

Medicinski fakultet, Beograd
Katedra za dermatovenerologiju
Klinički centar Srbije, Beograd
Institut za dermatovenerologiju

Pregledni članak
Review article
UDK 616.5-097-07
DOI: 10.2298/MPNS0912539M

DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ IMUNOFLUORESCENTNIH TESTOVA U DERMATOLOGIJI

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMMUNOFLUORESCENT TESTS IN DERMATOLOGY

Ljiljana MEDENICA i Dušan ŠKILJEVIĆ

Sažetak - Imunofluorescencija je laboratorijska tehnika uvedena u dermatologiju šezdesetih godina prošlog veka i već četiri decenije se koristi u istraživanju patofiziologije i dijagnostikovanju bolesti kože, prevashodno autoimunih buloznih dermatosa i bolesti vezivnog tkiva. U kliničkoj imunodermatologiji koriste se tri bazična tipa imunofluorescentnih tehnika i to: direktna imunofluorescencija, indirektna imunofluorescencija i komplement-vezana imunofluorescencija. Pored pomenutih, bazičnih tehnika imunofluorescencije, danas se sve češće, sada već rutinski, primenjuju dve modifikovane tehnike imunofluorescencije: direktna imunofluorescencija i indirektna imunofluorescencija tehnike "raslojene - pocepane kože" (*split-skin*). Imunofluorescencija je laboratorijska tehnika od neprocenjivog značaja za dijagnostiku primarno autoimunih buloznih dermatosa, bolesti vezivnog tkiva i krvnih sudova, npr. vaskulitisa. Za postavljanje dijagnoze i diferencijalne dijagnoze, naročito subepidermalnih autoimunih buloznih dermatosa kod kojih mogu da postoje klinička, histopatološka i imunopatološka preklapanja DIF-SS i IIF-SS predstavljaju zlatne dijagnostičke standarde. Ma koja od ovih tehnika da je primenjena, svi dobijenti rezultati moraju se uporediti sa kliničkim i histopatološkim nalazima.

Ključne reči: Imunofluorescentni testovi; Dermatologija; Dijagnoza

Uvod

Imunofluorescencija (IF) je laboratorijska histo-hemijska tehnika koja omogućava otkrivanje antitela vezanih za antigene u tkivu i cirkulišućih antitela u telesnim tečnostima. U kliničkoj imunodermatologiji se koriste tri bazična tipa IF tehnika i to: direktna IF (DIF), indirektna IF (IIF) i komplement-vezana IIF (K-IIF). Pored pomenutih, bazičnih IF tehnika, danas se sve češće, sada već rutinski, primenjuju dve modifikovane IF tehnike, DIF i IIF tehnike "raslojene - pocepane kože" (*split-skin* - DIF-SS; IIF-SS).

Direktna imunofluorescencija (DIF) omogućava otkrivanje imunoglobulina i komponenti komplementa u uzorcima tkiva [1]. Reprezentativni uzorak kože na kome se izvodi DIF predstavlja perileziona, klinički neizmenjena koža. Ukoliko se kao uzorak koristi leziona koža ili koža sa supkliničkom inflamacijom rezultati DIF testa mogu biti lažno negativni s obzirom da u ovakvim, nereprezentativnim uzorcima dolazi do potpune destrukcije imunoreaktanata.

Indirektnom imunofluorescencijom (IIF) testira se serum pacijenta radi otkrivanja cirkulišućih antitela na definisani antigen [2]. Kao supstrat za detekciju cirkulišućih antitela kod pacijenata sa autoimunim buloznim dermatozama koriste se humana koža [2], ezofagus majmuna [3], usna ili ezofagus zeca ili zamorca i epitelijum bešike pacova [4]. Ezofagus majmuna predstavlja odličan supstrat i za detekciju drugih tkivno-specifičnih antitela kao što su anti-endomizijalna, anti-glatko-mišićna, anti-mitohondrijalna i dr. Najčešći nalaz kod pacijenata sa bolestima vezivnog tkiva, predstavljaju antinukleusna antitela (ANA) koja su usmerena protiv

multiplih antigena lokalizovanih u jedrima ćelija mnogih tkiva. Za njihovo dokazivanje kao tkivni supstrat se koriste mišji ili pacovski bubreg i/ili jetra kao i humana epitelijalna ćelijska linija-HEp-2.

Komplement-vezana IIF (K-IIF) vrlo je osetljiva tehnika kojom se dokazuju čak i vrlo male količine cirkulišućih antitela koja imaju sposobnost vezivanja komplementa (IgG, IgM) a koja nije moguće dokazati rutinskom IIF tehnikom [5,6]. Izvor komplementa za K-IIF može biti svež humani serum ili serum zamorca koji su bogati komplement-fiksirajućim antitelima.

Direktna i indirektna imunofluorescentna *split skin* tehnika (DIF-SS i IIF-SS) predstavljaju jednostavne metode koje pored toga što imaju dijagnostički značaj, primarno omogućuju diferencijaciju autoimunih buloznih dermatosa sa subepidermalnim rascepom (vidi dalji tekst), a posebno razlikovanje bolesti iz grupe pemfigoida od akvirirane bulozne epidermolize (lat. *epidermolysis bullosa acquisita*) među kojima postoje česta klinička, histopatološka i imunopatološka preklapanja. Inkubacija biopsiranih uzoraka perilezione kože (supstrat za DIF-SS) i/ili zdrave humane kože (supstrat za IIF-SS) u 1.0M NaCl rezultuje arteficialnim raslojavanjem - cepanjem kože kroz laminu lucidu zone bazalne membrane (ZBM) epidermisa i dovodi do odvajanja epidermisa od dermisa [7,8]. DIF-SS tehnikom se dokazuju antitela *in vivo* vezana za tkivne antigene epitope koji su locirani na epidermalnoj ili dermalnoj strani rascepa zavisno od autoimune bulozne dermatoze ili bolesti vezivnog tkiva koja se ispituje. IIF-SS tehnikom se dokazuju cirkulišuća antitela koja su usmerena prema različitim komponentama ZBM [9,10].

Skraćenice

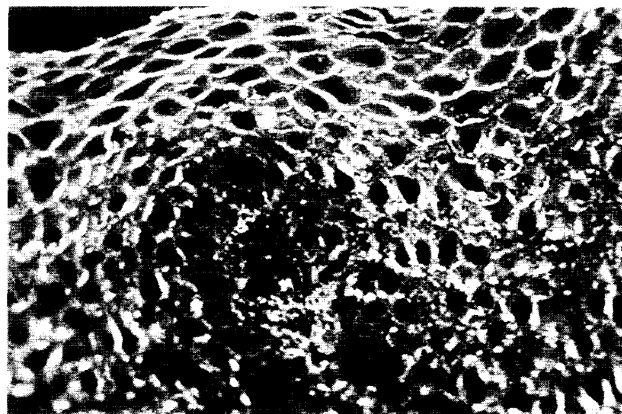
| | |
|--------|---|
| IF | - imunofluorescencija |
| DIF | - direktna imunofluorescencija |
| IIF | - indirektna imunofluorescencija |
| DIF-SS | - direktna imunofluorescentna <i>split skin</i> tehnika |
| IIF-SS | - indirektna imunofluorescentna <i>split skin</i> tehnika |
| ANA | - anti antitela |
| K-IF | - komplement-vezana indirektna imunofluorescencija |
| Ig | - imunoglobulini |
| ZBM | - zona bazalne membrane |
| ABD | - autoimuna bulozna dermatoz |
| PV | - pemphigus vulgaris |
| PVG | - pemphigus vegetans |
| PE | - pemphigus erythematosus |
| PF | - pemphigus foliaceus |
| PPN | - pemphigus paraneoplasticus |
| PiL | - pemfigus izazvan lekovima |
| IgAP | - IgA pemphigus |
| ICS | - intercelularna supstancija |
| LE | - lupus erythematosus |
| PB | - pemphigoid bullosus |
| BPAG | - bulozni pemfigoid antigen |
| EBA | - epidermolysis bullosa acquisita |
| PG | - pemphigoid gestationis |
| PC | - pemphigoid cicatricialis |
| NCI | - amino-terminalni domen |
| LESB | - lupus erythematosus systematicus bullosus |
| ARA | - American Rheumatological Association |
| DHD | - dermatitis herpetiformis Duhring |
| LABD | - linearna IgA bulozna dermatoz |
| LEC | - lupus erythematosus chronicus |
| LESC | - lupus erythematosus subacutus cutaneus |
| LES | - lupus erythematosus systemicus |
| IR | - imunoreaktanti |
| LBT | - lupus band test |

Autoimune bulozne dermatoze

Autoimune bulozne dermatoze (ABD) se mogu podeliti na intraepidermalne i subepidermalne ABD, zavisno od mesta stvaranja bule u koži (mesto raspcepa). Intraepidermalne ABD čine bolesti grupe pemfigusa, one nastaju kao rezultat imunološkog odgovora usmerenog protiv adhezionih molekula u epidermu [11]. Subepidermalne ABD nastaju kao rezultat imunološkog odgovora koji je usmeren prema antigenim epitopima u ZBM [12]. U ovu grupu ABD se ubrajaju bulozni pemfigoid, gestacijski pemfigoid, ožiljni tj. cikatricijelni pemfigoid, akvirirana bulozna epidermoliza, sistemski bulozni eritemski lupus, dermatitis herpetiformis, tzv. Duhringova bolest i IgA linearna dermatoz.

Pemphigus grupa bolesti

Grupu pemfigusa čine intraepidermalna autoimuna bulozna oboljenja pemphigus vulgaris (PV), pemphigus vegetans (PVG), pemphigus erythematosus (PE), pemphigus foliaceus (PF), pemphigus paraneoplasticus (PPN), pemfigus izazvan lekovima (PiL) i IgA pemphigus (IgAP). Target antigeni su specifični dezmozomalni proteini - za PV dezmo-



Slika 1. DIF: Pemphigus grupa bolesti - IgG depoziti i intercelularnim prostorima formiraju tipičnu retikularnu fluorescenciju

Fig. 1. DIF: Pemphigus group of diseases - IgG deposits in intercellular spaces formed typical reticular fluorescence

glein 3 (i dezmoglein 1), za PF dezmoglein 1 i za IgAP dezmozolin 1. Antitela kod PV i PF su patogeni, usmerena su protiv intercelularne supstancije (ICS), dovode do akantolize i stvaranja bule [13] direktno interferirajući sa funkcijom dezmozoma [14].

Direktnim IF testom se otkrivaju depoziti IgG u intercelularnim prostorima perilezione kože i mucoza kod svih pacijenata sa aktivnim pemfigusom (osim kod IgAP gde se otkrivaju IgA depoziti). Tipična retikularna fluorescencija intercelularnih prostora (Slika 1) nastaje usled vezivanja antitela za dezmozomalne proteine na površini keratinocita. Kod nelečenih pemfigusa zajedno sa IgG, detektuju se i C3 imunoreaktanti. Kod 30-50% pacijenata mogu se dokazati i depoziti IgM ili IgA u intercelularnim prostorima. Kod PE i PF koji imaju klinička i imunopatološka preklapanja sa sistemskim eritemskim lupusom (lat. *lupus erythematosus systemicus* - LES) DIF testom se pored tipične retikularne fluorescencije otkrivaju i granulirani ili fibrilarni depoziti IgG i C3 duž ZBM, koji su inače karakteristični za *lupus erythematosus* (LE) lezije. Sličan nalaz može da se vidi i kod PPN. Nalaz DIF testa kod PiL je heterogen, dve trećine pacijenata ima nalaz sličan onom kod PF, jedna trećina nalaz koji odgovara PV. Kod malog broja pacijenata sa PiL, DIF i IIF testovi su negativni što je verovatno posledica direktne, lekom indukovane akantolize bez učešća imunološkog odgovora [15].

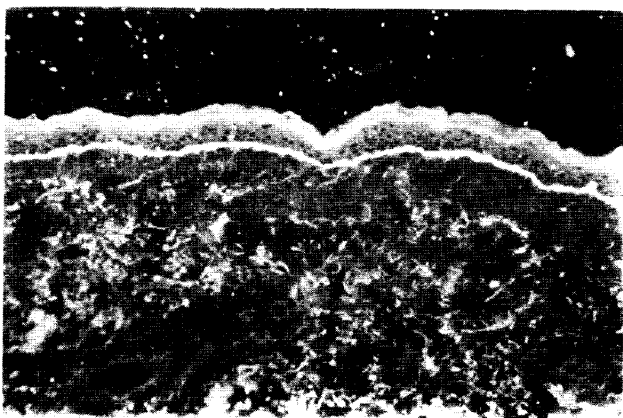
Indirektni IF test služi za detekciju IgG anti-ICS antitela koja postoje kod 90% pacijenata sa aktivnim pemfigusom [16]. Kod oko 50% pacijenata sa IgA pemfigusom detektuju se IgA anti-ICS antitela [17]. Kod PE, PF i PPN osim IgG anti-ICS antitela, detektuju se i IgG anti-ZBM antitela. IIF ima značaj u potvrđivanju kliničke dijagnoze, praćenju evolucije bolesti i proceni terapijskog odgovora, sa kojima direktno i proporcionalno korelira. Kod opekotina, neželjenih reakcija kože izazvanih penicilinom, kožnih graftova i ožiljnog pemfigoida, postoje

cirkulišuća pemfigus slična, antitela koja mogu dati lažno-pozitivne rezultate IIF testa.

Pemphigoid bullosus

Bulozni pemfigoid (lat. *pemphigoid bullosus*-PB) subepidermalna je ABD koju imunopatološki karakteriše prisustvo cirkulišućih i fiksiranih antitela usmerenih prema normalnim komponentama ZBM, tzv. antigenima buloznog pemfigoida (BPAG). Target antigeni za koje se vezuju antitela su specijalni proteini ZBM molekulske težine 230 kD (BPAG1) i 180 kD (BPAG2), a lokalizovani su u hemidezmozomima i lamini lucidi. Atitela indukuju stvaranje bule indirektno, aktiviranjem inflamatornih procesa [18]. Za postavljanje dijagnoze esencijalni su DIF i IIF testovi.

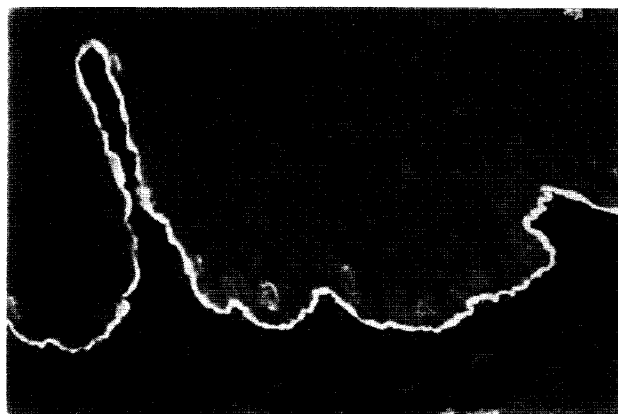
Direktnim IF testom u zdravoj i perilezionalnoj klinički neizmenjenoj koži se detektuju tanki, linearni (kao "olovkom nacrtani"), talasasti (Slika 2), tubularni ili retko granularni depoziti IgG i C3 u ZBM. Ponekad su IgG depoziti odsutni a C3 je jedini imunorekantan koji se vidi kod PB. U slučajevima PB kada je IIF test negativan (25%) DIF test ima najveću dijagnostičku vrednost. DIF-SS tehnikom detektuju se IgG depoziti koji su lokalizovani na epidermalnoj strani rasepa (mesto na kome su lokalizovani target antigeni BPAG1 i BPAG2) ili mnogo rede kombinovano na epidermalnoj i dermalnoj strani rasepa [10].



Slika 2. *Pemphigoid bullosus* - DIF: tanki, linearni ("olovkom nacrtani"), talasasti tubularni ili retko granularni depoziti IgG i C3 u ZBM PB

Fig. 2. *Pemphigoid bullosus* - DIF: thin linear ("pencil like") IgG and C3 deposits along the BMZ

Indirektnim IF testom (Slika 3) dokazuju se cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela kod 75% pacijenata. Indirektni IF test kod PB ima dijagnostičku, ali ne i prognostičku, vrednost zato što titar antitela ne korelira sa aktivnošću bolesti. IIF-SS tehnikom dokazuju se antitela koja se vezuju za epidermalnu stranu rasepa ili retko obostrano. U slučajevima PB kada postoje značajna klinička, histopatološka i imunopatološka preklapanja sa EBA kod pacijenata



Slika 3. *Pemphigoid bullosus*: IIF se dokazuju cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela

Fig. 3. *Bullous pemphigoid*: IIF test detect circulating IgG anti-BMZ antibodies

kod kojih nije moguće detektovati IgG anti-ZBM antitela (25%), DIF-SS predstavlja zlatni standard [8].

Pemphigoid gestationis

Gestacijski pemfigoid (lat. *pemphigoid gestationis* - PG; s. *herpes gestationis*) predstavlja retku subepidermalnu ABD koja se javlja isključivo u trudnoći a koja je po svojim biološkim i imunogenetskim svojstvima u tesnoj vezi sa buloznim pemfigoidom. Target antigen je BPAG2. Cirkulišuća antitela se nazivaju "PG" (lat. *pemphigoid gestationis*) [19] ili "HG" (lat. *herpes gestationis*) faktorom [20], pripadaju IgG1 supklasi [19].

Direktni IF test predstavlja esencijalni dijagnostički parametar za PG, otkriva prisustvo linearnih C3 (100%) i IgG (25-30%) depozita u ZBM [21]. DIF-SS testom u uzorcima perilezione kože pacijentkinja imunoreaktanti IgG i C3 se detektuju na epidermalnom polu rasepa.

Indirektni IF test je negativan kod većine (90%) obolelih trudnica [22]. Nasuprot tome, primenom IIF-SS tehnike cirkulišuća IgG1 anti-ZBM antitela mogu biti detektovana kod preko 90% pacijentkinja. Nalazi IIF-SS u potpunosti koreliraju sa nalazima DIF-SS.

Primenom komplement-vezane IIF koja je vrlo senzitivna metoda moguće je dokazati IgG1 anti-ZBM antitela kod gotovo 100% trudnica sa PG [19, 20].

Pemphigoid cicatricialis

Ožiljni (cikatricijelni) pemfigoid (lat. *pemphigoid cicatricialis* - PC) jeste hronična ožiljna, subepidermalna ABD koja primarno zahvata sluzokože a u manjem obimu i kožu. Imunopatološki PC karakteriše prisustvo IgG anti-ZBM antitela koja su usmerena prema target antigenima, BPAG1 koji je lokalizovan u hemidezmozomima i lamini lucidi, i lamininu 5 koji je lokalizovan u hemidezmozomima, lamini lucidi i lamini densi. Tip PC kod



Slika 4. *Pemphigoid cicatricialis* - DIF-SS: IgG i C3 koji su lokalizovani obostrano, na epidermalnom i dermalnom polu rascepa

Fig. 4. *Cicatricial pemphigoid* - DIF-SS: IgG and C3 are localized on epidermal and dermal side of the split

koga su cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela usmerena prema lamininu 5 naziva se anti-epiligrin PC [22].

Direktnim IF testom se dokazuju linearni depoziti IgG i C3 duž ZBM. Depoziti IgG i C3 su često udruženi sa slabije fluorescirajućim depozitima IgA i IgM. Direktnom IF-SS tehnikom se na uzorcima perilezionalne mukoze ili kože pacijenta detektuju IgG i C3 koji su lokalizovani obostrano, na epidermalnom i dermalnom polu rascepa (Slika 4).

Indirektnim IF testom moguće je detektovati cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela samo kod 10-25% pacijenata [23]. Indirektnom IF-SS tehnikom se detektuju IgG anti-ZBM antitela koja se vezuju istovremeno za antigene na epidermalnoj (BPAG1) i dermalnoj (laminin 5) strani rascepa.

Epidermolysis bullosa acquisita

Akvirirana bulozna epidermoliza (lat. *epidermolysis bullosa acquisita*) predstavlja hroničnu, ožiljnu mehano-buloznu subepidermalnu autoimunu dermatozu koju karakteriše stvaranje bula na koži i sluzokožama posle delovanja mehaničke traume. Target antigen je amino-terminalni domen (NC1) kolagena tip VII koji je lokalizovan u lamini denzi ZBM.

Direktnim IF testom se otkrivaju kontinuirani, homogeni, široki, intenzivno fluorescirajući, linearni depoziti, pre svega IgG i C3 sa istovremenim nalazom IgA (75%) i IgM (50%) duž ZBM [24]. Primenom DIF-SS kod EBA otkrivaju se IgG depoziti lokalizovani na dermalnoj strani rascepa [7]. Mesto vezivanja imunoreaktanata odgovara lokalizaciji target antigena kolagena tip VII koji je lokalizovan u lamini denzi i sublamini denzi.

Indirektnim IF imunofluorescentnim testom dokazuju se cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela kod 50% pacijenata [24]. Primenom IIF-SS testa detektuju se cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela vezana za

antigene na dermalnoj strani rascepa (lamini denzi i sub-lamini denzi).

U slučajevima EBA kod kojih su IIF i IIF-SS testovi negativni (50% pacijenata nemaju cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela) DIF, a prevashodno DIF-SS testovi imaju najveću dijagnostičku vrednost [8].

Lupus erythematosus systemicus bullosus

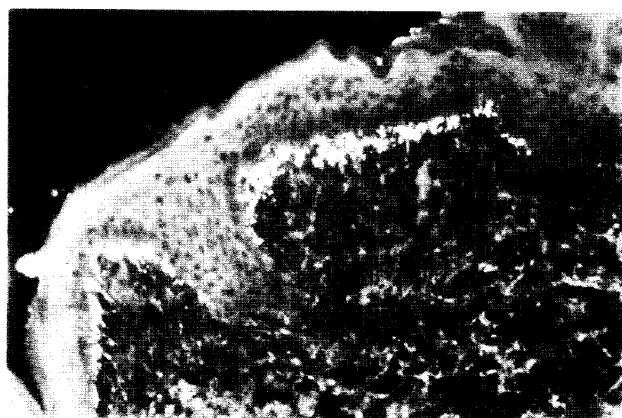
Sistemske bulozne eritemske lupus (lat. *lupus erythematosus systemicus bullosus* - LESB) predstavlja neožiljnu, subepidermalnu ABD koja ispunjava ARA (*American Rheumatological Association*) kriterijume za dijagnozu sistemskog eritemskog lupusa.

Direktnim IF testom u perilezionalnoj koži se mogu detektovati IgG, IgM, IgA i C3 depoziti duž ZBM. Morfološki, depoziti mogu biti identični sa onima koji se vidaju kod EBA [25] ili su slični onima koji se nalaze kod nebuloznih formi sistemskog eritemskog lupusa.

Indirektni IF test je obično negativan, titar antitela je nizak. IIF-SS testom se otkrivaju cirkulišuća IgG anti-ZBM antitela su usmerena prema target antigenima koji su lokalizovani u lamini denzi koja su lokalizovana na dermalnoj strani rascepa (amino-terminalni domen kolagena tip VII) [12].

Dermatitis herpetiformis (Morbus Duhring)

Dermatitis herpetiformis, tzv. Duhringova bolest (lat. *dermatitis herpetiformis* - Duhring - DHD) predstavlja pruritičnu, vezikulo-buloznu subepidermalnu ABD koja je udružena sa simptomatskom ili asimptomatskom gluten-senzitivnom enteropatijom. Najznačajniji imunopatološki kriterijum za dijagnozu DHD je prisustvo granularnih IgA depozita u vrhovima dermalnih papila (Slika 5) ili duž ZBM u intaktnoj koži [1] koji se dokazuju DIF testom kod 100% pacijenata [26]. Kod 50% pacijenata istovremeno sa IgA mogu da se nađu i C3 depoziti. Pri-



Slika 5. *Dermatitis herpetiformis Duhring* - DIF: granularni IgA depoziti u vrhovima dermalnih papila

Fig. 5. *Dermatitis herpetiformis Duhring* - DIF: granular IgA deposits at the tips of dermal papillae

sustvo multiplih imunoreaktanata (IgG i/ili IgM ili oba, zajedno sa IgA depozitima) ređi je, ali moguće nalaz.

Indirektnim IF testom nije moguće otkriti cirkulišuća anti-ZBM antitela, ali je moguće detektovati druga, brojna antitela protiv antigena koji ne pripadaju koži, a koja su visoko specifična za DHD. Kod 80% pacijenata postoje cirkulišuća IgA anti-endomizijalna antitela (usmerena prema tkivnim transglutaminazama endomizijuma) koja pored toga što su visoko specifična za DHD sugerišu i na postojanje udružene gluten-senzitivne enteropatije. [27]. U serumu obolelih postoje i manje specifična antitela kao što su IgA anti-gliadinska i IgA anti-retikulinska antitela.

Linearna IgA bulozna dermatoza

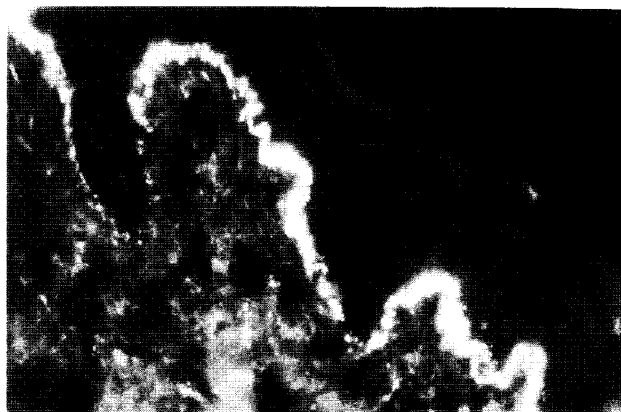
Linearna IgA bulozna dermatoza (LABD) je subepidermalna ABD koju karakteriše prisustvo linearnih, homogenih IgA depozita duž ZBM. Depoziti se dokazuju DIF testom u perilezionalnoj klinički neizmenjenoj koži. Istovremeno, ali mnogo ređe, sa IgA depozitima, duž ZBM mogu da se dokažu C3 depoziti koji fluoresciraju slabijim intenzitetom, a kod 20%-30% pacijenata i IgM i/ili IgG depoziti. Indirektnim IF testom se detektuju cirkulišuća IgA anti-ZBM antitela kod 20% odraslih osoba i kod 72% dece obolele od LABD.

Sistemske bolesti vezivnog tkiva

Direktni IF test je veoma koristan u dijagnostici sistemskih bolesti vezivnog tkiva, posebno eritemskog lupusa (lat. *lupus erythematosus* - LE), kao i u diferenciranju od drugih oboljenja sa sličnom kliničkom i histološkim slikom. S obzirom da postoje i lažno pozitivni i lažno negativni nalazi, nalaz DIF testa se mora interpretirati u kontekstu kliničke i histološke slike, kao i ostalih (seroloških) testova [28].

Lupus erythematosus

Karakterističan nalaz DIF-a, kod svih oblika, predstavlja prisustvo imunoglobulina i komplementa duž ZBM u lezijama kože, sa različitim učestalostu, i to kod: hroničnog, tj. kutanog eritemskog lupusa (lat. *lupus erythematosus chronicus* - LEC) u 30-94% [29], subakutnog kutanog eritemskog lupusa (lat. *lupus erythematosus subacutus cutaneus* - LESC) u 54-100%; i sistemskog eritemskog lupusa (lat. *lupus erythematosus systemicus* - LES) u 50-100% slučajeva [28]. Predominantni imunoreaktanti (IR) su IgM i IgG, a potom i C3 i IgA [29,30]. Morfološki izgled depozita IR duž ZBM je različit i opisuje se kao: linearan, granularan, mrljast (homogen). Depoziti mogu biti tanki, debeli, kontinuirani i diskontinuirani [29,30]. U lezijama pacijenata sa LESC se takođe nalaze depoziti IR u ZBM, slično onima kod LEC, ali i granularni/prašnasti depoziti IR u jedru i citoplazmi bazalnih keratinocita. Ovaj tip fluorescencije se javlja u vezi sa prisustvom anti-



Slika 6. *Lupus erythematosus systemicus* - lupus band test: debeli, kontinuirani, granularni depoziti IgG i IgM duž ZBM

Fig. 6. *Lupus erythematosus systemicus* - lupus band test: thick, granular, homogenous IgG and IgM deposits along ZBM

RoSS-A i anti-La/SS-B antitela [31]. Međutim, ovakav nalaz se, retko, može videti i kod drugih oboljenja, kao što su dermatomiozitis, vaskulitis, reumatoidni artritis, kutana porfirija tarda (lat. *porphyria cutanea tarda*), rozacea, lihen planus (lat. *lichen planus*) [28]. Pored navedenih, u kutanim lezijama se kod LES mogu naći i IR u zidovima superficijalnih krvnih sudova, slično vaskulitisu, kao i fluorescencija u jedrima keratinocita. Kao nespecifičan nalaz kod svih oblika LE mogu se detektovati i koloidna (Civatteova) telašca koja vezuju imunoglobuline [28].

Detekcija IR duž ZBM u isečcima zdrave kože fotoprotektovanih i fotoekspoziranih regiona označava se kao pozitivan *lupus band test* (LBT) (Slika 6). Kod LES je LBT sa fotoprotektovane zdrave kože pozitivan kod 26-92% pacijenata, a sa zdrave fotoekspozirane kože kod 50-90% pacijenata. Kada se u LBT nađu samo depoziti IgM specifičnost testa za dijagnozu SLE je 97%, a kada se detektuju depoziti IgG, sami ili udruženi sa IgM depozitima, dijagnostička specifičnost LBT raste do 99%. Pozitivan LBT kod LES korelira sa aktivnošću bolesti i oštećenjem bubrega [32]. LBT je kod LEC i LESC, po pravilu negativan.

Indirektnim IF testovima kod pacijenata sa LES se otkriva visoka incidencija anti-nukleusnih antitela (ANA).

Dermatomyositis

Pozitivan DIF test (u smislu prisustva IR u ZBM sa lezije) kod dermatomiozitisa (lat. *dermatomyositis*) vida se daleko ređe nego kod LE. Intenzitet fluorescencije je slabiji nego kod LE [28]. Takođe, vidaju se i koloidna telašca, dok je LBT po pravilu negativan.

Sclerodermia

DIF test ima malo značaja za dijagnozu, diferencijalnu dijagnozu i evaluaciju sklerodermije (lat.

sclerodermia). Kod sistemske skleroze se u kutanim lezijama retko nalaze depoziti IR u ZBM [33], premda neki radovi ukazuju na veću učestalost ovog nalaza [34]. Pacijenti sa pozitivnim nalazom verovatno imaju sindrom preklapanja sa LES ili dermatomiozitisom [33]. LBT je po pravilu negativan. DIF test je kod cikrumske skleroze (lat. *morphea*) obično negativan i nema značaja za dijagnozu [28].

Mešovita bolest vezivnog tkiva

Mešovitu bolest vezivnog tkiva odlikuju zajedničke kliničke karakteristike SLE i sistemske skleroze i prustvo visokog titra U1 ribonukleoproteina (U1/RNP) antitela. DIF testom se u klinički neizmenjenoj koži registruje *speckled* (tačkasta) fluorescencija u jedru keratinocita, posle aplikacije IgG koja najčešće odgovara prisustvu U1/RNP antitela [35]. Ovaj nalaz je specifičan ali nema apsolutnu dijagnostiku vrednost. U nekim slučajevima (15%) može se registrovati i prisustvo imunoreaktanata u zoni bazalne membrane [36].

Vasculitis

DIF test se koristi za dijagnozu leukocitoklazijskog vaskulitisa, kod koga se mogu naći depoziti C3, IgM, a ređe i IgA i IgG u zidovima krvnih sudova (uglavnom superficijalnih), ali i u lumenima, kao i u ekstravaskularnom prostoru [37]. Kod *purpure Hennoch-Schoenlein* nalazi se isti oblik fluorescencije, ali je dominantan reaktant IgA, kako u koži, tako i u bubrezima [37]. Da bi se dobio adekvatan nalaz, neophodno je biopsirati što svežiju leziju, jer je procenat pozitivnih nalaza kod lezija starijih od 24 sata izuzetno nizak. Pored nalaza IR u krvnim sudovima, kod vaskulitisa se retko mogu naći i IR u ZBM [38].

Lichen ruber planus

Karakteristična klinička slika i specifičan histopatološki nalaz su obično dovoljni za dijagnozu lichen ruber planusa (lat. *lichen ruber planus* - LRP). Iako se DIF rutinski ne koristi u dijagnostici, u slučajevima kada klinička slika i histopatološki nalaz nisu karakteristični za LRP, kada postoje klinička i histopatološka preklapanja sa LE ili kada je neophodno diferencirati lichen mukoza od cikatričnog pemfigoida, DIF test može biti od koristi. DIF test je pozitivan kod najvećeg broja pacijenata sa LRP, karakterišu ga fluorescencija koloidnih (Civatteovih) telašaca i ZBM za koje se vezuju depoziti IgM i fibrinogena. Koloidna telašca su grupisana i prisutna u velikom broju. Depoziti duž ZBM imaju granularni izgled.

Erythema multiforme

Direktnim IF testom se otkrivaju depoziti imunoglobulina, najčešće IgM u superficijalnim krvnim sudovima u dermu i koloidna telašca. Ovakav nalaz DIF-a ima značaja u diferenciranju buloznih formi multiformnog eritema (lat. *erythema multiforme bullosus*) prema drugim autoimunim bolestima.

Zaključak

Imunofluorescencija je laboratorijska tehnika od neprocenjivog značaja za dijagnostiku primarno autoimunih buloznih dermatitoza, bolesti vezivnog tkiva i vaskulitisa. Za dijagnozu, a posebno za diferenciranje subepidermalnih autoimunih buloznih dermatitoza kod kojih mogu da postoje klinička, histopatološka i imunopatološka preklapanja, *split-skin* tehnika i tehnika "raslojene-pocepane kože" predstavljaju zlatne dijagnostičke standarde. Nezavisno od vrste prime-njene IF tehnike, svi dobijeni rezultati moraju se uporediti i procenjivati zajedno sa kliničkim i histopatološkim nalazom.

Literatura

1. Beutner EH, Kumar V, Crasny SA, Chorzelski TP. Immunofluorescence in immunodermatology. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. Immunopathology of the skin. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 1987. p. 3-40.
2. Katz SI, Halprin KM, Inderbitzin TM. The use of human skin for the detection of anti-epithelial autoantibodies: a diagnostic and prognostic test. *J Invest Dermatol* 1969;53:390-9.
3. Kumar V, Beutner EH. Monkey esophagus: a unique antigenic substrate in immunodermatology. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, eds. Immunopathology of the skin. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 1987. p. 65-90.
4. Helou J, Allbritton J, Anhalt GJ. Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of the skin. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:441-7.
5. Dahl M. Immunofluorescence in dermatology. In: Dahl M, ed. Clinical immunodermatology. 2nd ed. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1988.
6. Black MM, Bhogal BS, Willstred E. Immunopathological techniques in the diagnosis of bullous disorders. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 1989;69(Suppl 151):96-105.
7. Medenica-Mojisilovic L, Fenske NA, Espinoza CG. Epidermolysis bullosa acquisita: direct immunofluorescence and ultrastructural studies. *Am J Dermatopathol* 1987;9(4):324-33.
8. Gammon WR, Kowalewski C, Chorzelski TP, Kumar V, Briggman RA, Beutner EH. Direct immunofluorescence studies of sodium chloride-separated skin in differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:664-70.
9. Woodley DT, Sauder D, Talley MY, Silver M, Groten-dorst G, Quarnstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *J Invest Dermatol* 1983;81:49-53.

10. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO, Queen LL, Wheeler CE. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride separated skin. *J Invest Dermatol* 1984;82:139-44.
11. Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 1998;9:651-8.
12. Medenica LJ, Nikolić MM, Milinković M. Imunofluorescentna dijagnostika patoloških procesa u zoni epidermalne bazalne membrane. Zbornik radova II Beogradski dermatološki dani simpozijum: 1996, novembar 15-16; Beograd: Medicinski fakultet; 1996. str. 47-52.
13. Hu CH, Michel B, Schlitz JR. Epidermal acantholysis in vitro by pemphigus antibody. *Am J Pathol* 1978;90:345-51.
14. Mahoney MG, Wang Z, Rotenberger K, Koch PJ, Amagay M, Stanley JR. Explanation for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:461-8.
15. Yokel BK, Hood AF, Anhalt GJ. Induction of acantholysis in organ explant culture by penicillamine and captopril induced pemphigus. *Arch Dermatol* 1989;125:1367-70.
16. Sams WM, Schur PH. Studies of the antibodies in pemphigus and pemphigoid. *J Lab Clin Med* 1973;82:249-54.
17. Supapannachart N, Mutasim DF. The distribution of IgA pemphigus antigen in human skin and the role of anti-cell surface antibodies in the induction of intraepidermal acantholysis. *Arch Dermatol* 1993;129:605-8.
18. Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Troy JL, Fairley JA, et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997;100:256-63.
19. Kelly S, Cerio R, Bhogal BS, Black MM. The distribution of IgG subclasses in pemphigoid gestationis: PG factor is an IgG1 autoantibody. *J Invest Dermatol* 1989;92:659-98.
20. Katz SI, Hertz KC, Yaoita H. Herpes gestationis: immunopathology and characterisation of the "HG" factor. *J Clin Invest* 1976;57:1434-41.
21. Medenica LJ, Janković B, Milisavljević V. Pemphigoid (herpes) gestationis. U: Medenica LJ, ur. Promene na koži u trudnoći. Beograd: CIBIF; 1995. str. 27-33.
22. Domloge-Hultsch N, Anhalt GJ, Gammon WR, Lazarova Z, Briggaman RA, Welch M, et al. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid: a subepithelial bullous disorder. *Arch Dermatol* 1994;130:1521-9.
23. Pearson JR, Rogers RS. Bullous and cicatricial pemphigoid: clinical, histopathologic and immunopathologic correlation. *Mayo Clin Proc* 1977;52:54-64.
24. Woodley DT, Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita. In: Jordon RE, editor. Immunologic diseases of the skin. Norwalk (CT): Appleton & Lange; 1991. p. 321-33.
25. Gammon WR, Briggaman RA. Bullous eruption of systemic lupus erythematosus. In: Wojnarowska F, Briggaman RA, editors. Management of blistering diseases. New York: Raven Press; 1990. p. 263-75.
26. Leonard JN, Haffenden GP, Fry L. Dermatitis herpetiformis. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. Immunopathology of the skin. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 1987. p. 433-53.
27. Rose C, Dieterich W, Brocker EB, Schuppan D, Zillikens D. Circulating autoantibodies to tissue transglutaminase differentiate patients with dermatitis herpetiformis from those with linear IgA disease. *J Am Acad Dermatol* 1999;41:957-61.
28. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *JAAD* 2001;45(6):803-22.
29. Dahl MV. Usefulness of direct immunofluorescence in patients with lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1983;119:101-7.
30. Cernea SS, Sotto MN, Oliveira ZNP, Vilela MAC, Rivitti EA, Miyauchi LM, et al. Cutaneous lupus erythematosus: direct immunofluorescence and epidermal basal membrane study. *Int J Dermatol* 1992;31(4):260-4.
31. Lipsker D, DiCesare MP, Cribier B, et al. The significance of the "dust-like particle" pattern of immunofluorescence: a study of 66 cases. *Br J Dermatol* 1998;138(6):1039-42.
32. Liu T, Liu FR. Prognostic value of lupus band test in unexposed normal skin of patients with systemic lupus erythematosus. *Chin Med J* 1989;102(8):620-8.
33. Winkelmann RK, Carapeto FJ, Jordon RE. Direct immunofluorescence in the diagnosis of scleroderma syndromes. *Br J Dermatol* 1977;96:231-8.
34. Kulthanan K, Jiamton S, Taiyaitiang C, Pinkaew S, Suthipinittharm P. Direct immunofluorescence study in Thai patients with scleroderma. *J Med Assoc Thai* 2006;89(10):1670-6.
35. Bukilica MN, Andrejević SB, Bonaci-Nikolić BM, Nikolic MM. Speckled ANA in keratinocytes: what does it mean? *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(4):499-504.
36. Margo CM, Crowson AN, Regauer S. Mixed connective tissue disease: a clinical, histologic and immunofluorescence study of eight cases. *Am J Dermatopathol* 1997;19(3):206-13.
37. Kumar V, Beutner EH, Chorzelski TP. Immunopathology of blood vessels: immunopathology of vasculitis. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. Immunopathology of skin. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1987. p. 745-55.
38. Kulthanan K, Pinkaew S, Jiamton S, Mahaisavariya P, Suthipinittharm P. Cutaneous leukocytoclastic vasculitis: the yield of direct immunofluorescence study. *J Med Assoc Thai* 2004;87(5):531-5.

Summary

Introduction

Immunofluorescence (IF) is a laboratory technique introduced to dermatology in 1960s for the purposes of investigating the pathophysiology and establishing the diagnosis of skin diseases, particularly autoimmune bullous diseases and connective tissues diseases. There are three basic types of IF techniques: the direct IF (DIF), which is used for the detection of antibodies and complement components fixed in the tissue, the indirect IF (IIF), which is used for the detection of circulating antibodies in patients' serum, and complement-fixed IIF (K-IIF), which is more sensitive in the detection of complement-binding circulating antibodies.

Autoimmune bullous diseases

Autoimmune bullous diseases (ABD) can be divided into two groups, depending on the site of blister formation: intraepidermal and subepidermal ABD. The detection of antibodies against the adhesion molecules by DIF technique in both groups of ABD has almost 100% diagnostic accuracy. The titer of

circulating antibodies detected and measured by IIF correlates with the activity of pemphigus, but not with the pemphigoid. There are also two modified IIF techniques routinely used, split-skin DIF and IIF, both are most employed in differentiating of subepidermal ABD, since they share many clinical, histopathological and immunopathological features.

Connective tissue diseases

DIF test is most useful in diagnosing the connective tissue diseases (CTD), especially lupus erythematosus. Since there are false positive and negative results, DIF findings should be correlated with clinical histological and serological features.

Vasculitis

DIF test is used for detection of different immunoreactants in leukocytoclastic vasculitis and Henoch-Schoenlein purpura.

Lichen planus, erythema multiforme

The characteristic pattern of fluorescence in DIF test can be found in most patients with these diseases.

Key words: Fluorescent Antibody Technique + trends; Dermatology; Diagnosis

Rad je primljen 4. IX 2007.

Prihvaćen za štampu 7. IX 2007.

BIBLID.0025-8105(2009):LXII:11-12:539-546.