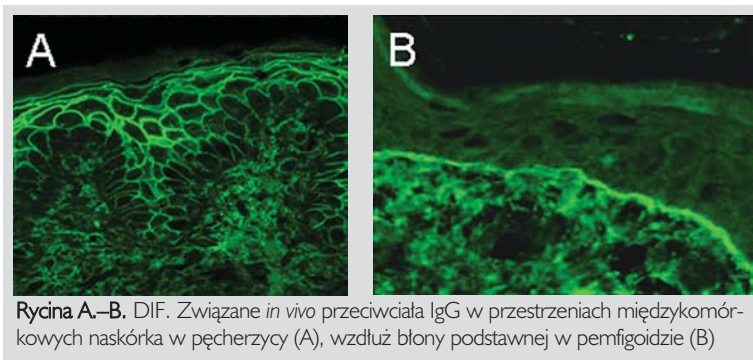


WPROWADZENIE DO METODYKI BADAŃ IMMUNOPATOLOGICZNYCH

Badania histopatologiczne, w części przypadków uzupełnione o techniki immunohistochemiczne, stanowią podstawę diagnostyki większości chorób skóry. Materiałem do badań są utrwalone chemicznie wycinki skóry, co powoduje uszkodzenie antygenów i immunoglobulin, uniemożliwiając wykrywanie zjawisk immunologicznych. Wprowadzenie do diagnostyki mikroskopowej metody immunofluorescencji wykorzystującej nieutrwalone chemicznie zamrożone wycinki stworzyło podwaliny nowoczesnej immunopatologii. Te same preparaty można badać również technikami o wyższej rozdzielczości, takimi jak mikroskopia konfokalna czy immunomikroskopia elektronowa. Metody te są używane w wybranych, trudnych diagnostycznie przypadkach. Technikę immunofluorescencji można również wykorzystywać do wykrywania przeciwciał krążących (metoda pośredniej immunofluorescencji). Oprócz badań oceniających morfologię i ultrastrukturę tkanek, stosuje się również metody umożliwiające charakterystykę biochemiczną autoprzeciwciał krążących (metoda podwójnej immunodyfuzji, metoda ELISA, *western blot*, radioimmunoprecypitacja). Postęp badań molekularnych pozwolił na otrzymywanie metodami inżynierii genetycznej pełnych antygenów lub ich wybranych epitopów, co znacznie poszerzyło możliwości diagnostyczne w chorobach skóry.

Materiałem do badań immunopatologicznych są nieutrwalone chemicznie wycinki tkankowe, w których wykrywa się zjawiska immunologiczne zachodzące w skórze, oraz surowice, w których poszukuje się autoprzeciwciał krążących.

BADANIA TKANKOWE



Metoda immunofluorescencji bezpośredniej

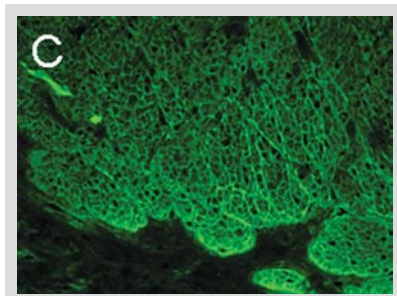
Metoda immunofluorescencji bezpośredniej (ang. *direct immunofluorescence* – DIF) jest podstawową techniką immunopatologiczną polegającą na wykrywaniu w wycinkach pobranych od chorego ludzkiej immunoglobulin związanych *in vivo* za pomocą immunosurowic zwierzęcych znakowanych fluorochromami. Ma

ona podstawowe znaczenie w diagnostyce autoimmunologicznych chorób pęcherzowych (ryc. A, B), a także jest przydatna w diagnostyce tocznia rumieniowatego (ang. *lupus band test*), liszaja płaskiego, przewlekłego nadżerkowego zapalenia jamy ustnej, plamicy hiperergicznej oraz porfirii skórnej późnej.

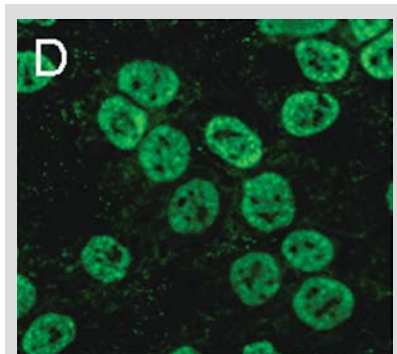
BADANIA SUROWIC

Metoda immunofluorescencji pośredniej

Metoda immunofluorescencji pośredniej (ang. *indirect immunofluorescence* – IIF) jest podstawową techniką immunopatologiczną służącą do wykrywania w surowicach pacjentów autoprzeciwciał krążących. W metodzie tej w pierwszym etapie wykorzystuje się skrawki prawidłowej tkanki (standardowo przetyk człowieka), jako tzw. substrat antygenowy do reakcji z przeciwciałami, a w drugim etapie przeciwciała te wykrywa się podobnie jak w metodzie DIF. Metoda IIF jest badaniem zarówno jakościowym (jak DIF), jak i ilościowym, ponieważ reakcje przeprowadza się, używając wielu rozcieńczeń badanych surowic (1 : 10, 1 : 20 itd.), co pozwala na okre-



Rycina C. IIF. Reakcja przeciwciał IgA z endomysium mięśni gładkich w chorobie Duhringa



Rycina D. IIF. Reakcja przeciwciał przeciwnukleolowych typu ziarnistego na komórkach HEp2. Duże jądra komórkowe pozwalają na ocenę typu fluorescencji

ślenie miana stwierdzanych przeciwciał (ostatnie dodatnie rozcieńczenie). Stosując metodę IIF, wykrywa się różne przeciwciała: pęcherzykowe, przeciwciała skierowane przeciwko błonie podstawnej, przeciwciała przeciwnukleolowe (ang. *antinuclear antibody* – ANA), przeciwciała skierowane przeciw endomysium mięśni gładkich (ryc. C) i inne.

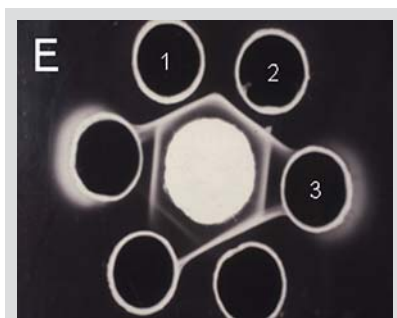
W szczególnych przypadkach stosuje się inne substraty (np. przełyk świnki morskiej, pęcherz moczowy szczura – patrz część szczegółowa). Obecnie do wykrywania ANA coraz częściej rutynowo stosuje się komórki Hep 2 (ryc. D), natomiast przeciwciała przeciw natywnemu DNA wykrywa się na komórkach wiciowca *Crithidium lucillae*. Technikę IIF wykorzystuje się ponadto do diagnostyki genodermatoz.

Metoda immunoblotu

Metoda immunoblotu (ang. *western immunoblot* – WIB) umożliwia biochemiczną charakterystykę antygeny rozpoznawanego przez auto-przeciwciała. Potencjalnie jest czulsza od metody IIF, jednak nie pozwala na wykrywanie antygenów (białek) w stanie natywnym na skutek wynikającej z preparatyki denaturacji białek. Z tego powodu niektóre surowice mogą być dodatnie w metodzie IIF, a ujemne w metodzie WIB i odwrotnie. Jednoczesne wykonywanie badań oboma metodami nie tylko zwiększa czułość wykrywania autoprzeciwciał, ale także umożliwia ich różnicowanie. Metoda WIB jest techniką skomplikowaną i nie mogłaby być stosowana w rutynowej diagnostyce immunopatologicznej, dlatego od kilku lat uruchomiono produkcję komercyjnie dostępnych tzw. kitów laboratoryjnych, w postaci gotowych pasków nitrocelulozowych z już naniesionymi antygenami (np. testy Euroline), które coraz częściej są wykorzystywane w badaniach rutynowych.

Immunodyfuzja

Jest to metoda wykorzystywana do identyfikacji ANA. Surowice od chorych nanosi się do przygotowanych w żelu agarowym otworów i bada wobec ekstraktu grasiczego zawierającego rozpuszczalne antygeny jądrowe (ang. *extractable nuclear antigen* – ENA) w stanie natywnym. Przeciwciała obecne w surowicy dyfundują w żelu i – napotykać dyfundujące z otworu centralnego antygeny jądrowe – precypitują (tj. tworzą nierozpuszczalne kompleksy antygen–przeciwciało), co jest widoczne w postaci linii. Pojawienie się linii świadczy o obecności w surowicy przeciwciał. Aby dokonać ich identyfikacji, stosuje się, obok surowicy badanej, surowicę kontrolną zawierającą zidentyfikowane przeciwciała (**metoda podwójnej immunodyfuzji**, ang. *double immunodiffusion* – DID) i ocenia się zgodność linii precypitacyjnych surowic badanych z surowicami kontrolnymi (ryc. E).



Rycina E. Metoda podwójnej immunodyfuzji w żelu agarowym. W otworze centralnym ekstrakt grasiczy cięłej (źródło antygenów). W otworach (1 i 3) na obwodzie surowice badane oraz surowica kontrolna Jo1 w otworze 2. Zgodność linii 1 i 2 świadczy, że badana surowica jest Jo1 +, brak zgodności 2 i 3 świadczy, że badana surowica jest Jo1 (-)

Metoda ELISA

Metoda ELISA (ang. *enzyme-linked immunoabsorbent test*) umożliwia wykrywanie i identyfikację przeciwciał wymaga stosowania wysoko oczyszczonych antygenów, co stanowi pewne ograniczenie w stosowaniu jej w rutynowej diagnostyce immunopatologicznej. Wartość diagnostyczna tej metody systematycznie się zwiększa i obecnie jest ona rutynowo stosowana (komercyjnie dostępne kity) w większości laboratoriów na świecie do diagnostyki pęcherzycy, różnych postaci pemfigoidu, choroby Duhringa, enteropatii glutenozależnej oraz do identyfikacji niektórych antygenów jądrowych, np. antygeny centromerowego CENP-B. Wyniki podaje się w formie indeksu, który określa się zgodnie z zaleceniami producenta testu.

Opracowali:

prof. dr hab. n. med. Maria Błaszczuk
prof. dr hab. n. med. Cezary Kowalewski