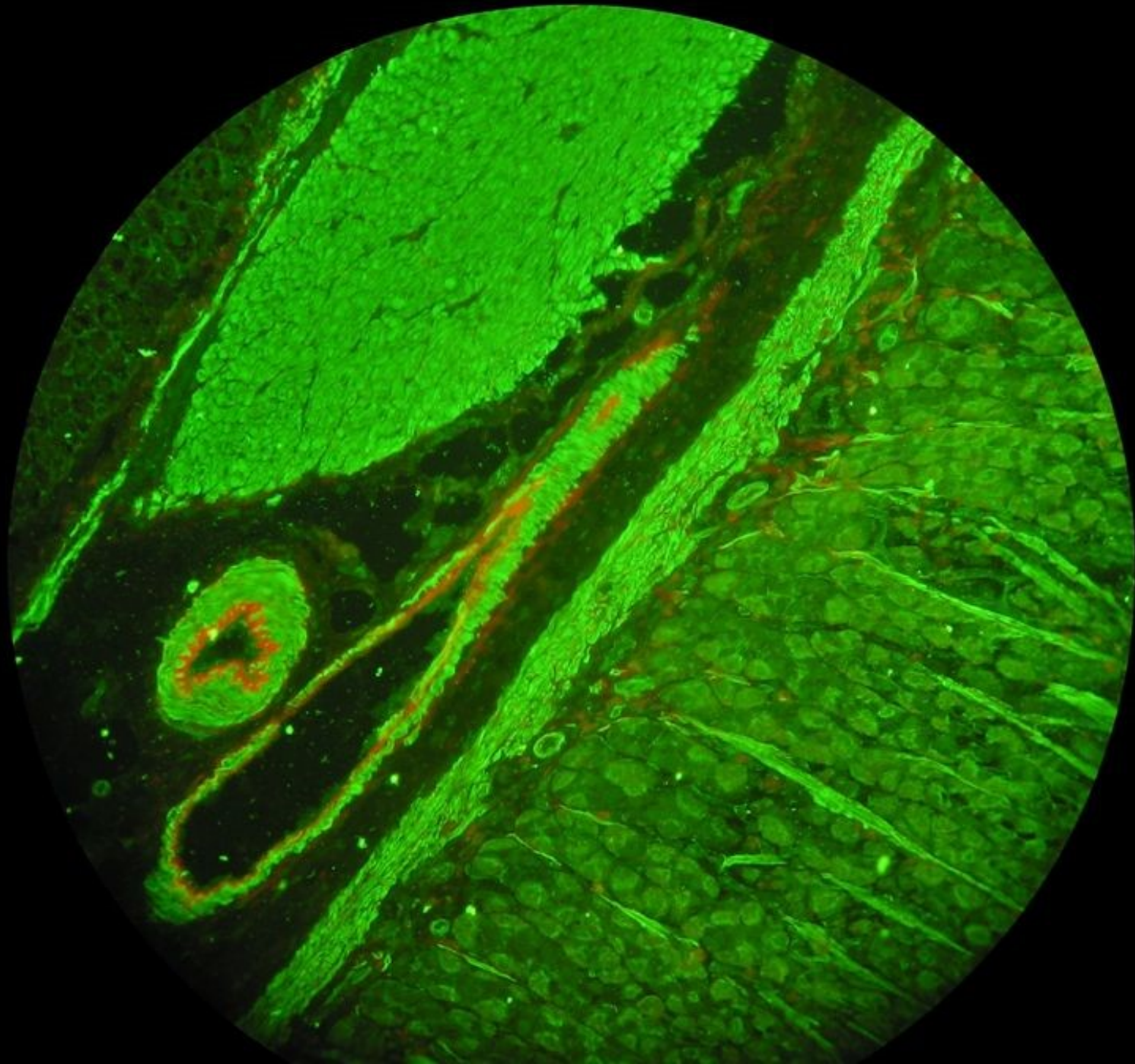
- Kombinace 3 potkaních tkání
 - játra (Liver)
 - ledviny (Kidney)
 - žaludek (Stomach)
- Pozorujeme autoprotilátky:
 - AMA (antimitochondriální) – primární biliární cirhóza
 - ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitní hepatitidy
 - GPC (proti parietálním buňkám žaludku) – prim. perniciózní anémie
 - 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 tkání.





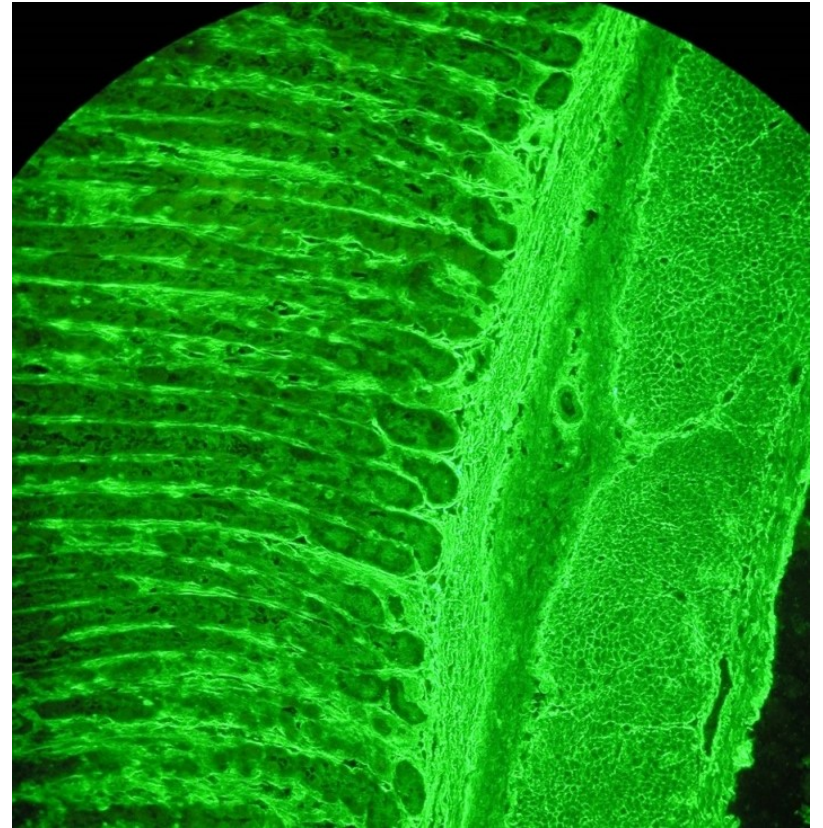
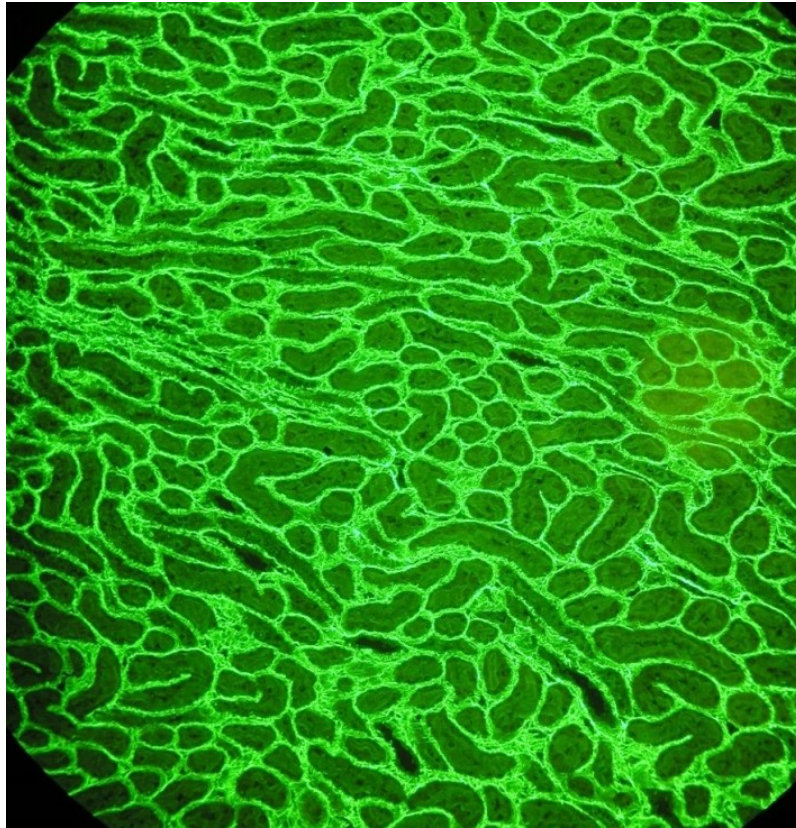
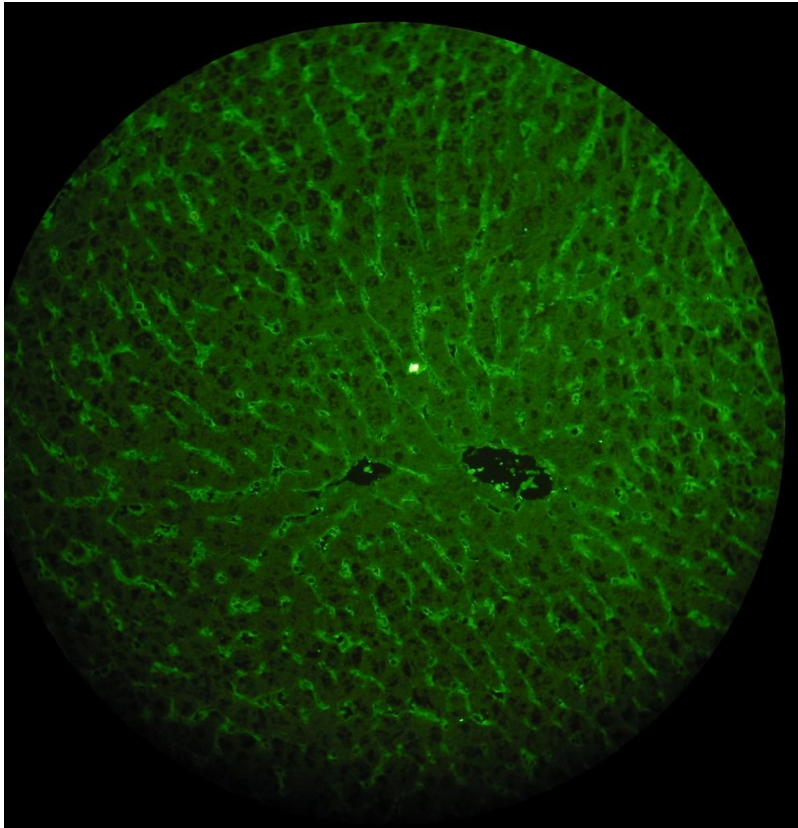
ASMA

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

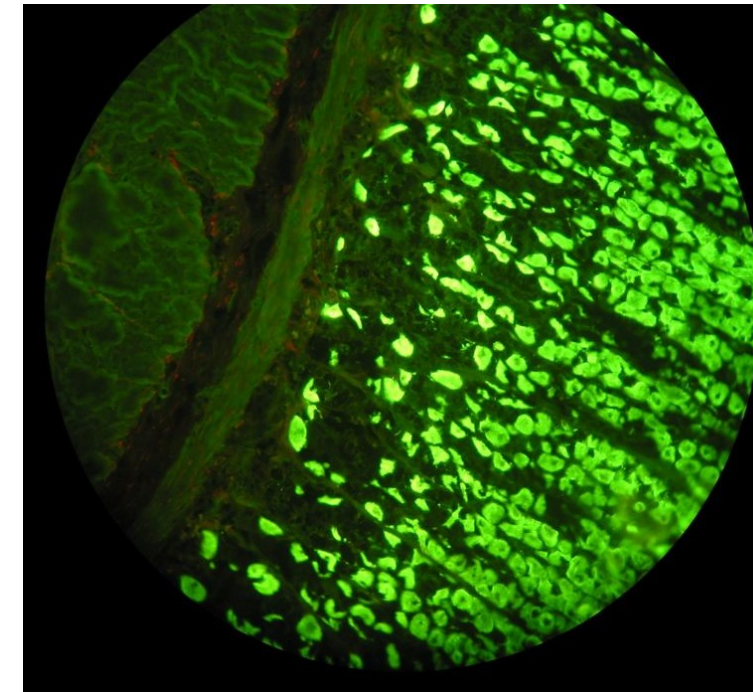
- Důsledek:

- 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, průjmy

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

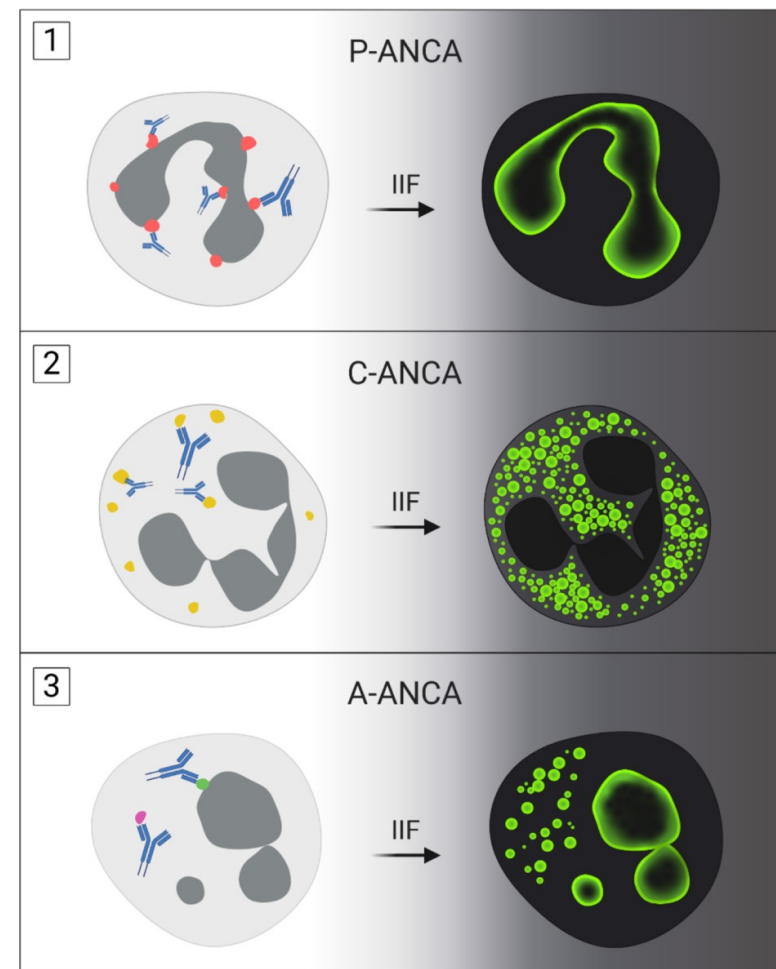
- Léčba – suplementace chybějících vitaminů – B12+kyselina listová

Substrát – krysí žaludek



ANCA (protilátky proti cytoplasmě neutrofilů)

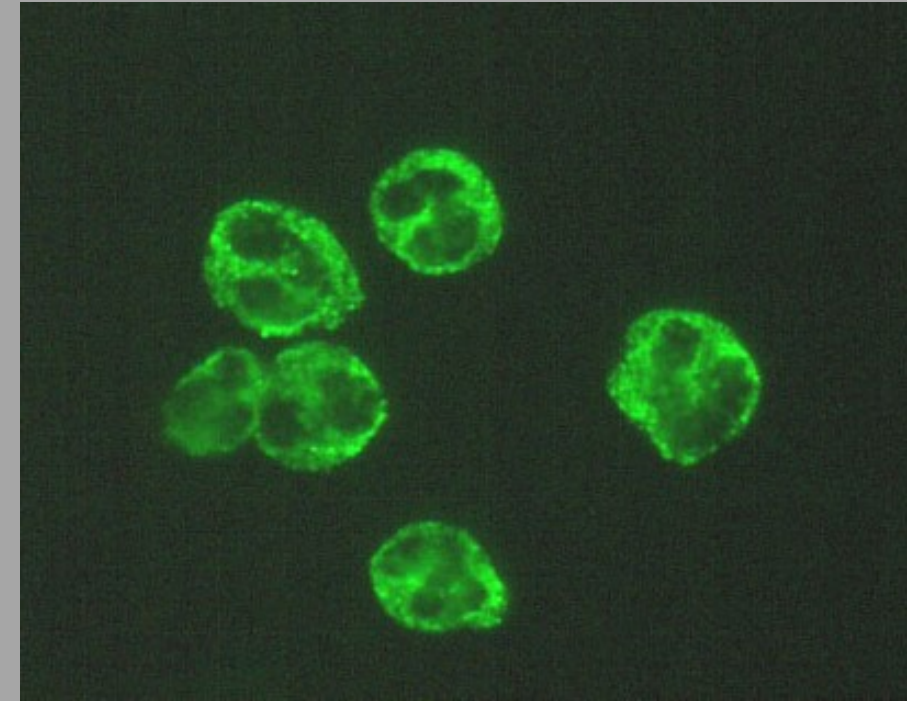
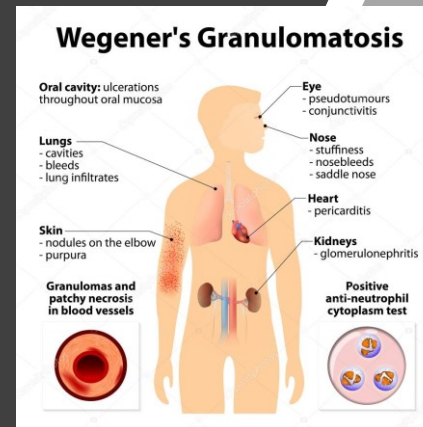
- Skupina protilátek proti některým vnitřním cytoplazmatickým strukturám neutrofilů (**myeloperoxidáza, proteináza 3, elastáza, laktoferin...**)
- Vyskytují se obecně u **autoimunitních vaskulitid**
- Existuje několik typů positivity ANCA
- **pANCA** – perinukleární IF → antigenem je myeloperoxidáza (MPO) – **progressivní 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: ethanolom 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)

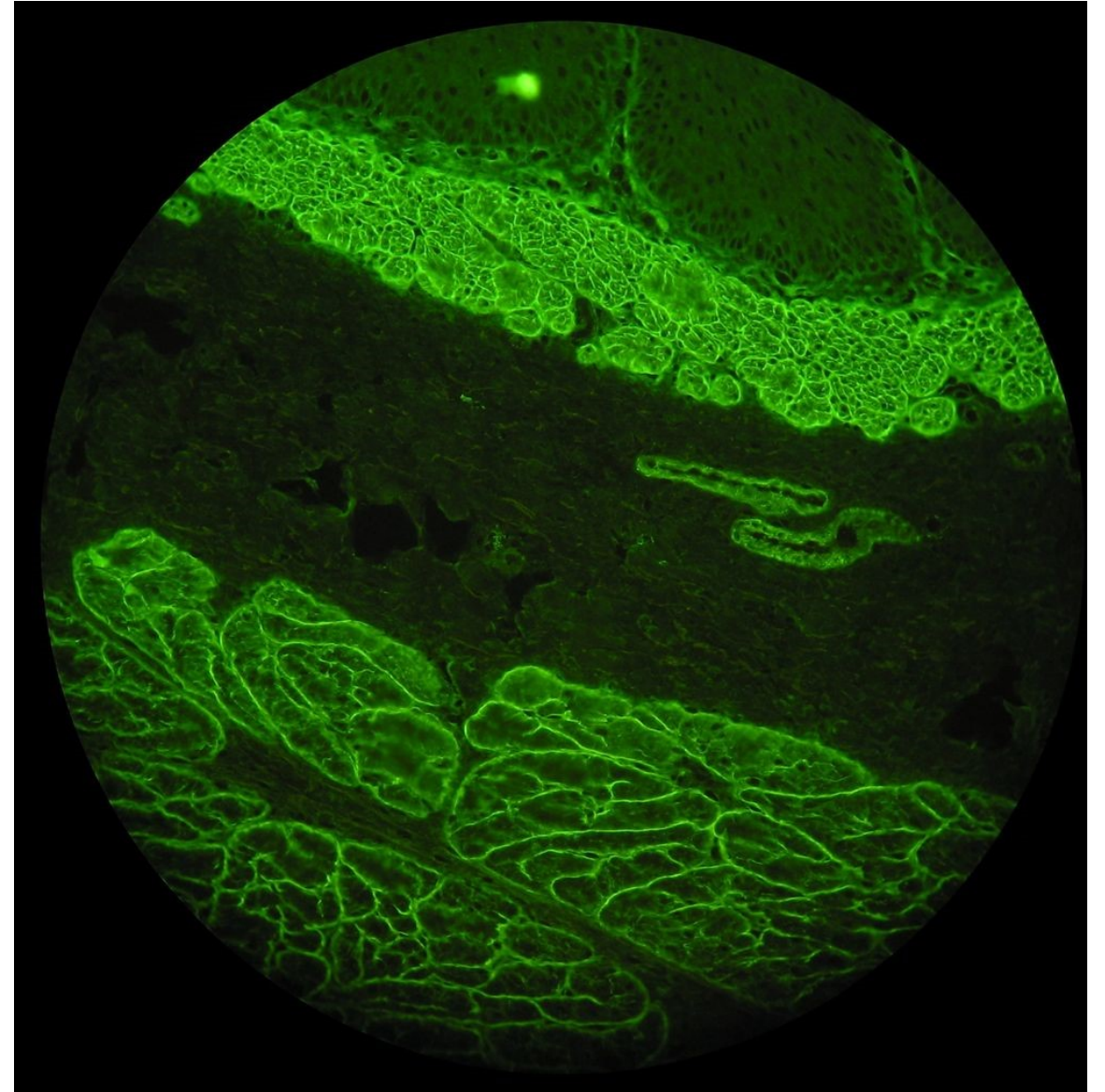


cANCA – cytoplazmatická – antigenem je PR3 (proteináza 3) – typická pro Wegenerovu granulomatózu s polyangitidou
pozitivní = vážná diagnóza = okamžite hlásit

EMA

(protilátky proti endomysiu)

- Na řezu opičího jícnu
- Ag je s nejvyšší pravděpodobností TTG (tkáňová transglutamináza – nutno ověřit 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

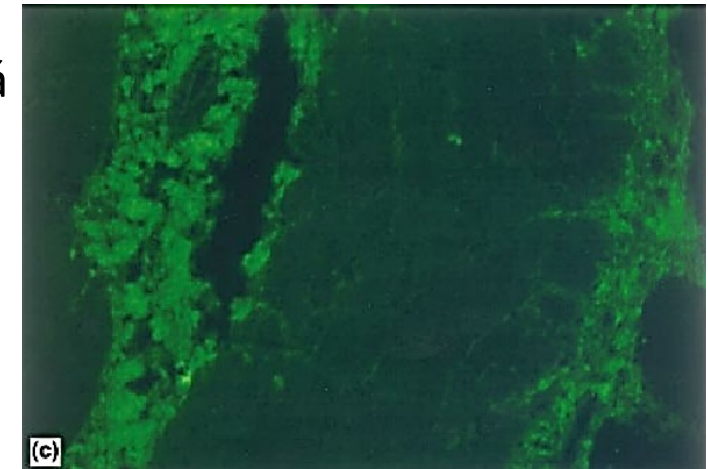
Imunologická laboratoř provádí pouze screening celiakie



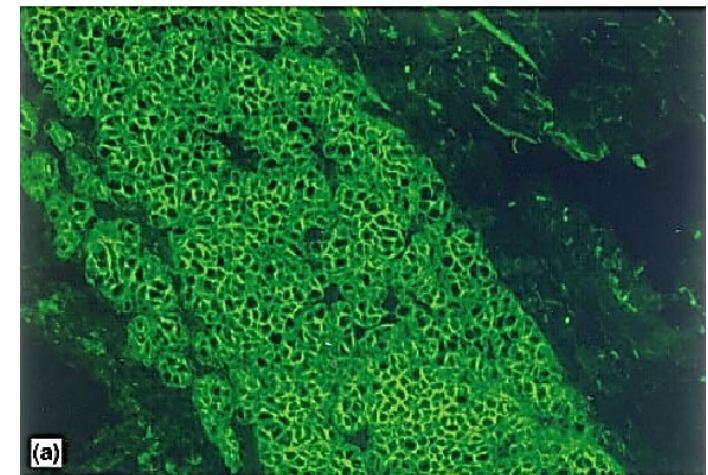
4) Definitivní potvrzení celiakie: gastroenterolog

- 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 tělu 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