

Princip přímé imunofluorescence

Přímá imunofluorescence je založena na detekci přítomnosti navázaných protilátek třídy IgG, IgM a IgA, C3 složky komplementu a fibrinogenu ve vyšetřované tkáni. Tím se liší od imunofluorescence nepřímé, jež prokazuje přítomnost specifických protilátek cirkulujících v séru. Výše jmenované reaktanty jsou ve tkáni označeny přidáním specifických protilátek, které jsou současně konjugovány s fluorescenčním barvivem (tzv. fluorofor či fluorochrom). Nejčastěji užívaným fluoroforem je FITC (fluorescein-izothiokyanát), tkáň je dobarvena Evansovou modří.

K vyšetření přímou imunofluorescencí je nutností fluorescenční mikroskop, na rozdíl od světelného mikroskopu emitující ultrafialové záření, tedy paprsky kratších vlnových délek a vyšších energií nežli paprsky viditelného světla. Při dopadu tohoto záření na valenční elektrony atomů fluoroforu dochází k absorpci energie a k excitaci těchto elektronů na vyšší energetickou hladinu. Na této hladině jsou však nestabilní a při jejich navrácení na původní úroveň emitují záření ve formě fotonu o nižší energii a delší vlnové délce v pásmu viditelného světla. Toto záření je detekováno pozorovatelem. Energetický a vlnový rozdíl mezi excitačním a emisním zářením je označován jako Stokesův posun.

Fluorescenční mikroskopy jsou v dnešní době vybaveny zdrojem záření typu LED (light-emitting diode). Záření prochází excitačním filtrem, který je propustný pouze pro paprsky vhodné pro daný fluorofor. Po interakci se vzorkem prochází paprsek emisním filtrem, propouštějícím jen požadovanou vlnovou délku. Tato frakce záření je viditelná pro pozorovatele, patrná v černém poli (6).

Preparáty vytvořené pro fluorescenční vyšetření nejsou permanentní, jejich životnost je limitována vyblednutím barviva (tzv. bleaching). Pořizována proto bývá fotodokumentace.

Indikace přímé imunofluorescence a odběr materiálu

Přímá imunofluorescence má svůj význam zejména v diagnostice autoimunitních bulózních dermatóz. Vedle toho se uplatňuje v diagnostice vaskulitid, lupus erythematosus,

porphyria cutanea tarda, lichen planus nebo chronické ulcerativní stomatitidy. Vyšetření může být podrobena kromě kůže též sliznice dutiny ústní či spojivkový epitel.

V závislosti na klinické diagnóze se odlišuje doporučená lokalita odběru tkáně a její optimální načasování. U autoimunitních bulózních dermatóz je odebírána perilezionální tkáň ve vzdálenosti do 1 cm od okraje čerstvé bulózní léze. V optimálním případě by stáří léze nemělo přesáhnout 24 hod. Léze staršího data je spjata s rizikem proteolytického štěpení antigenů a falešně negativním výsledkem (7). Při suspekci na nebulózní pemfigoid či prebulózní fázi bulózního pemfigoidu je odebírán vzorek z pruritické urtikariální léze.

Kožní vaskulitidy prodělávají poměrně rychlý vývoj s měnícím se histopatologickým a fluorescenčním obrazem. Biotrována by měla být čerstvá, neulcerovaná léze. V případě lupus erythematosus má nejvyšší přínos vyšetření plně rozvinutého projevu, u chronické formy trvající i několik týdnů.

Transportním médiem pro tkáň určenou k vyšetření přímou imunofluorescencí může být fyziologický roztok či tekutý dusík, vzorek však musí být zpracován do 24 až 48 hod. Fyziologický roztok s sebou nese výhodu snížení nespecifické a zesílení specifické fluorescence (7). Další možností je přímo k tomuto účelu vytvořené transportní médium – Michelovo médium (syn. Zeus médium). Vzorek si zachovává imunoreaktivitu i po několika dnech uložení v tomto médiu. Jeho složení udává tabulka 1.

Výtěžnost vyšetření přímou imunofluorescencí může být modifikována předchozí imunosupresivní léčbou, a to v závislosti na jejím druhu, trvání a dávce. Vzhledem k poměrně dlouhému poločasu navázaných imunodepozit je však možno očekávat přínos tohoto vyšetření i při odběru po započetí imunosupresivní léčby.

Interpretace výsledků vyšetření přímou imunofluorescencí

Každá skupina onemocnění vykazuje svůj charakteristický imunofluorescenční vzor, který odpovídá lokalizaci navázaných imunodepozit, včetně autoprotilátek namířených proti konkrétnímu antigenu. Níže je uvedena základní charakteristika jednotlivých imunofluorescenčních vzorů.

Tab. 1. Složení Michelova transportního média

55 g síranu amonného
2,5 ml 1molárního citronanu draselného
5 ml 0,1molárního síranu hořečnatého
5 ml 0,1molárního N-ethylmaleimidu
87,5 ml destilované vody
na dopufrování 1molární KOH na cílové pH 7,0–7,2

Autoimunitní bulózní dermatózy

U autoimunitních bulózních dermatóz ze skupiny pemfigu, histopatologicky s přítomností intraepidermální akantolýzy, je imunofluorescenčně prokazována intercelulární pozitivita povrchové epidermis a případně epitelu kožních adnex. Navázané protilátky jsou namířené proti složkám desmosomů, především proti desmogleinům 1 a 3, desmocollinům a proteinům ze skupiny plakinů (např. desmoplakin, envoplakin či periplakin). Ve většině případů jsou detekovány reaktanty C3 a IgG (8). Přítomnost protilátky třídy IgA, v korelaci s histopatologickým obrazem, může svědčit pro vzácný IgA pemfigus.

Desmoglein 1 je exprimován zejména v horní části epidermis a dlaždicového slizničního epitelu, v epidermis je však jeho exprese silnější. Oproti tomu, desmoglein 3 je exprimován především v dolní části epidermis a dlaždicového slizničního epitelu, jeho exprese je však silnější ve slizničním epitelu. S tímto faktem souvisí odlišná klinická manifestace a imunofluorescenční nález u pemphigus vulgaris a pemphigus foliaceus (8). U pemphigus vulgaris jsou přítomny autoprotilátky zejména proti desmogleinu 3. Buly jsou u tohoto typu pemfigu lokalizovány suprabazálně, postižení dutiny ústní je výraznější a imunofluorescenčně je prokazována pozitivita zejména v dolní části epidermis či slizničního epitelu (Obr. 1). U pemphigus foliaceus jsou tvořeny autoprotilátky především proti desmogleinu 1. Vytvořené buly jsou superficiální (většinou subkorneální), postižení dutiny ústní je méně časté a imunofluorescenčně je patrná pozitivita zejména horní části epidermis. Pemphigus vegetans má identický imunofluorescenční obraz jako pemphigus vulgaris, senzitivita vyšetření je však v tomto případě poněkud nižší (6).

Bulózní dermatózy s tvorbou subepidermálních bul vykazují přítomnost autoprotilátek proti složkám hemidesmosomů (plakiny BP180 a BP230, integrin $\alpha 6\beta 4$) či složkám bazální membrány od úrovně lamina lucida po sublamina densa (např. laminin 332, laminin