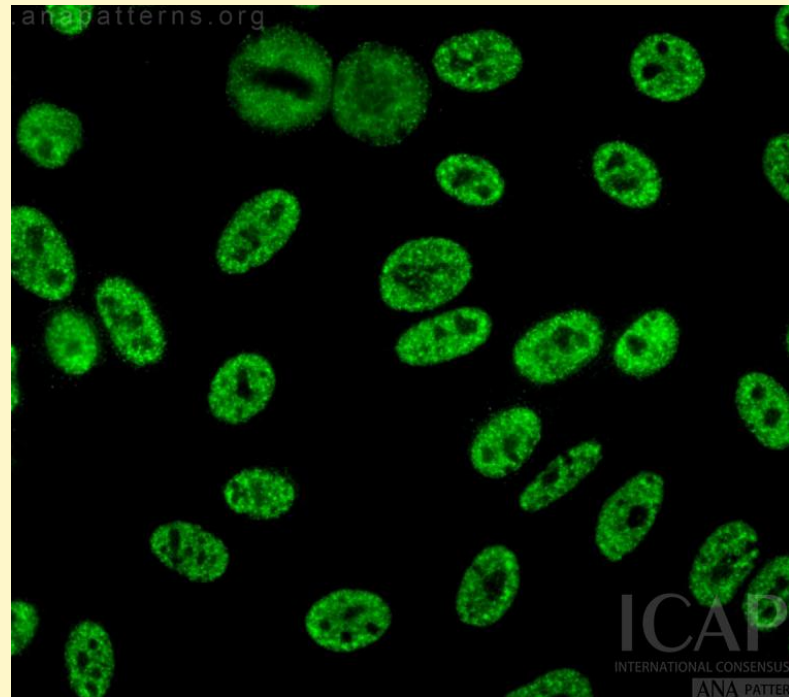


# IMUNOFLUORESCENCE



**Mgr. Petr Bejdák**

Ústav klinické imunologie a alergologie

Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

# IMUNOFLUORESCENCE

## Luminiscence

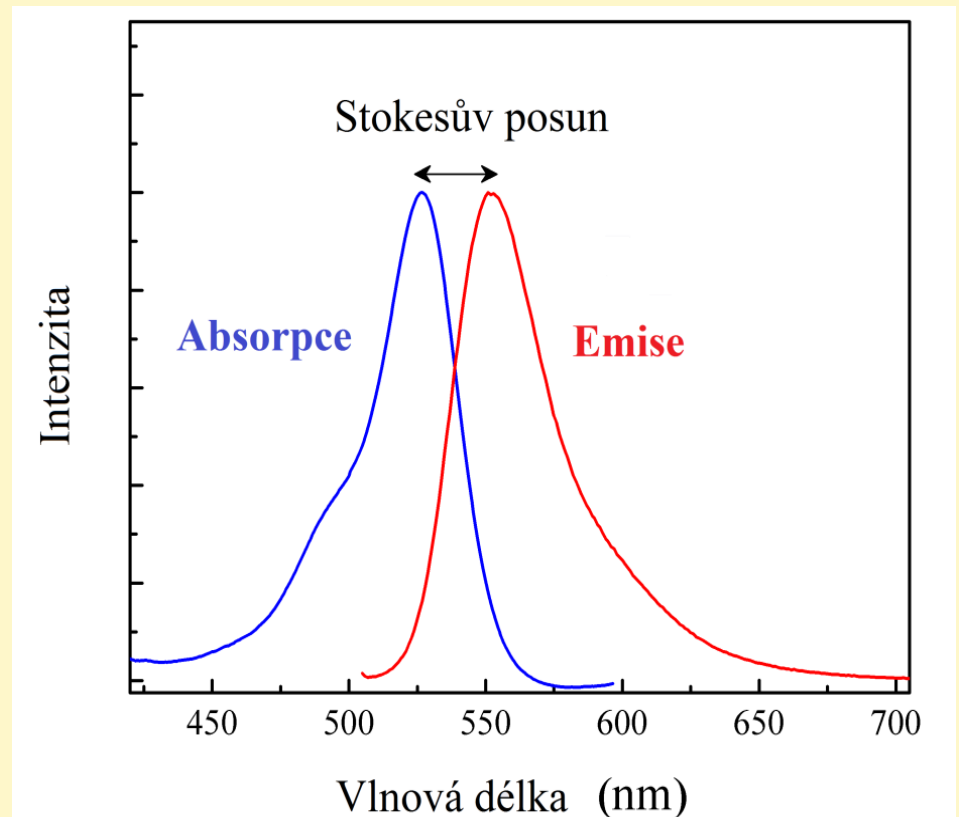
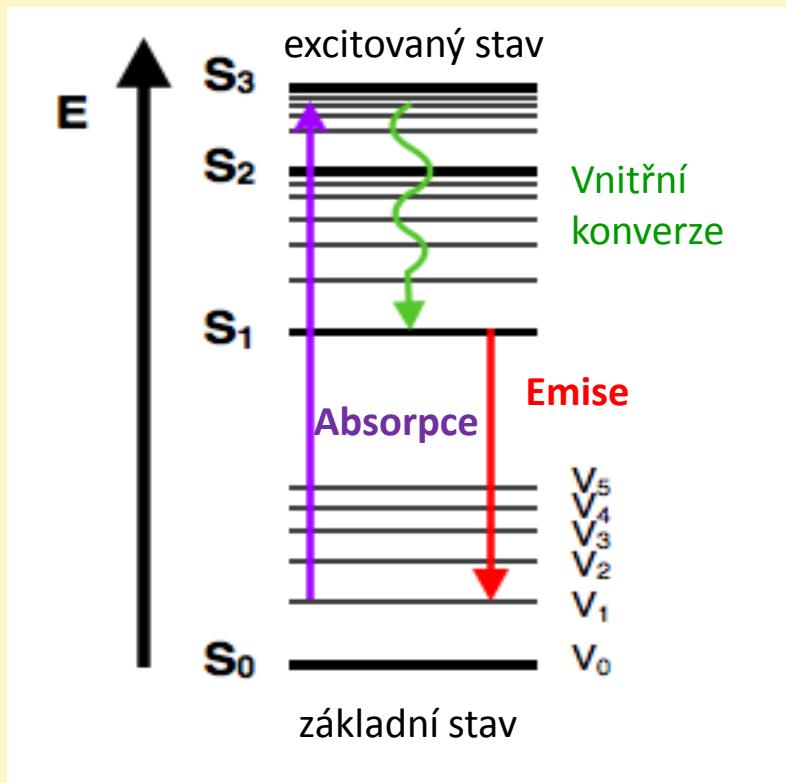
jev, při kterém látka emituje záření po absorpci excitačního záření (**fotoluminiscence**) nebo při chemické reakci (**chemiluminiscence**)



# IMUNOFLUORESCENCE

## Fluorescence

látka po absorpci excitačního záření uvolňuje emisní záření o delší vlnové délce (nižší energii)



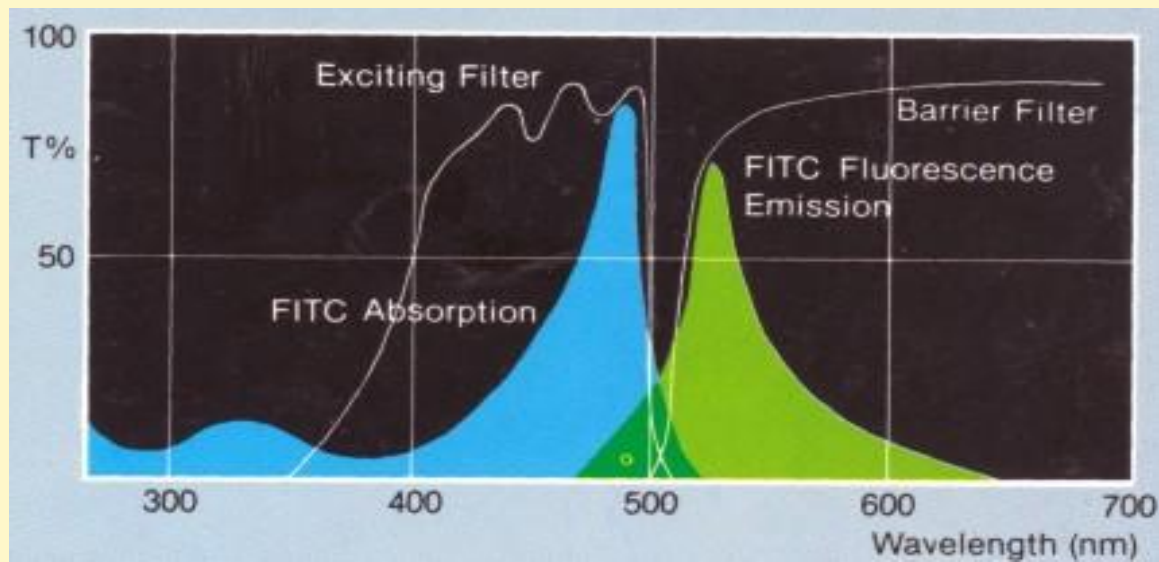
# IMUNOFLUORESCENCE

## Fluorescenční mikroskop

**Zdroj světla** – rtuťová výbojka, LED dioda

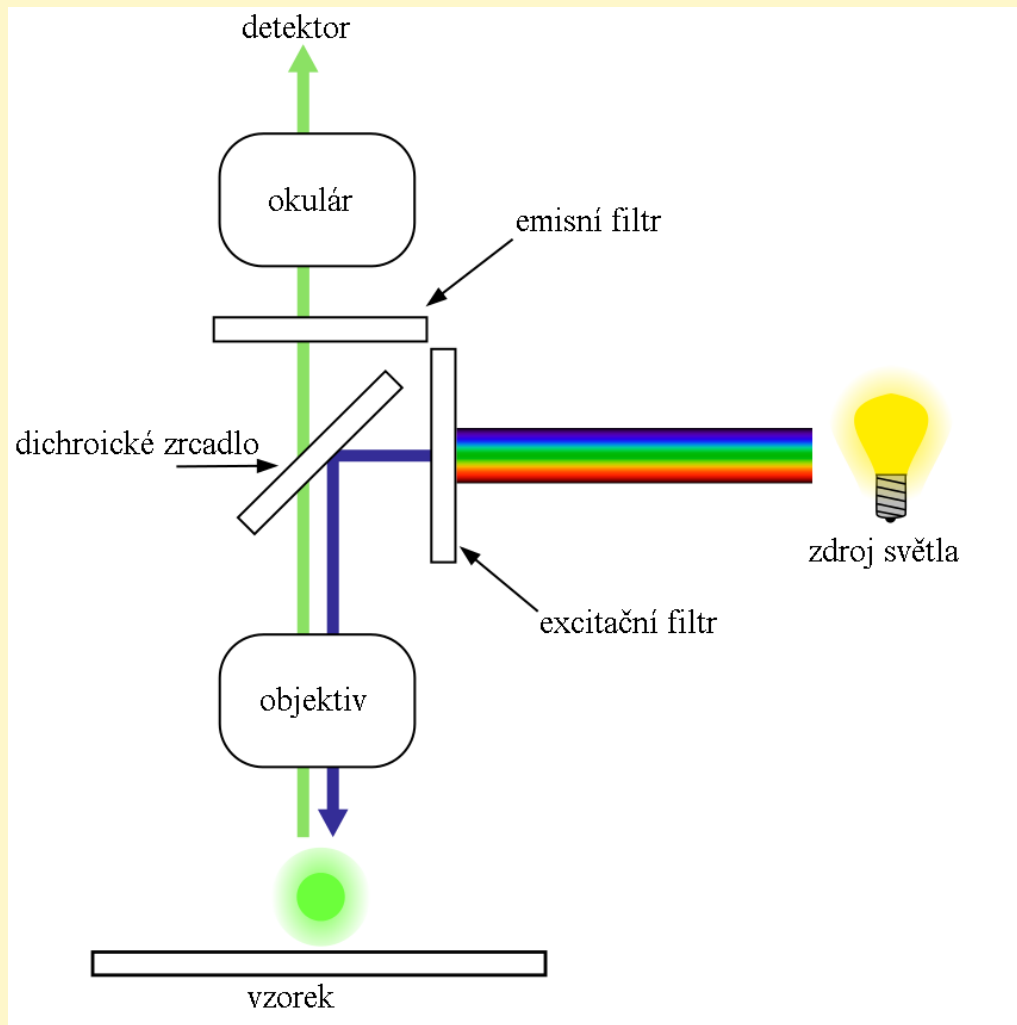
**Excitační filtr** - propouští pouze část spektra potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu záření v oblasti emisní vlnové délky, které by vytvářelo pozadí

**Emisní (bariérový) filtr** - propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního záření



# IMUNOFLUORESCENCE

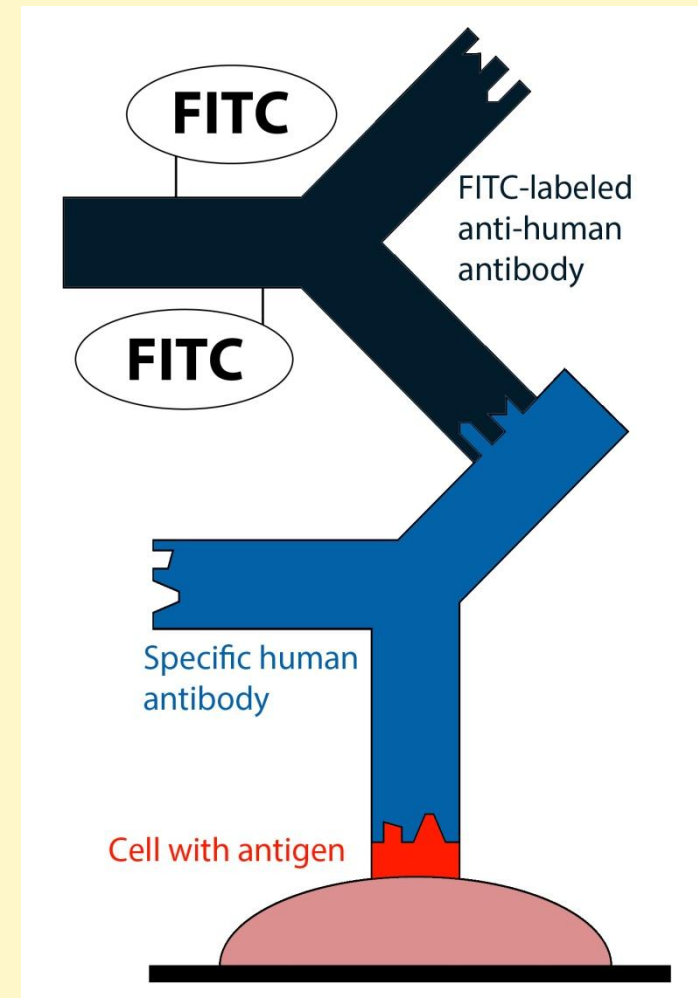
## Schéma fluorescenčního mikroskopu



# IMUNOFLUORESCENCE

## Konjugát

- protilátka s navázaných fluorescenčním barvivem (fluorochromem)
- nejčastěji používaný flourochrom je FITC (fluoresceinizothiokyanát) - excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (emituje zelené světlo)
- konjugát se specificky váže jen na imunoglobuliny určité izotypové třídy (IgG / IgM / IgA) – výběrem konjugátu stanovíme protilátky jen této třídy
- pro některá autoimunitní onemocnění má klinický význam výskyt autoprotílátek v určité izotypové třídě (př. celiakie - IgA)



# IMUNOFLUORESCENCE

## Přímá IF

slouží k detekci **antigenů** - vazba konjugátu přímo na antigen

**Využití:** histologie – průkaz antigenu ve tkáních

mikrobiologie – rychlá detekce patogenů v biologickém materiálu

## Nepřímá IF

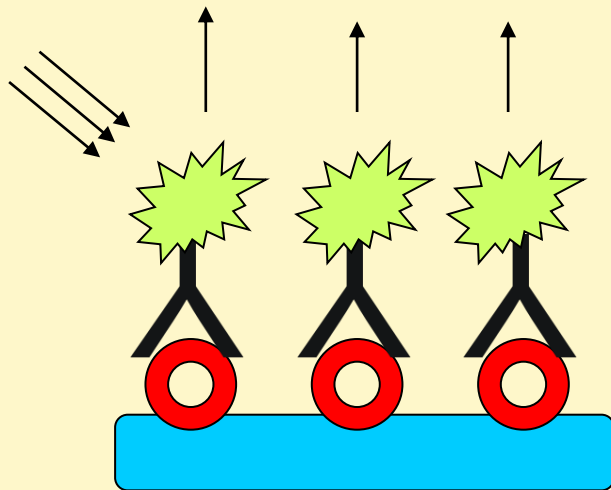
používá se k detekci **protilátek**, vazba protilátek a konjugátu ve 2 krocích:

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

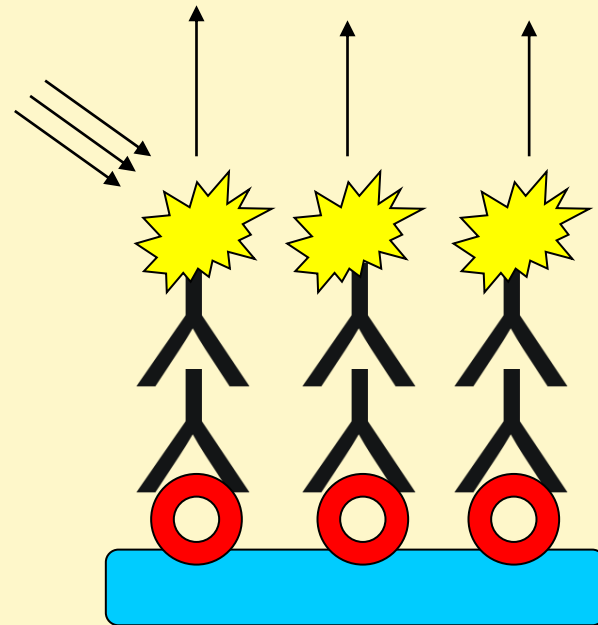
**Využití:** průkaz specifických protilátek, nejčastěji autoprottilátek

# IMUNOFLUORESCENCE

PŘÍMÁ



NEPŘÍMÁ





# IMUNOFLUORESCENCE

## Antigenní substráty používané při nepřímé IF

**Buňky HEp2 (Human Epithelial)** – k detekci ANA

- odvozeny od linie HeLa (karcinom děložního čípku)
- rychle se dělící buňky, v mitóze pozorovatelná chromatinová destička - důležitý znak pro odlišení jednotlivých typů ANA

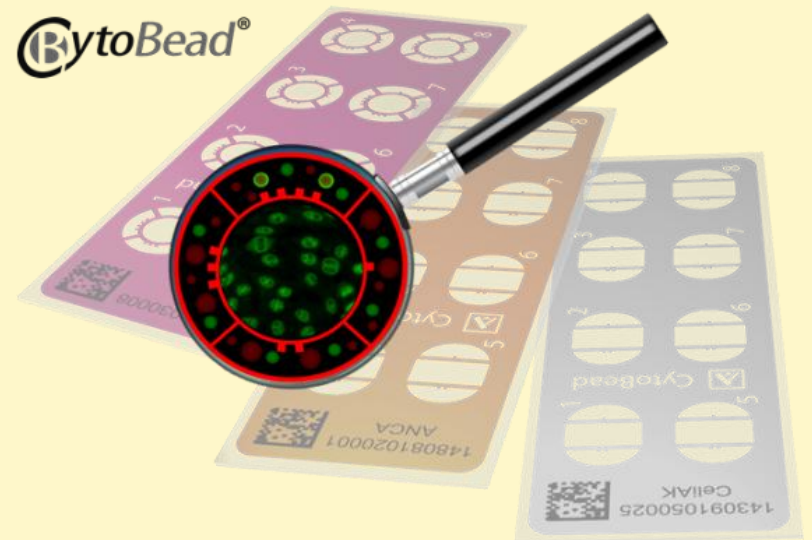
**Neutrofilní granulocyty** – k detekci ANCA

**Crithidia luciliae** – prvok,  
detekce protilátek proti dsDNA

**Opičí jícen** – detekce EMA

**LKS (liver, kidney, stomach)**

– kombinace 3 potkaních tkání  
k detekci AMA, ASMA, GPC, RET...



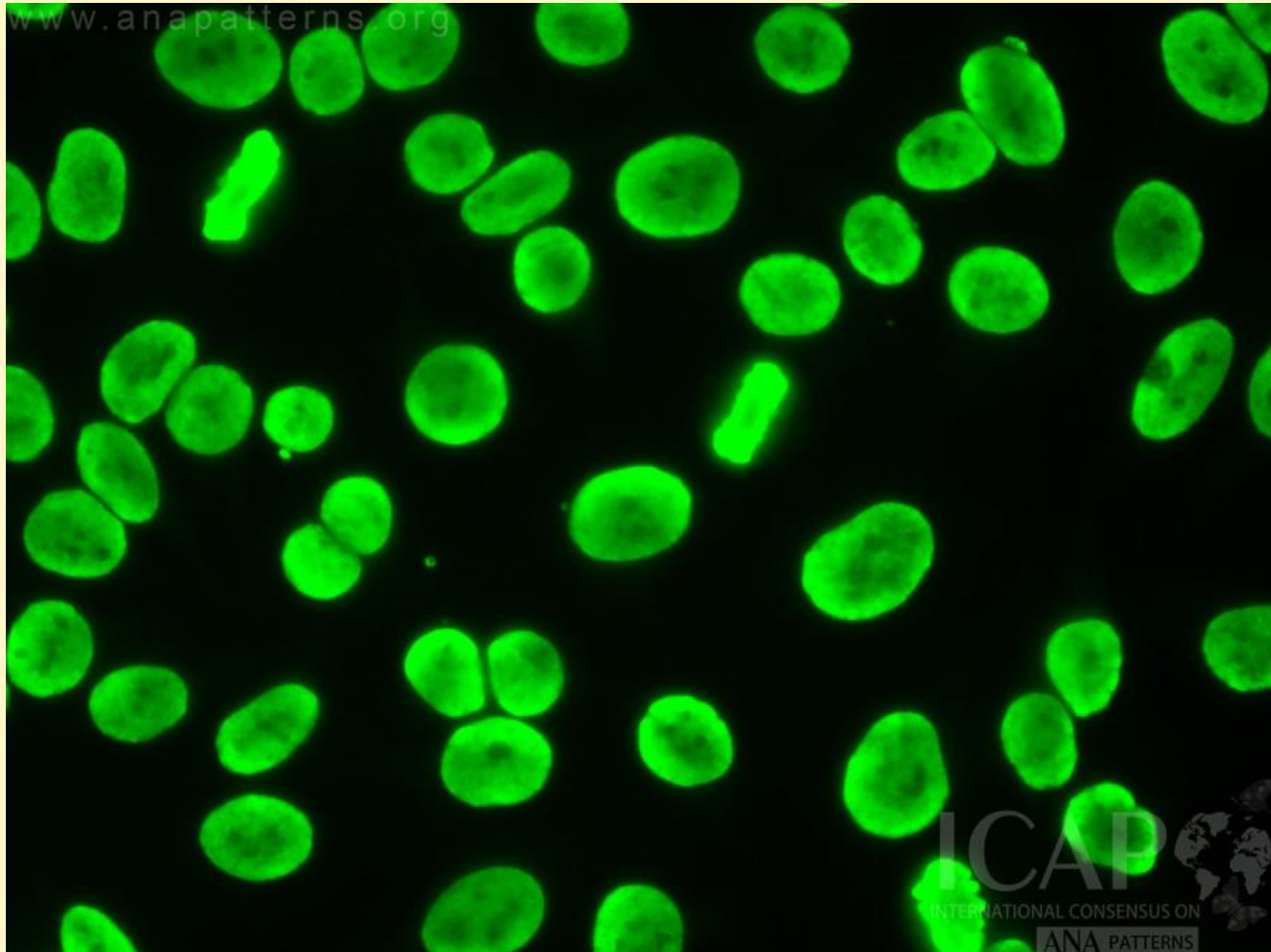
# IMUNOFLUORESCENCE

## ANA (anti-nuclear antibodies)

- velká skupina autoprotilátek
- vážou se na různé antigeny v jádře (DNA, RNA, centromery...)
- výskyt při různých autoimunitních onemocněních (systémový lupus erytematodes, Sjogrenův syndrom, revmatoidní artritida...)
- **fluorescenční obraz** v mikroskopu může vypadat stejně nebo podobně u různých autoprotilátek – když vidíme určitý obraz, nevíme ještě o jakou autoprotilátku jde (na jaký antigen se váže), k jejímu bližšímu určení mohou pomoci jiné metody (ELISA, imunoblot)

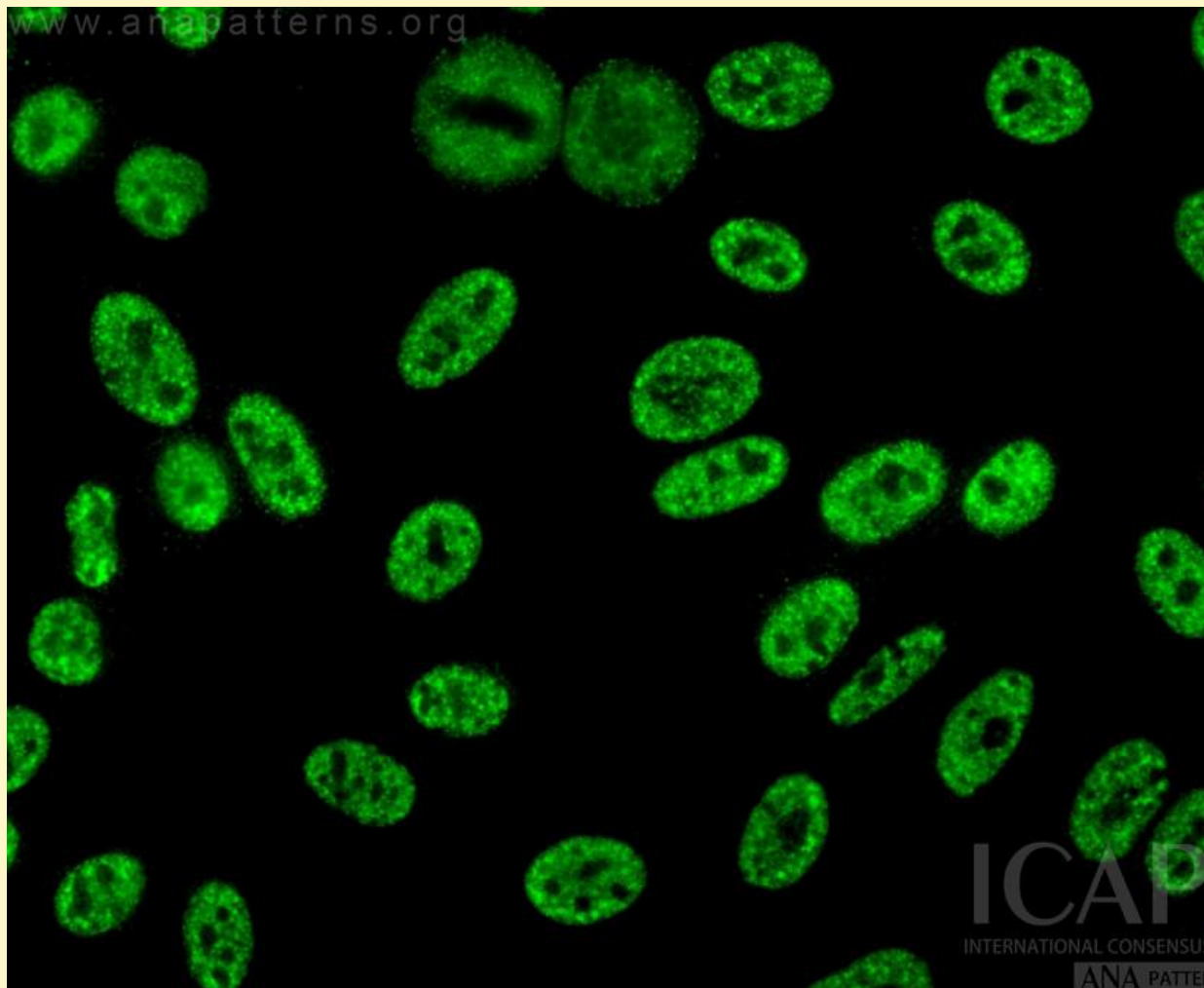
# IMUNOFLUORESCENCE

ANA – typ homogenní



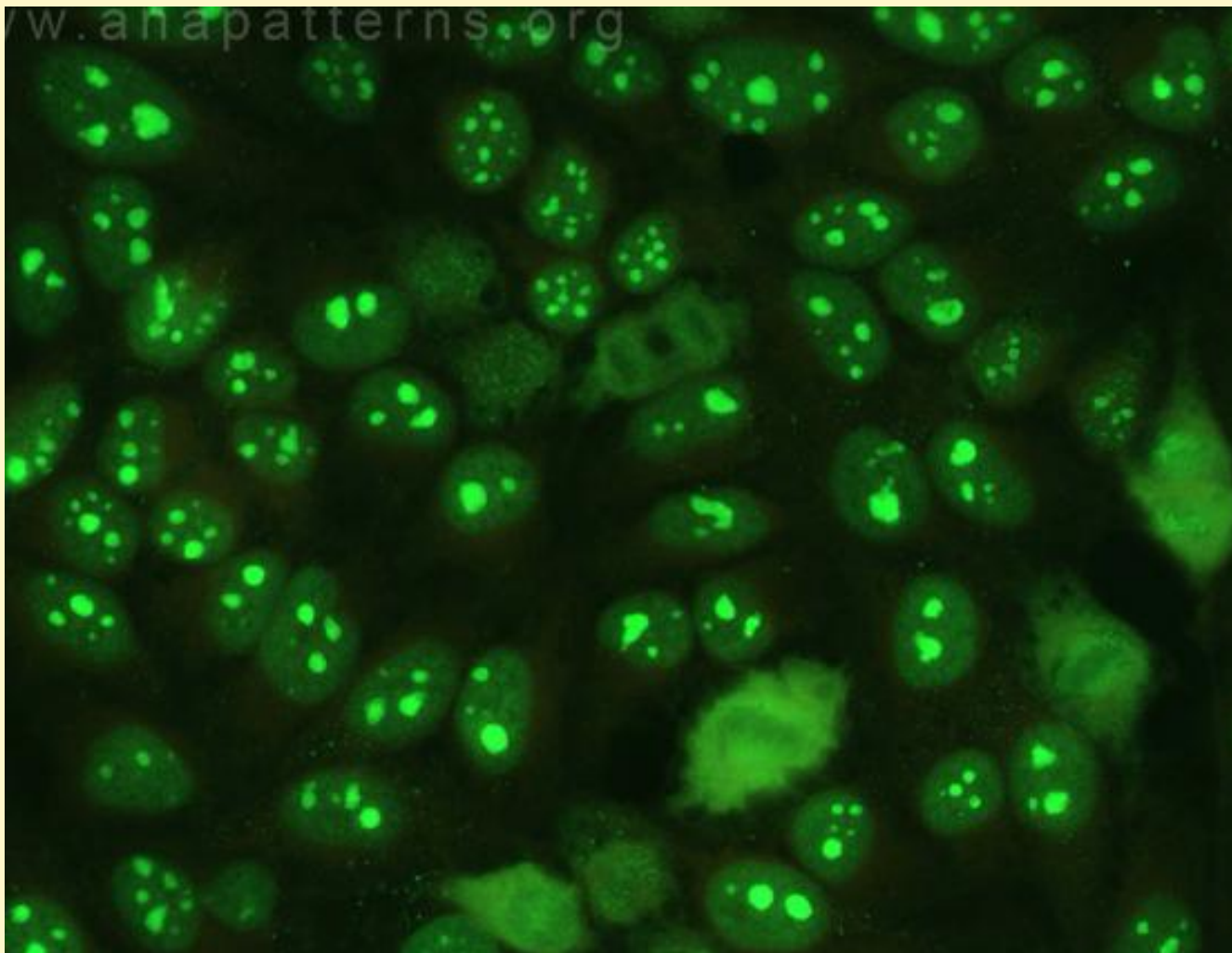
# IMUNOFLUORESCENCE

ANA - typ granulární (zrnitý)



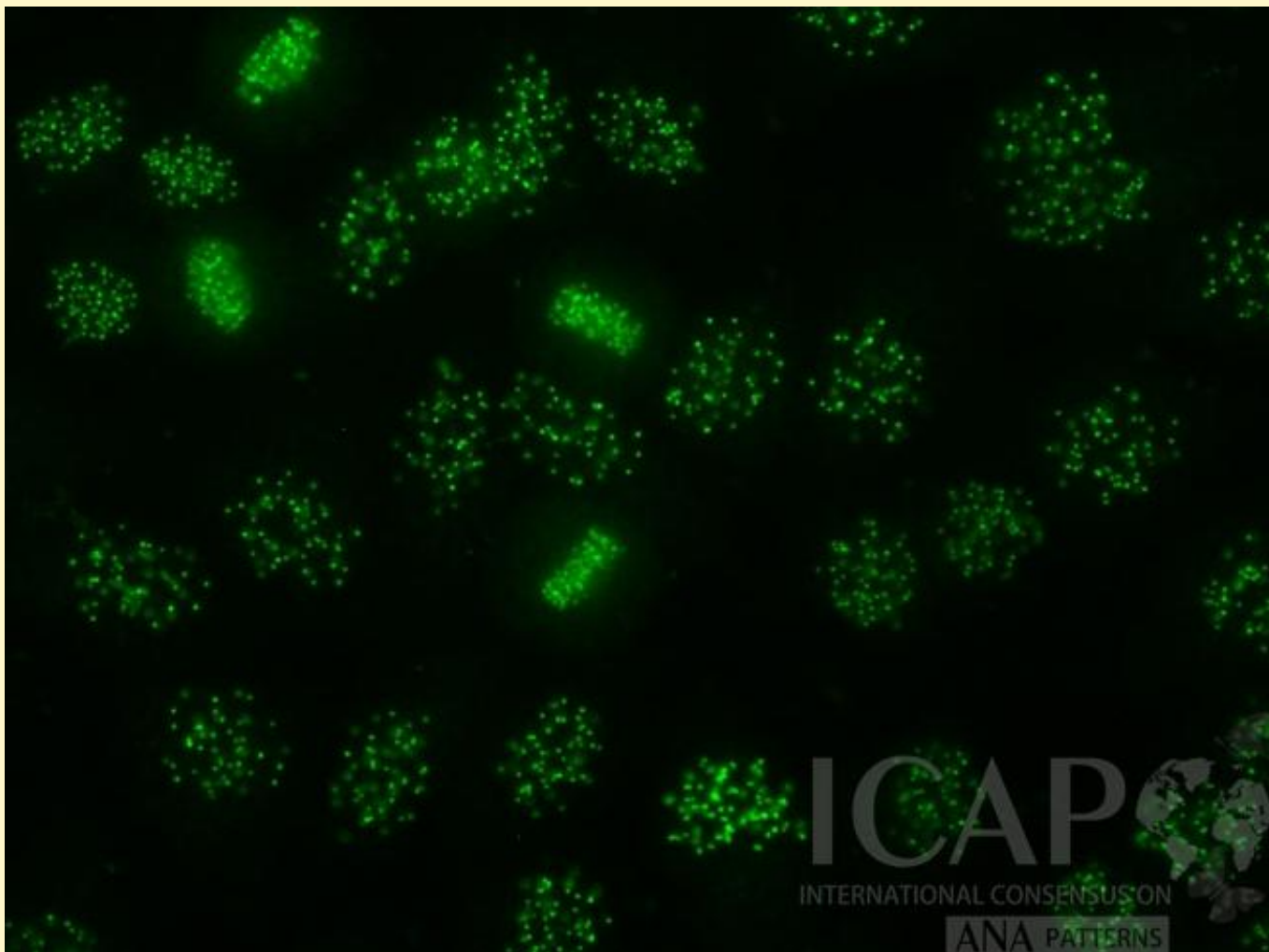
# IMUNOFLUORESCENCE

ANA - typ nukleolární (jadéřkový)



# IMUNOFLUORESCENCE

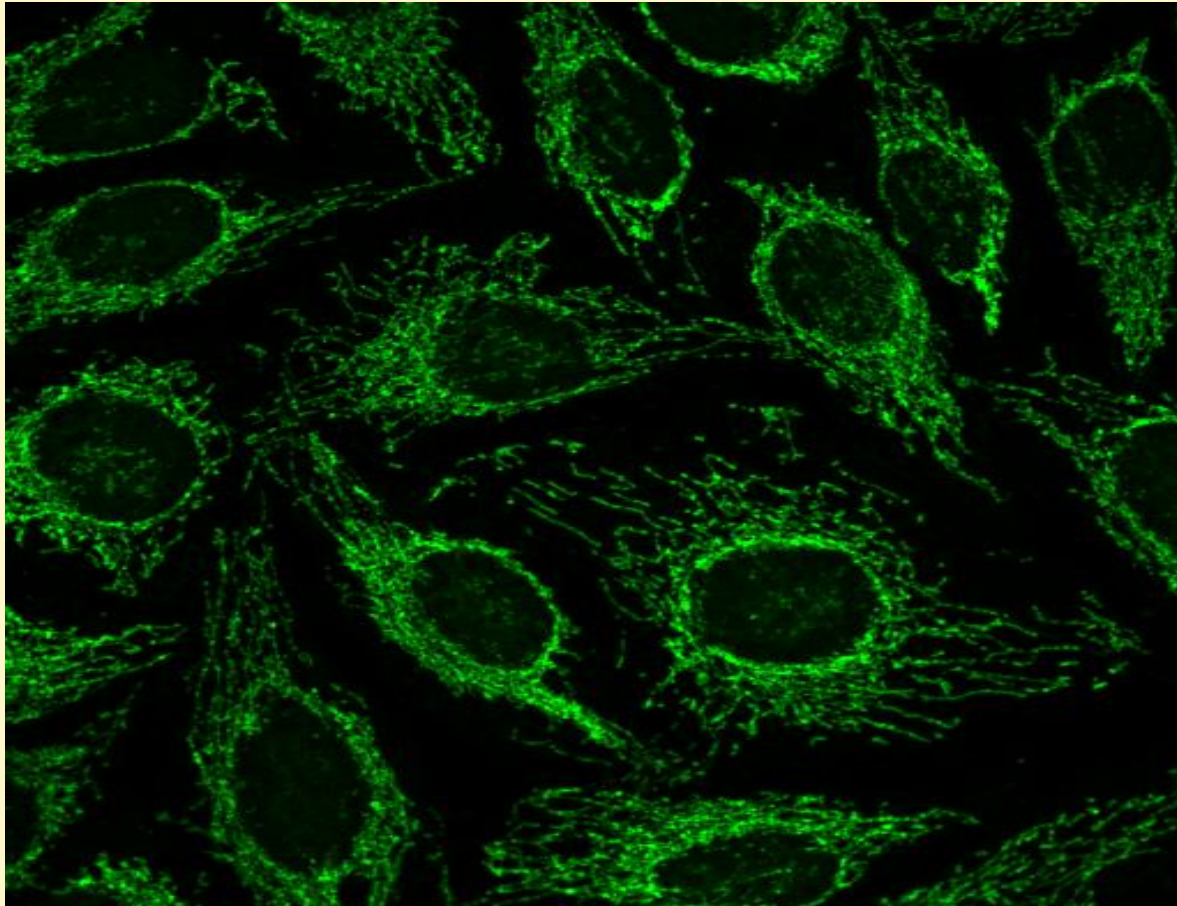
ANA - typ centromerový





# IMUNOFLUORESCENCE

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



# IMUNOFLUORESCENCE

**ANCA** (protilátky proti cytoplasmě neutrofilů)

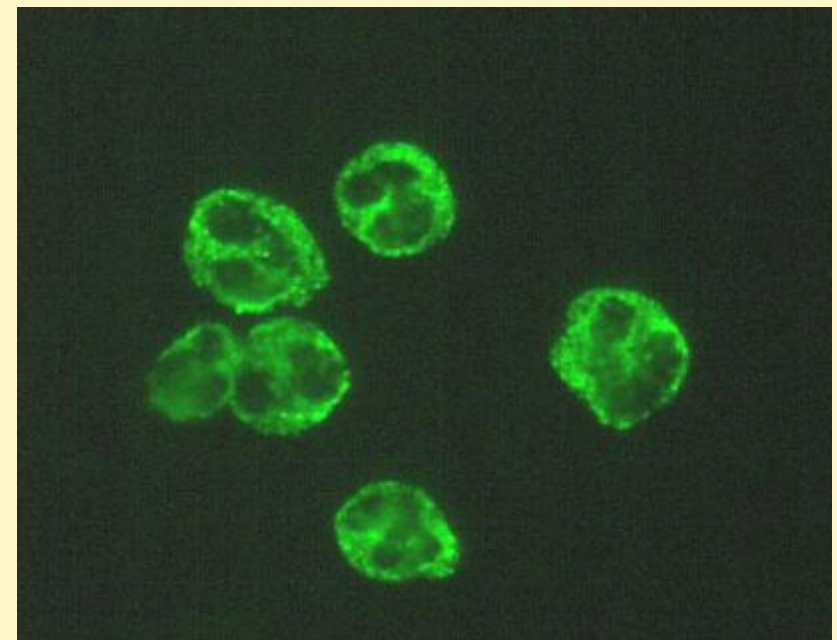
- pANCA – perinukleární - antigenem je MPO (myeloperoxidáza)

- cANCA – cytoplazmatická - antigenem je PR3 (proteináza 3) – typická pro onemocnění **(Wegenerova) granulomatóza s polyangiitidou**

-atypická ANCA - různé antigeny (elastáza, lysozym, katepsin...)



pANCA

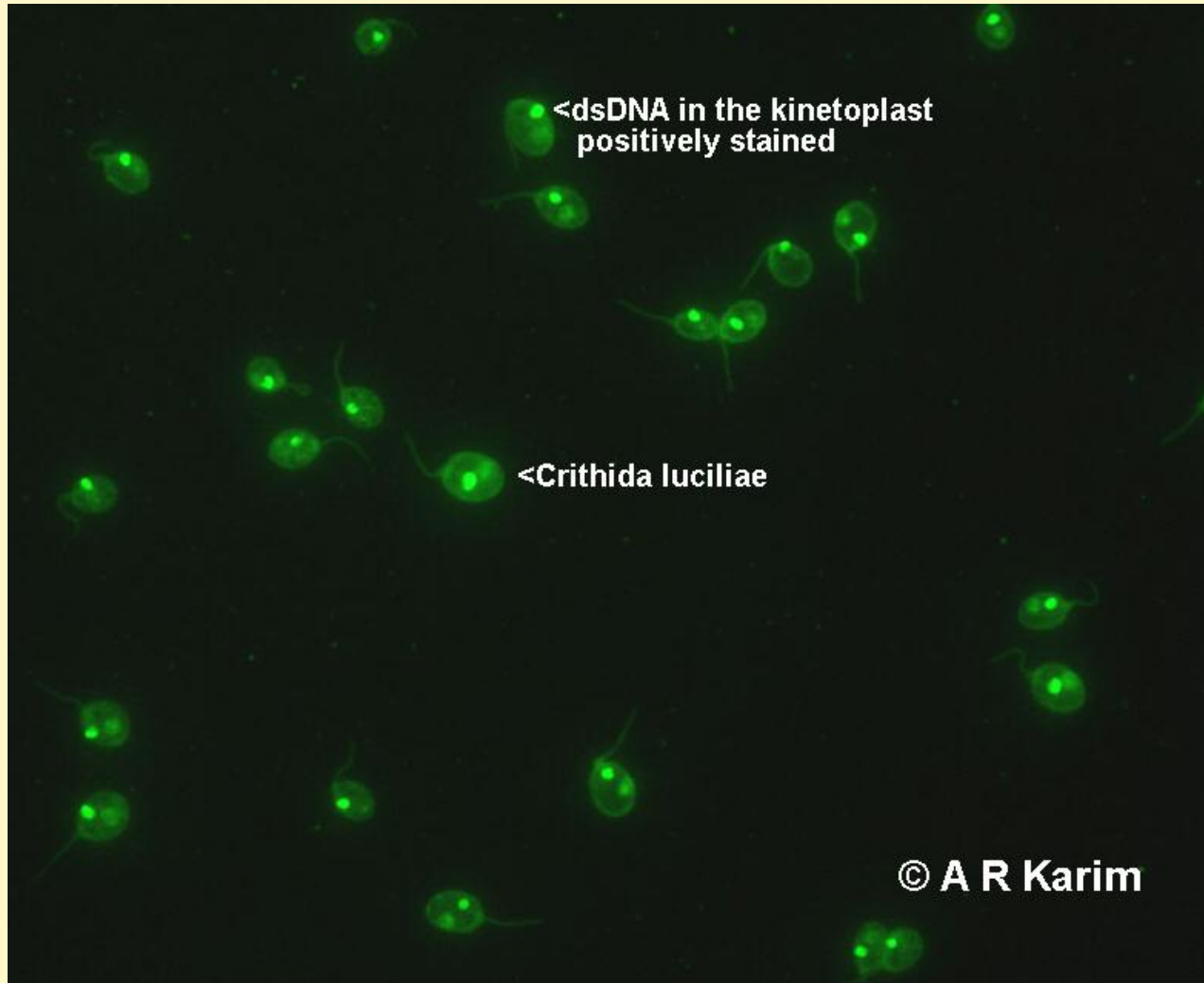


cANCA



# IMUNOFLUORESCENCE

## Prvok *Crithidia luciliae* - dsDNA



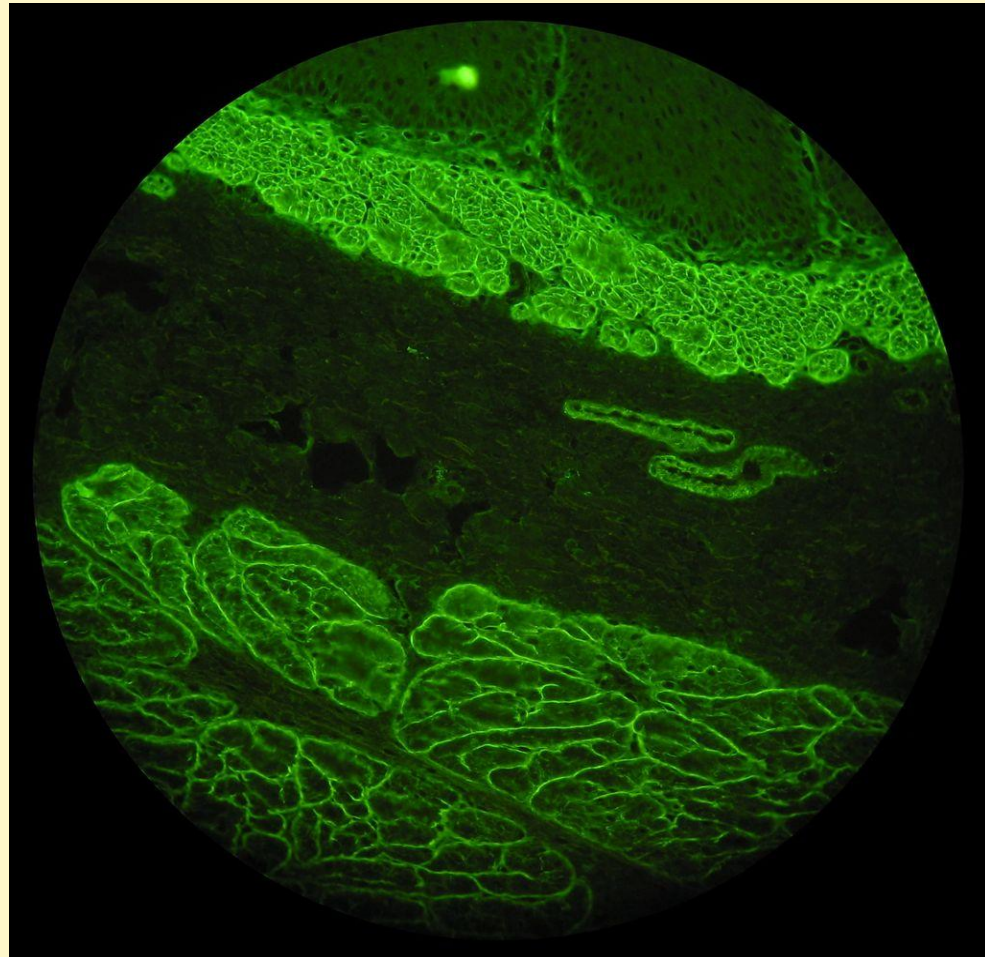
# IMUNOFLUORESCENCE

**EMA** (protilátky proti endomysiu) – na řezu opičího jícnu  
antigenem je TTG (tkáňová transglutamináza) – také ELISA detekce

- výskyt těchto

protilátek u **celiakie**

(hlavně ve třídě IgA)



# IMUNOFLUORESCENCE

**Substrát LKS** – kombinace 3 potkaních tkání:

- játra (liver)
- ledviny (kidney)
- žaludek (stomach)

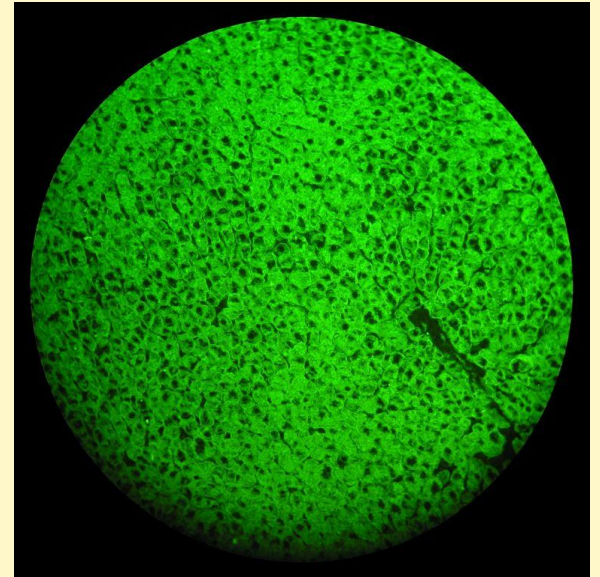
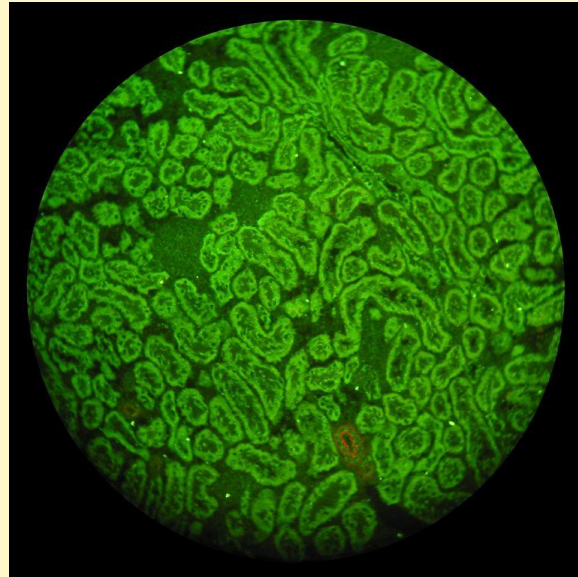
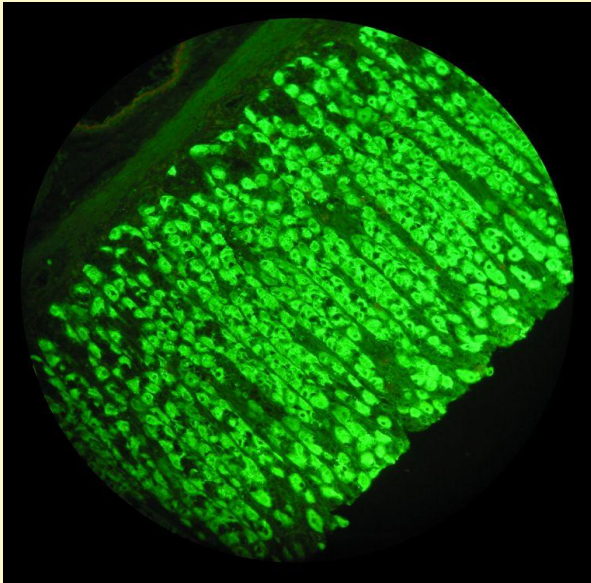
Lze pozorovat protilátky:

- AMA (antimitochondriální) – primární biliární cirhóza
- ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitní hepatitidy
- GPC (proti parietálním buňkám žaludku) – prim. perniciózní anémie
- RET (proti retikulinu)

aj.

# IMUNOFLUORESCENCE

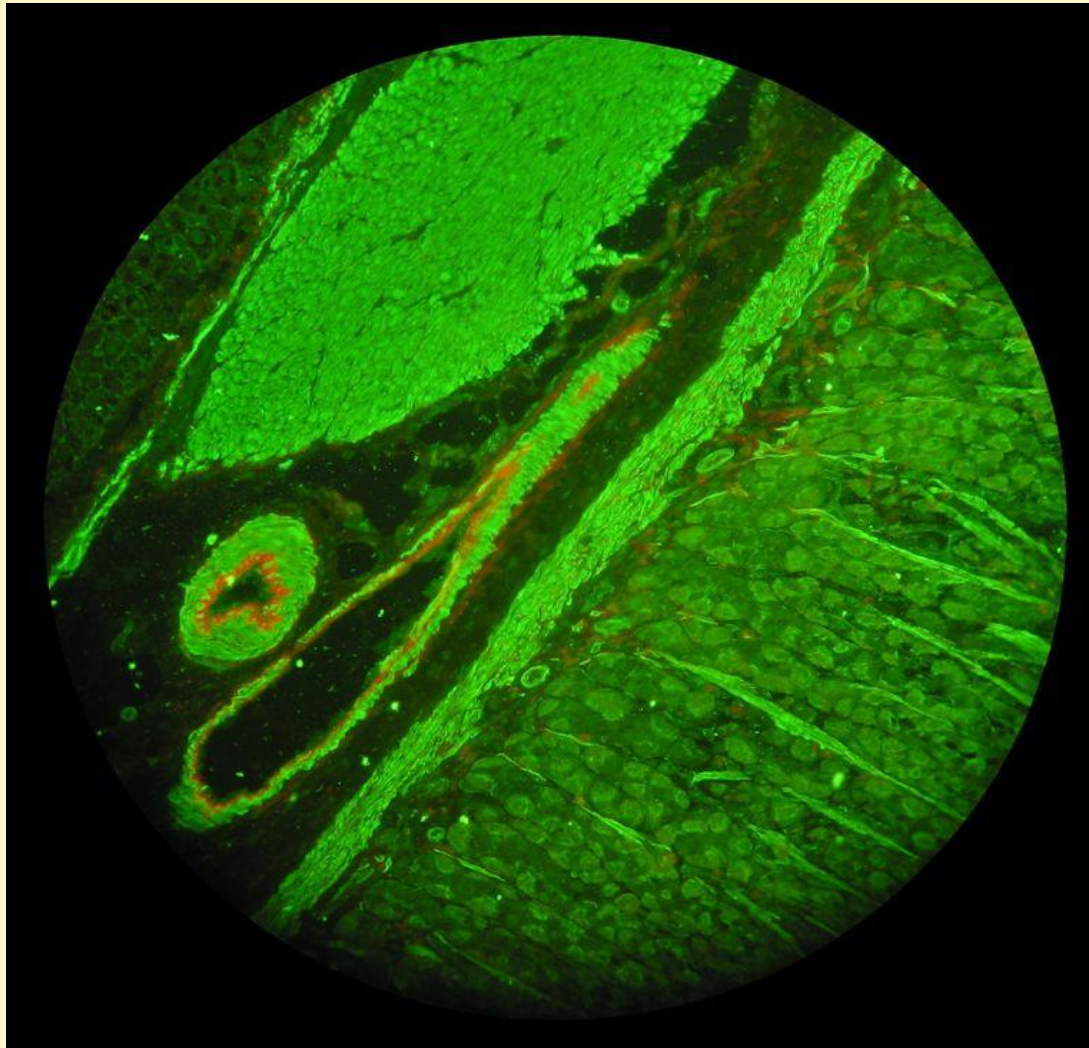
AMA – potkaní žaludek, ledviny, játra





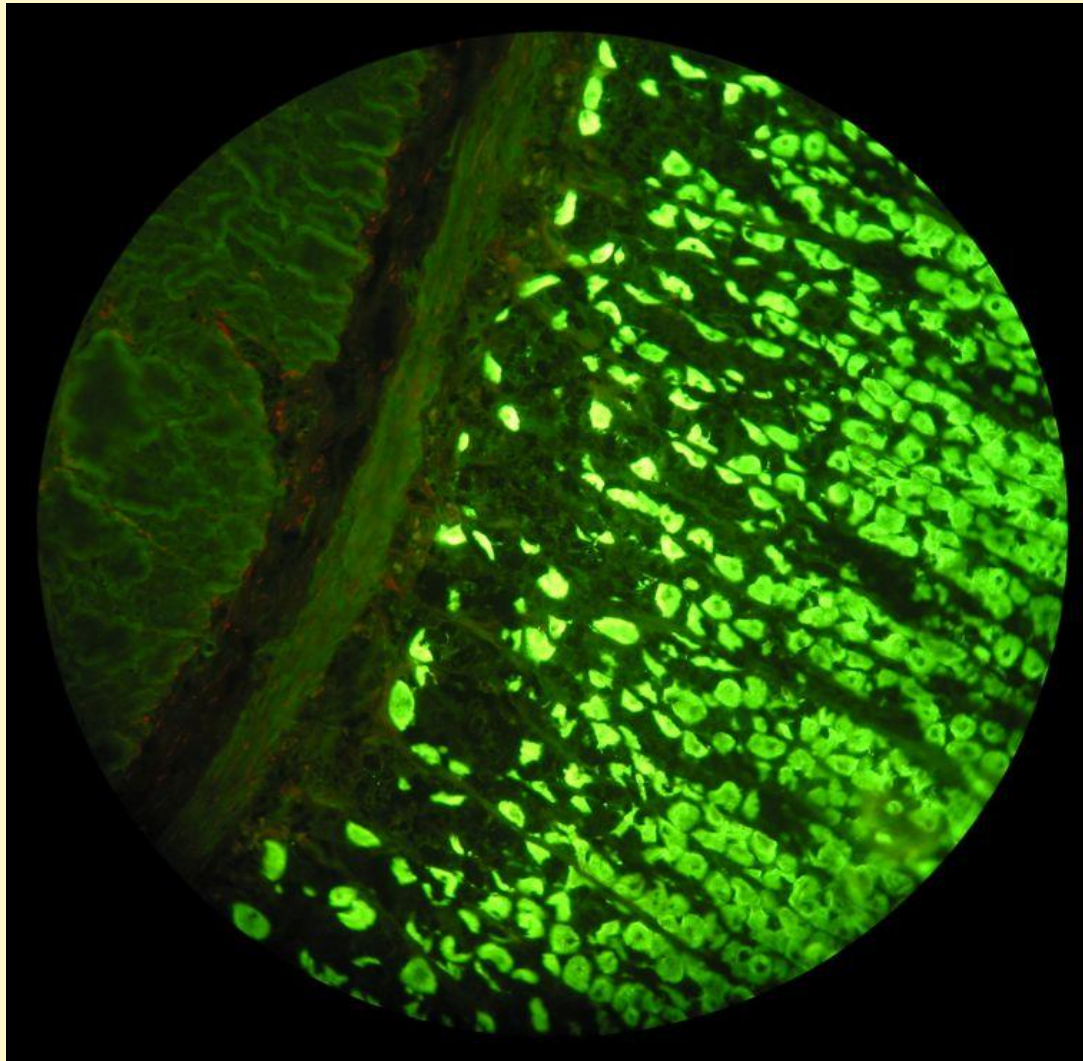
# IMUNOFLUORESCENCE

ASMA – potkaní žaludek



# IMUNOFLUORESCENCE

GPC - potkaní žaludek





# IMUNOFLUORESCENCE

RET – potkaní žaludek, ledviny, játra

