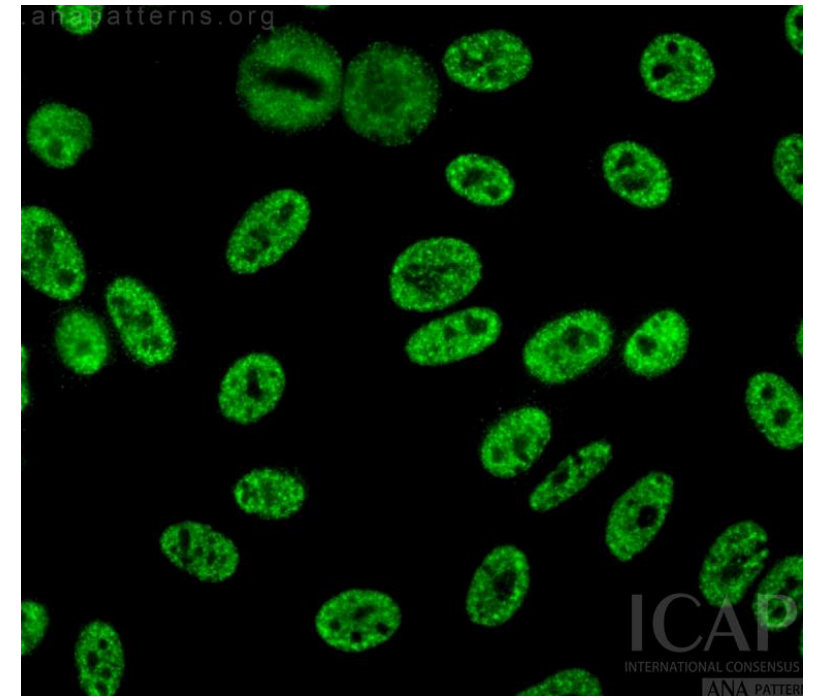




# Imunofluorescence

Peter Slanina (peter.slantina@fnusa.cz)  
Ústav klinické imunologie a alergologie  
FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

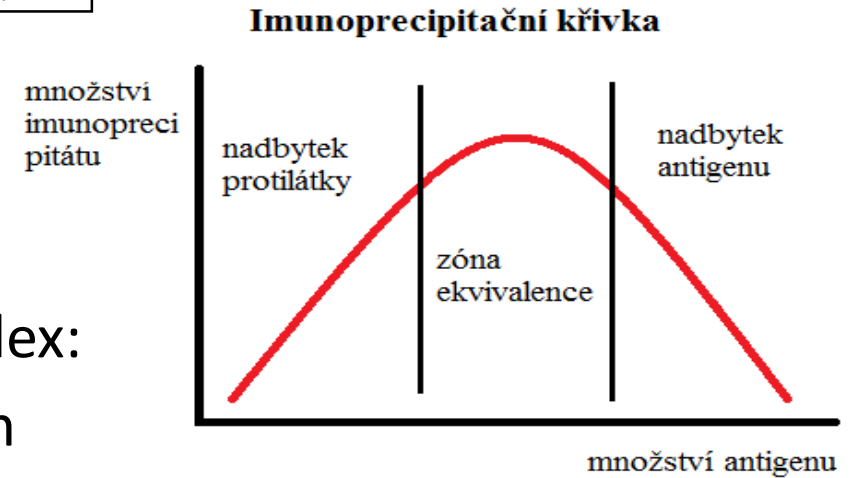


# Serologické metódy

Reakcia antigénu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

- 1. Primárna fáza** – rýchla, nepozorovateľná voľným okom
  - tvorba imunokomplexov Ag + Ab
  - vznik väzby jednotlivých epitopov s väzbovými miestami protilátok
- 2. Sekundárna fáza** – pomalá, pozorovateľná voľným okom
  - uplatňuje sa multivalencia Ag a polyvalencia Ab
  - vznik priestorového komplexu

Pokiaľ nedochádza k sekundárnej fáze reakcie, je nutné imunokomplexy vzniknuté v primárnej fáze vizualizovať – imunochemické metódy



# Serologické metódy

## 1. Klasické serologické metódy

- Aglutinácia (priama / nepriama)
- Precipitácia (v kvapaline, v géle)

## 2. **Imunochemické metódy s následnou detekciou**

- **Imunofluorescencie (priama / nepriama)**
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

## 3. Metódy založené na efektorovom účinku protilátok (využívané v klinickej mikrobiológii)

- Komplement fixačné reakcie
- Inhibičné a neutralizačné testy

# Imunofluorescencie

- Luminiscencia

Jav, pri ktorom látka emituje žiarenie po absorpcii excitačného žiarenia (Fotoluminiscencia) alebo pri chemickej reakcii (Chemiluminiscencia),...



Zdroj:  
[www.chemiaasvetlo.sk/teoria/chemiluminiscencia/](http://www.chemiaasvetlo.sk/teoria/chemiluminiscencia/)



Zdroj: [www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html](http://www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html)

## Fotoluminiscencia

### Fluorescencia

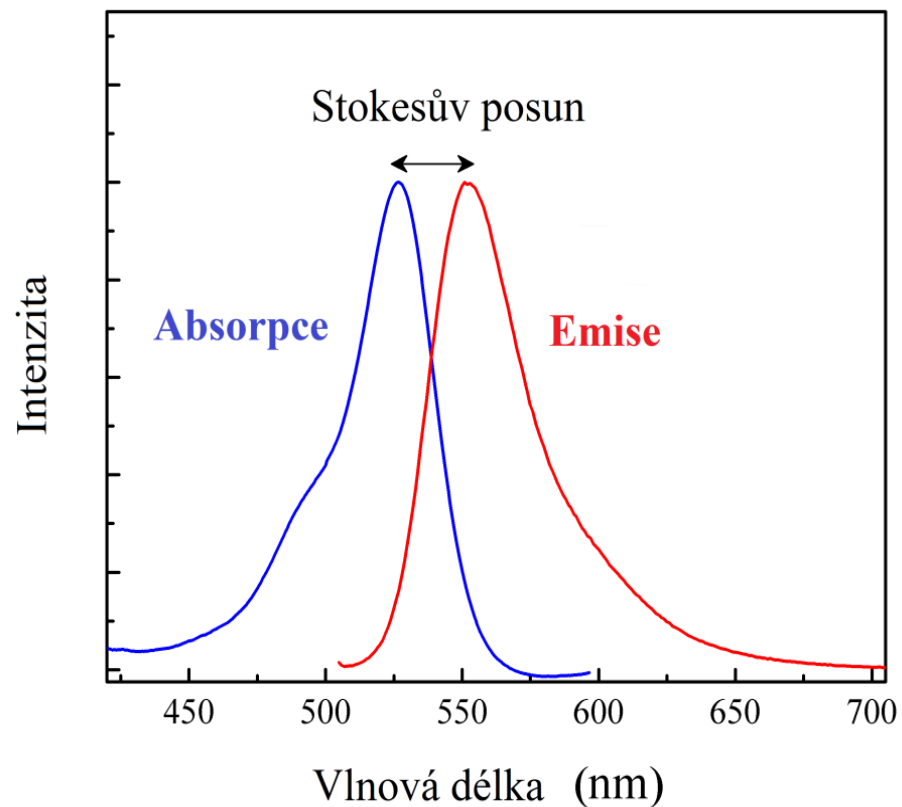
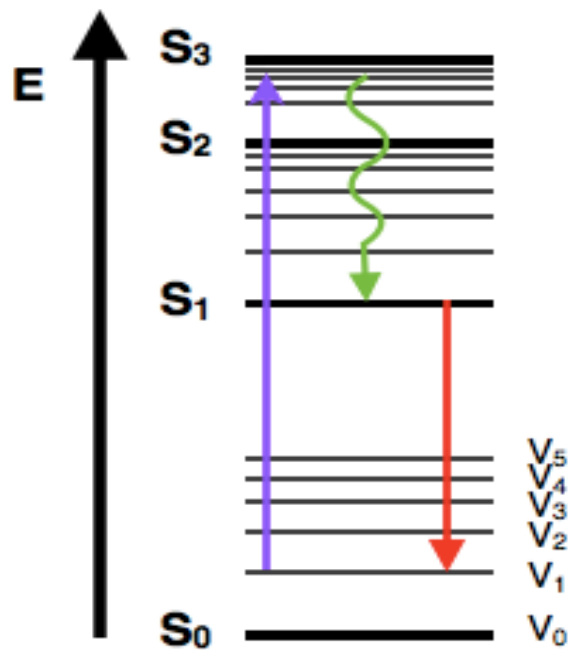
emisija žiarenia krátko po excitácii ( $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  s)

### Fosforescencia

emisija žiarenia trvá dlhšiu dobu ( $10^{-2}$  s až dni)

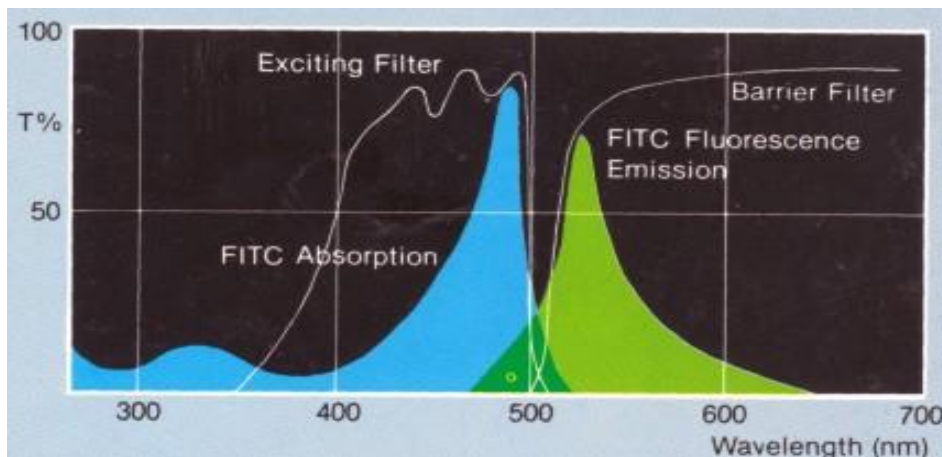
# Fluorescencia

látka po absorpcii excitačného žiarenia uvoľňuje emisné žiarenie o dlhšej vlnovej dĺžke (nižšej energii)



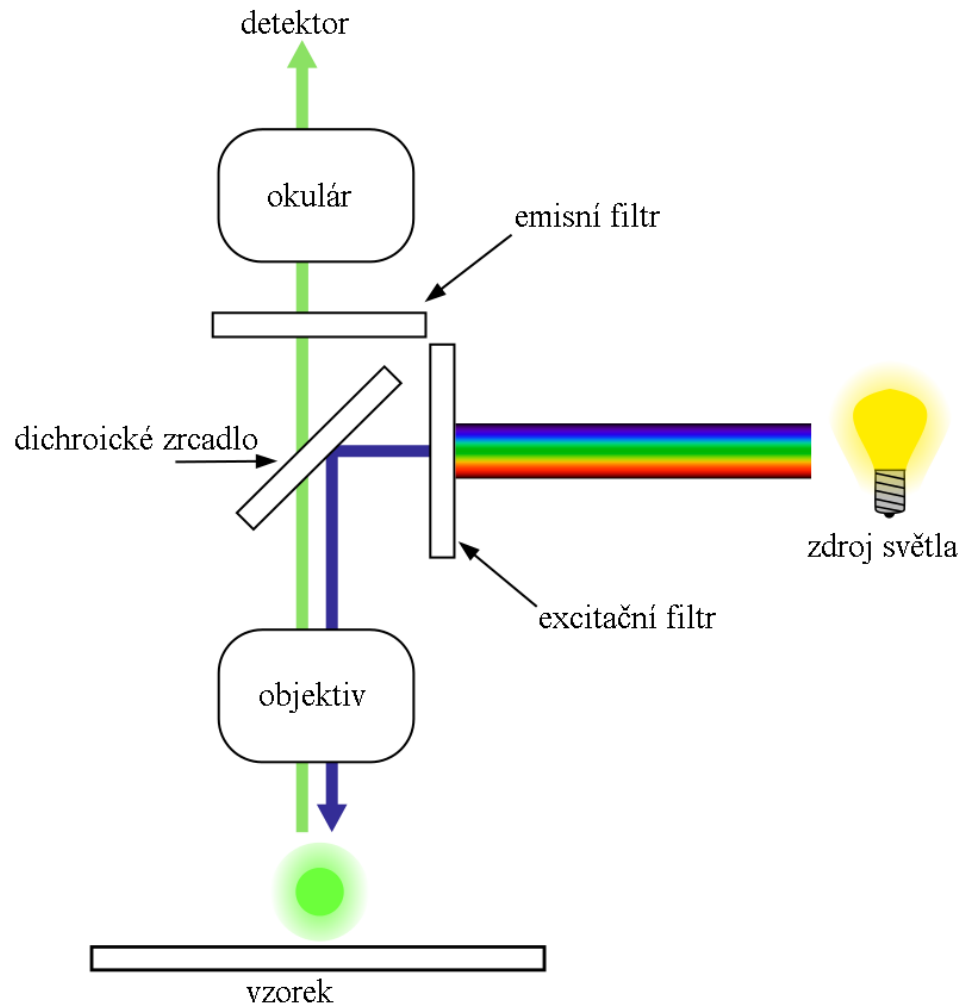
# Fluorescenčný mikroskop

- Zdroj svetla – ortuťová výbojka, **LED dioda**
- Excitačný filter – prepúšťa iba časť spektra potrebnú pre excitáciu fluorescencie a zabraňuje priechodu žiarenia v oblasti emisnej vlnovej dĺžky, ktorá by vytvárala pozadie
- Emisný (bariérový) filter – prepúšťa iba emisnú časť spektra a zabraňuje priechodu excitačného žiarenia

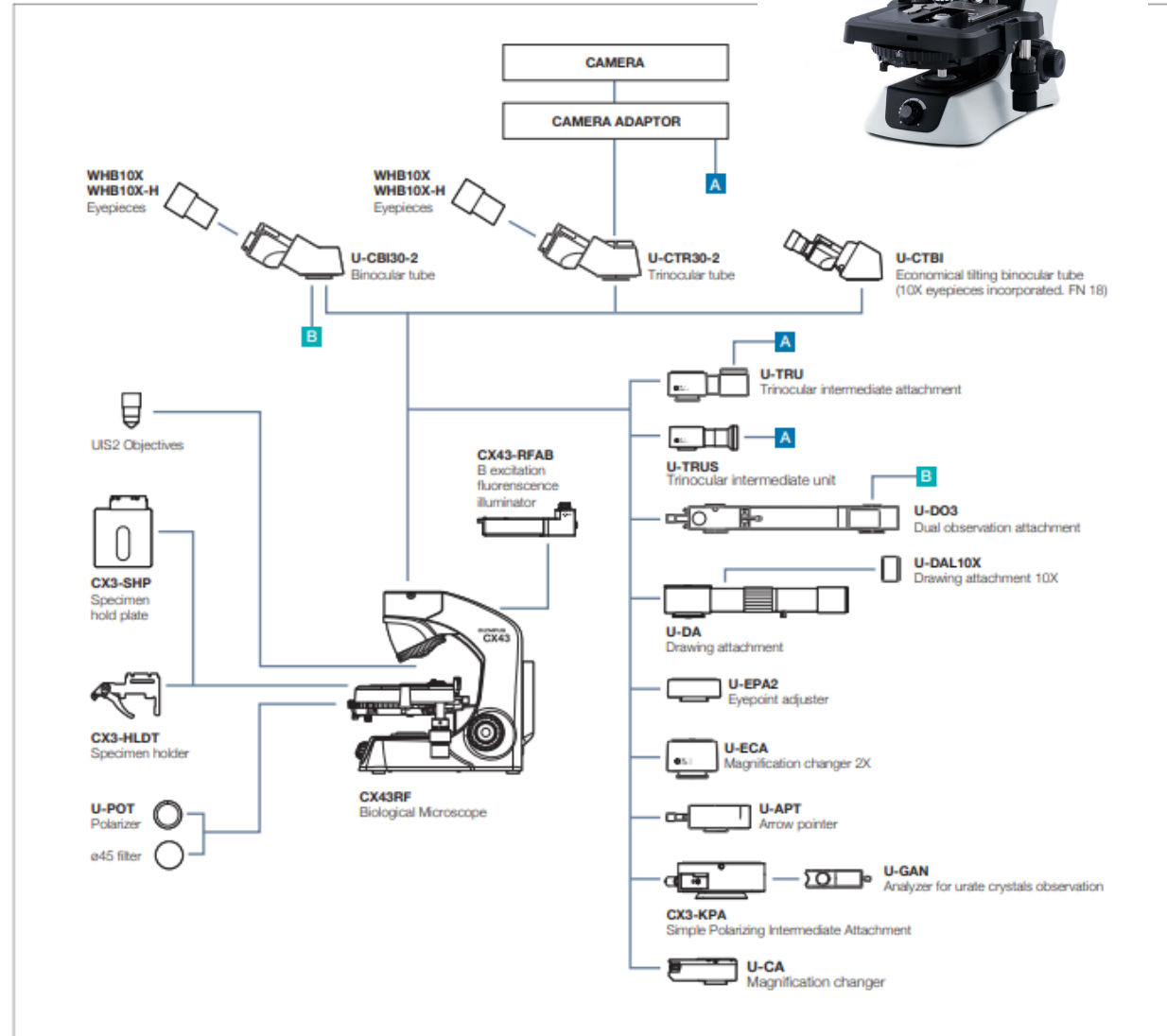


- **Binokulár/trinokulár**
- Jednoduché polarizované svetlo, Brightfield, Darkfield, **Fluorescencia**

# Schéma fluorescenčního mikroskopu

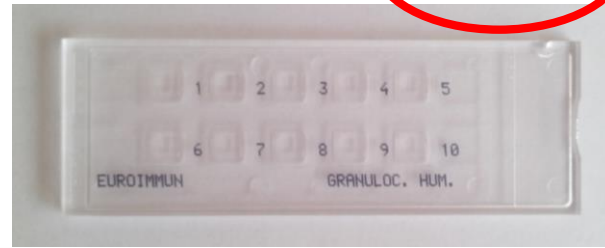
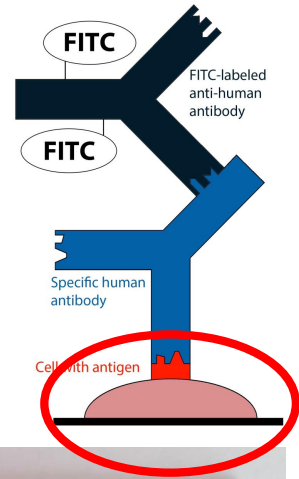
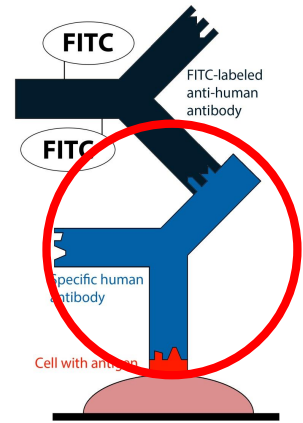


CX43 System



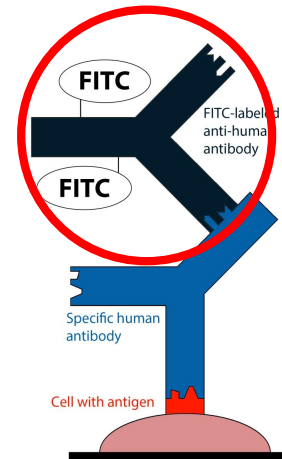
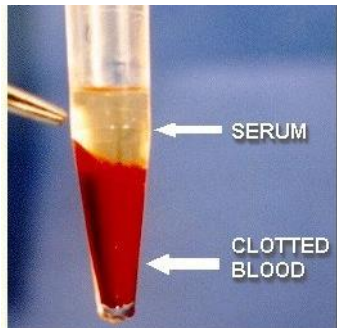


# Základný princíp



Inkubácia →  
Premytie →  
Krycie sklíčko

Inkubácia → Premytie





# Imunofluorescencia

## ➤ Priama IF

Slúži k detekcii antigénov – väzba konjugátu priamo na antigén

**Využitie:** histológia – preukázanie antigénu v tkanive  
mikrobiológia – rýchla detekcia patogénov v biologickom materiálu

## ➤ Nepriama IF

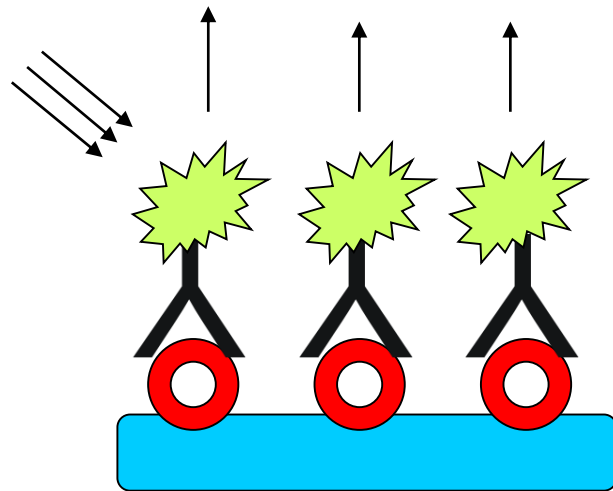
Používa sa k detekcii protilátok, väzba protilátok a konjugátu v 2 krokoch:

1. Na sklíčko sa nanesie vyšetřovaný materiál (sérum), pokiaľ sú v ňom prítomné hľadané protilátky, naviažu sa na antigénny substrát na sklíčku
2. Nanesie sa konjugát, ktorý sa viaže na protilátku príslušnej izotypovej triedy (IgG/IgA)

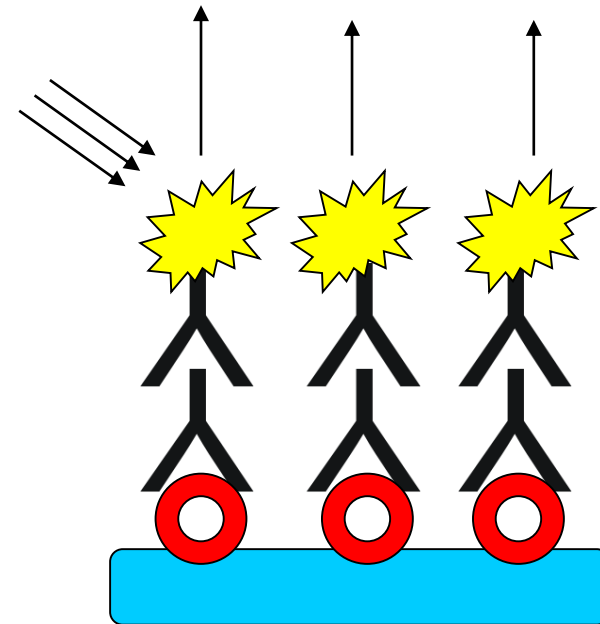
**Využite:** dôkaz špecifických protilátok, najčastejšie autoprottilátok

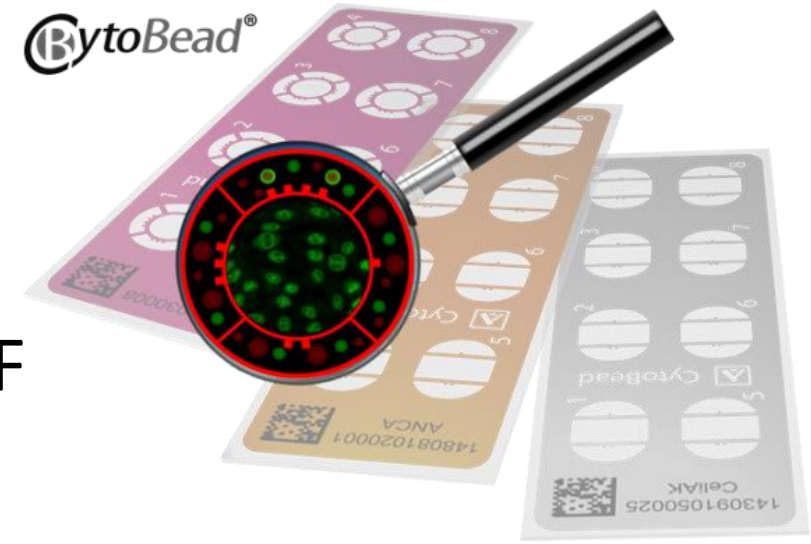
# Imunofluorescencia

PRIAMA



NEPRIAMA



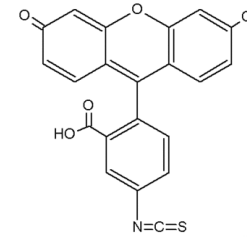


# Imunofluorescencie

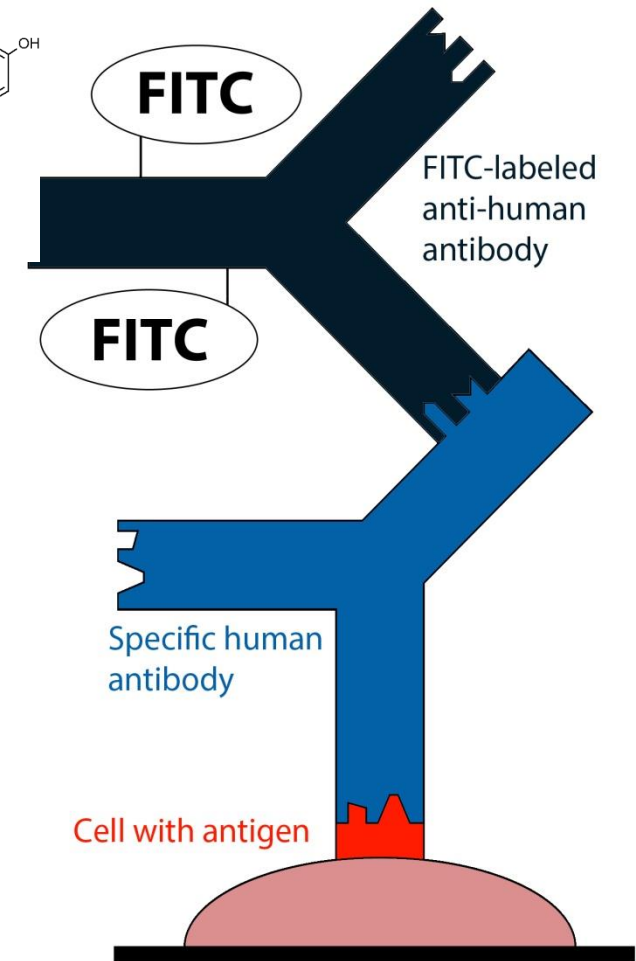
## Antigénne substráty používané pri nepriamej IF

- **Bunky HEP2** (Human Epithelial) – detekcii **ANA**
  - odvodené od línie HeLa (karcinom dŕoŕního ōípku)
  - rýchlo sa deliace bunky, v mitóze pozorovateľná chromatinová destička – dôležitý znak pre odlíšenie jednotlivých typov ANA
- **Neutrofilné granulocyty** – detekcia **ANCA**
- **Crithidia luciliae** – prvok, detekcia protilátok proti **dsDNA**
- **Opiŕí jícen** – detekcia **EMA**
- **LKS** (liver, kidney, stomach) – detekcia **AMA, ASMA, GPC, RET, ...**
  - kombinácia 3 krysích tkanív

# Konjugát



- Protilátka s naviazaným fluorescenčným farbivom (fluorochromom)
- Najčastejšie používaný fluorochrom je **FITC** (fluoresceinizothiokyanát)  
excitačná/emisná vlnová dĺžka 495/520 nm (zelené svetlo)
- Konjugát sa špecificky viaže len na imunoglobulíny určitej izotypovej triedy (**IgG/IgA**) – výberom konjugátu stanovíme protilátky len tejto triedy
- Pre niektoré autoimunitné ochorenia má klinický význam výskyt autoprotílátok v určitej izotypovej triede (napr. celiakia – IgA)



# ANA (Anti Nuclear Antibodies)

- Veľká skupina protilátok
- Viažu sa na rôzne antigény v jadre (DNA, RNA, centroméry, ...)
- Výskyt pri rôznych autoimunitných ochoreniach (systémový lupus erytematodes, Sjögrenov syndróm, reumatoídna artritída, ...)

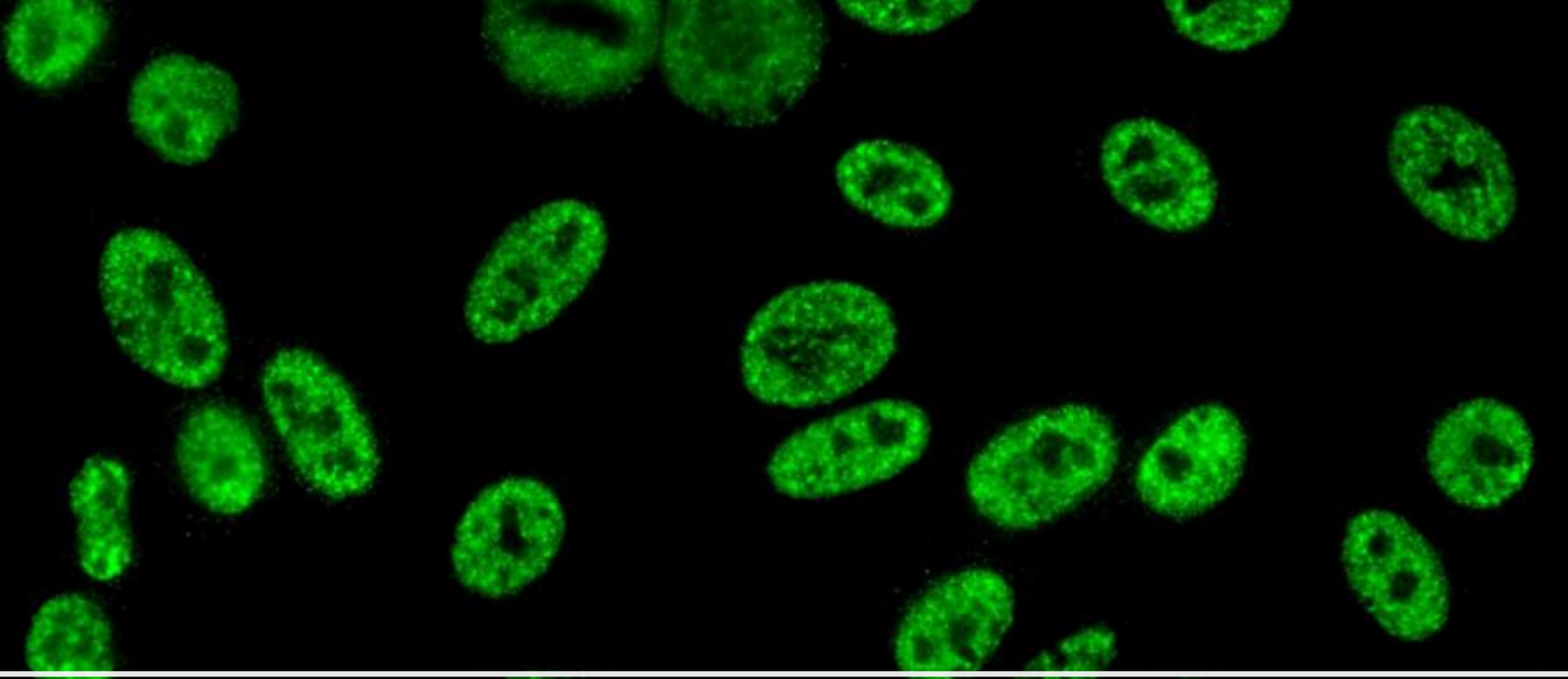


**Fluorescenčný obraz** v mikroskope môže vyzeráť rovnako alebo podobne u rôznych protilátok – keď vidíme určitý obraz, nevieme ešte o akú autoprotiľátku ide (na aký antigén sa viaže), k jej bližšiemu určeni u môžu pomôcť iné metódy (ELISA, imunoblot)

A fluorescence microscopy image showing numerous cells with bright green fluorescence against a black background. The cells are of various shapes, including circular and elongated forms. A white horizontal bar is overlaid at the bottom of the image, containing text.

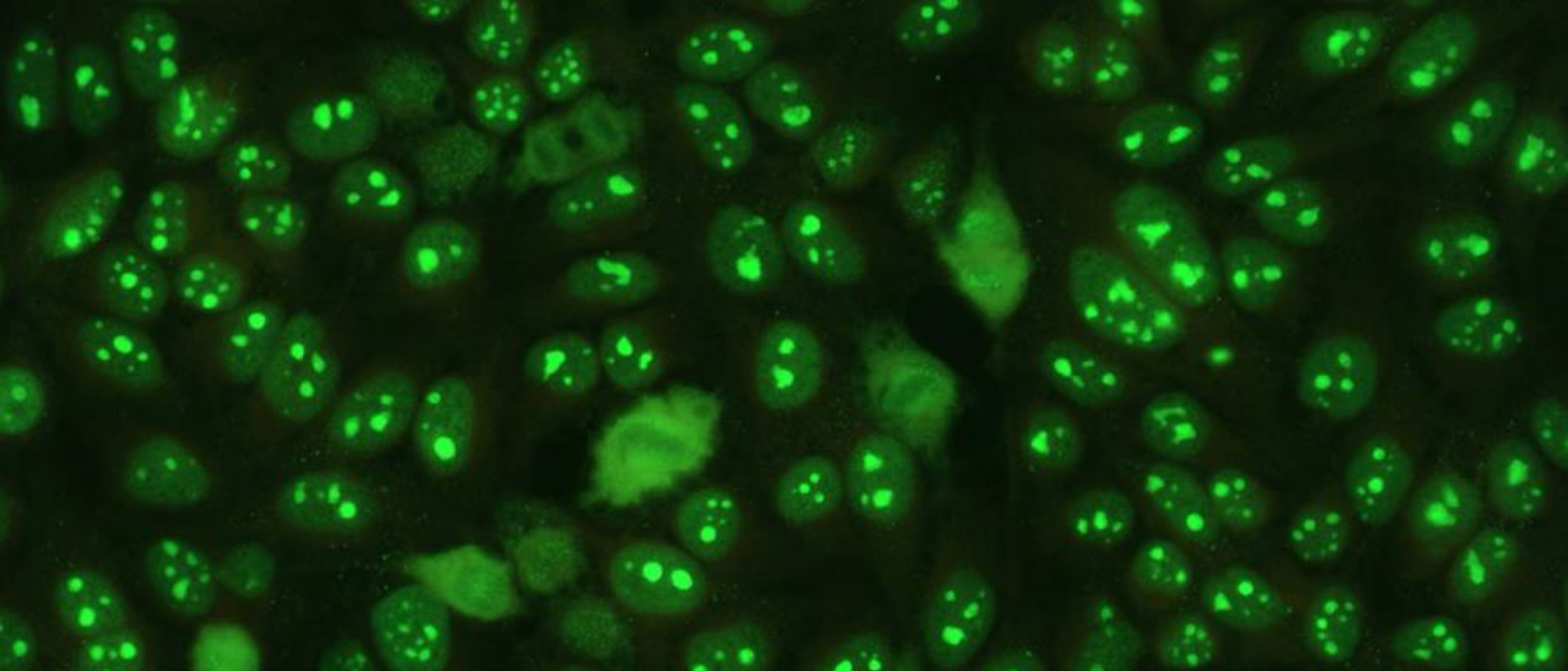
ANA – typ homogénny (dsDNA, má Ch.d.)





ANA – typ granulárny, zrnitý (nemá Ch.d.,ENA)





ANA – typ nukleolárny (jadierkový)



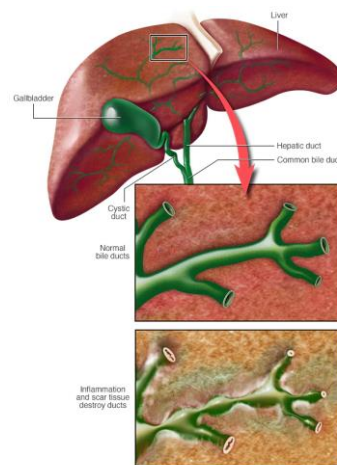


ANA – typ centromerový (CREST syndrom)



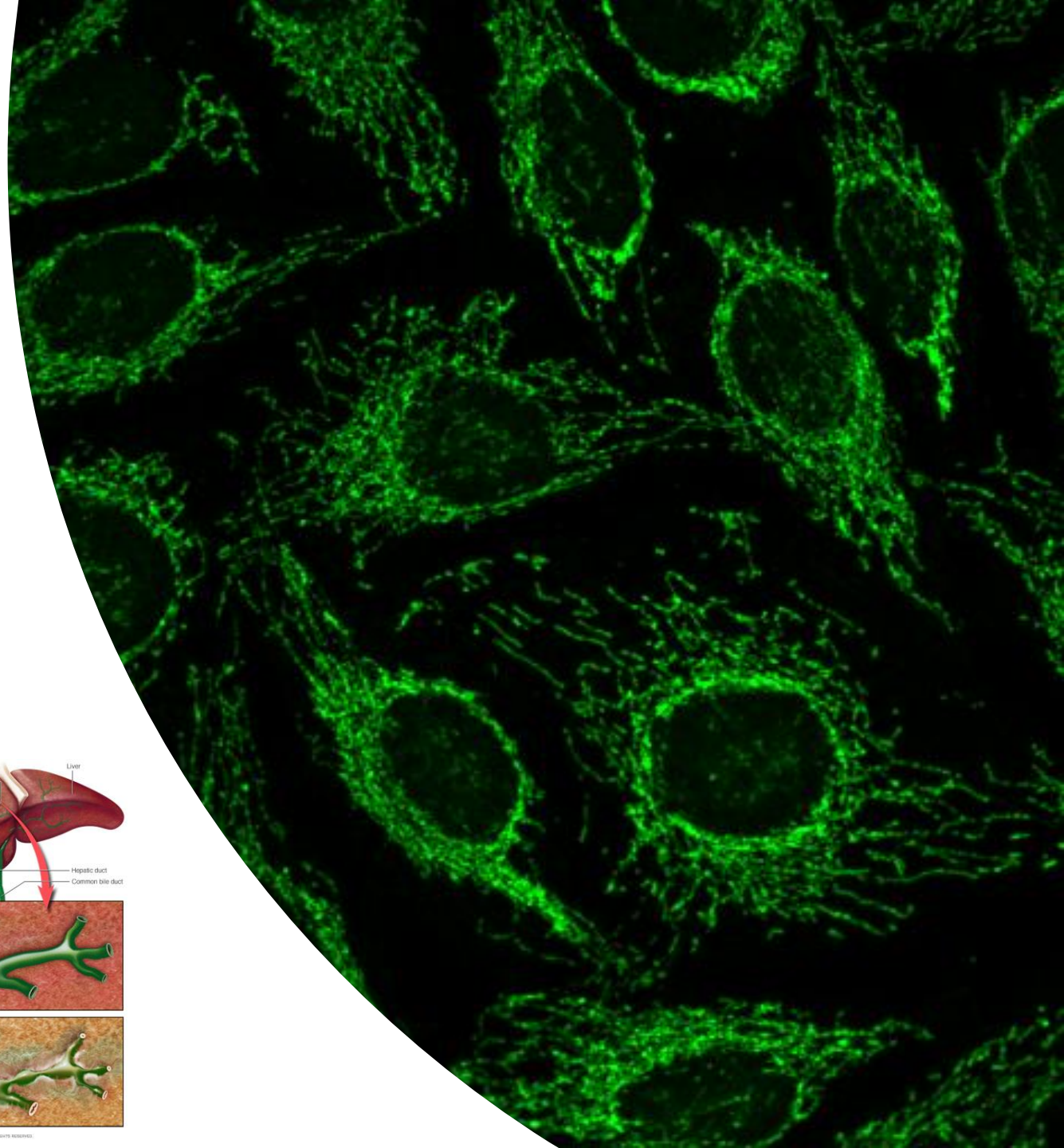
---

V cytoplazme HEp2 buniek je možné pozorovať ďalšie typy fluorescencie – napr. mitochondriálny – AMA (anti-mitochondrial antibodies) – výskyt u ochorení primárna biliárna cirhóza



Zdroj: [www.mayoclinic.org/diseases-conditions/primary-biliary-cholangitis-pbc](http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/primary-biliary-cholangitis-pbc)

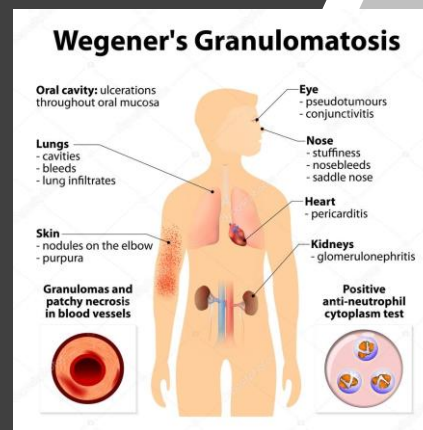
© 2010 FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.




# ANCA (protilátky proti cytoplazme neutrofilov)

pANCA – perinukleárny – antigénom je MPO (myeloperoxidáza)

Atypická ANCA – rôzne antigény (elastáza, lysozym, katepsin)



cANCA – cytoplazmatická – antigénom je PR3 (proteináza 3) – typická pre (Wegenerova) granulomatózu s polyangiitídov  
pozitívna = vážna diagnóza = okamžite hlásiť

A fluorescence microscopy image showing several Crithidia luciliae cells. The cells are stained with a green fluorescent dye that highlights the dsDNA in the kinetoplast. The cells are scattered across the field of view, with some showing a clear, bright green spot in the kinetoplast region. The background is dark, making the green-stained cells stand out.

<dsDNA in the kinetoplast  
positively stained

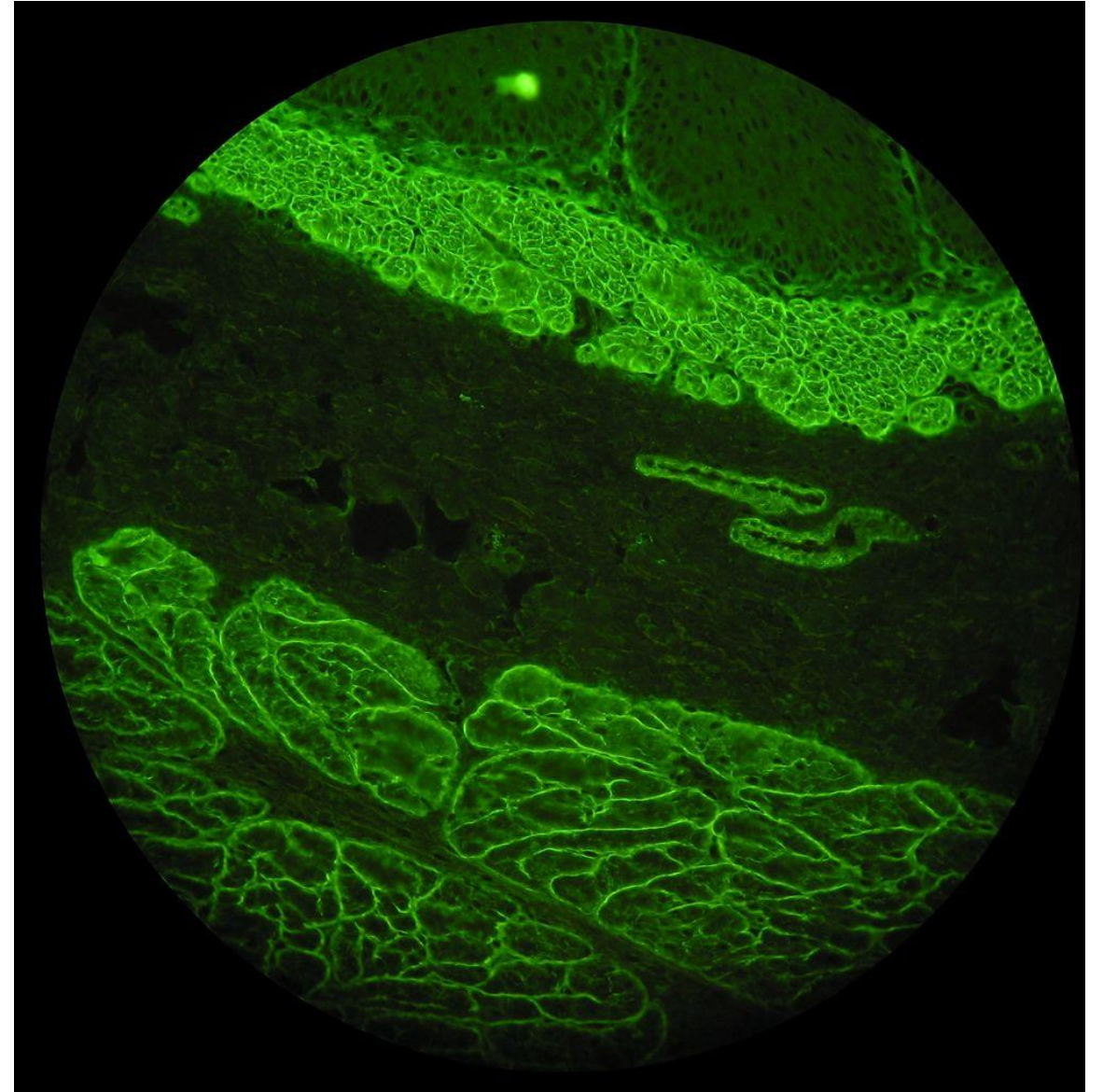
<Crithida luciliae

Prvok Crithidia luciliae – dsDNA neg/poz (↑špecifická,↓senzitivna)



# EMA (protilátky proti endomysiu)

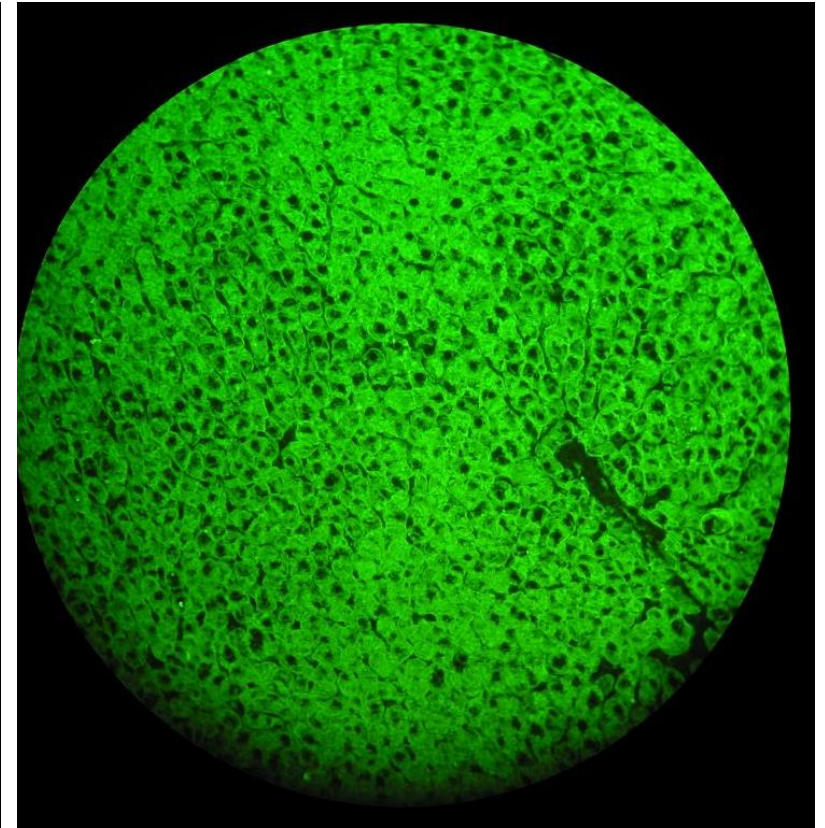
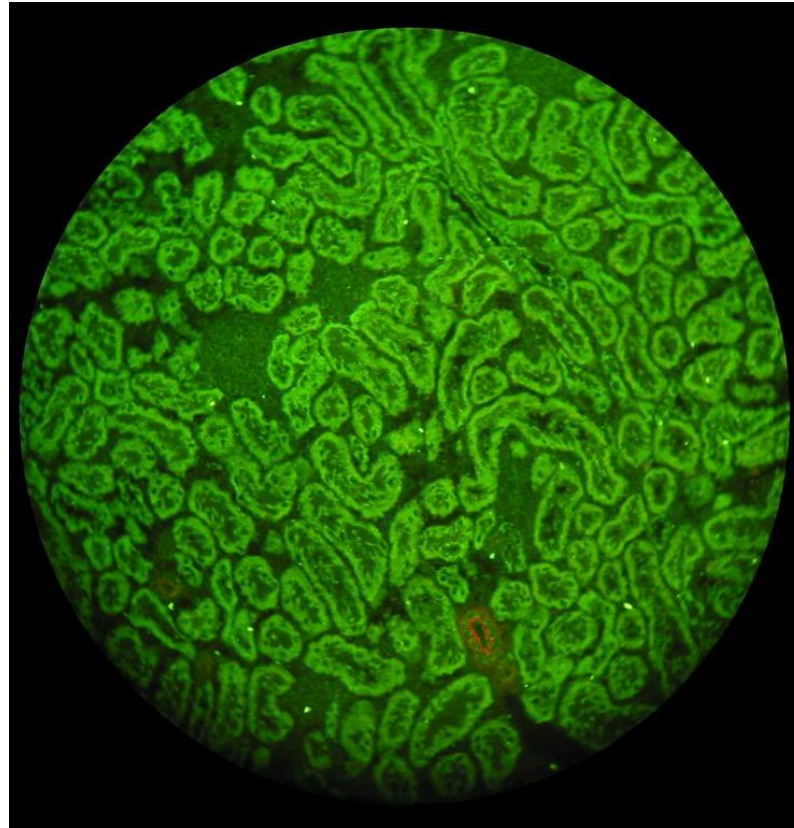
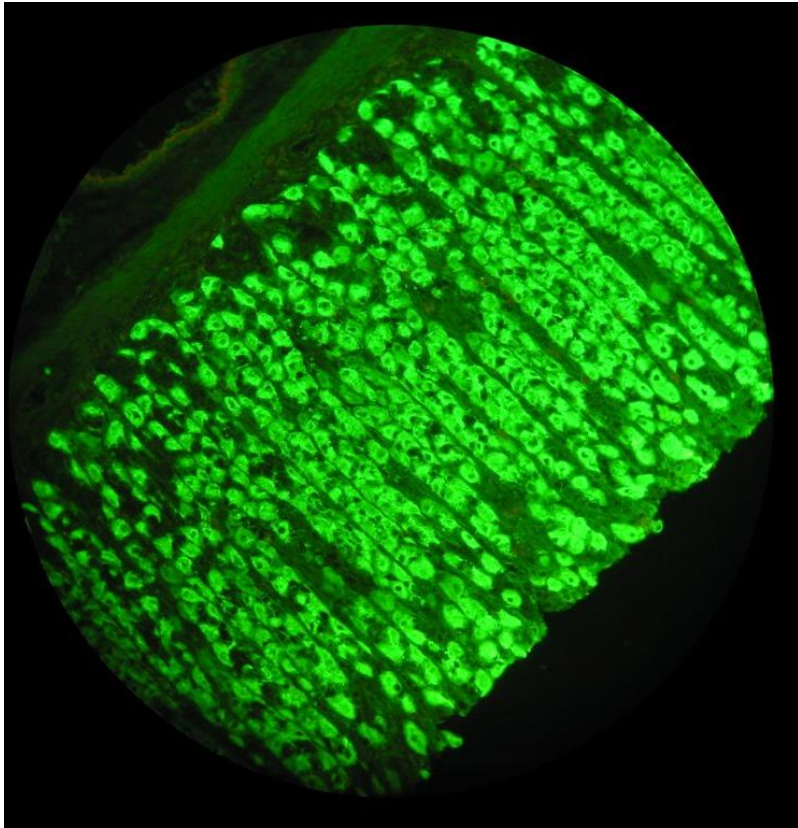
- Na reze opičieho jícnu
- Ag je TTG (tkanivová transglutamináza) – tiež ELISA
- Výskyt u *celiakie* (hlavne IgA)



# Substrát LKS

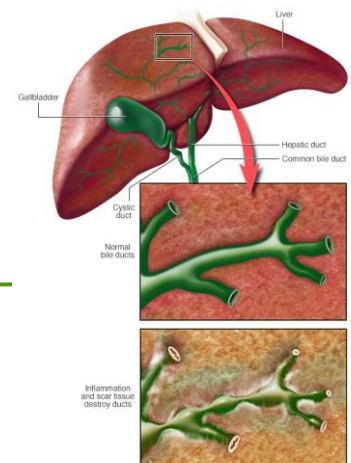
- Kombinácia 3 krysích tkanív
  - játra (Liver)
  - ledviny (Kidney)
  - žalúdok (Stomach)
- Pozorujeme protilátky:
  - AMA (antimitochondriálne) – primárna biliárna cirhóza
  - ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitné hepatitídy
  - GPC (proti parietálnym bunkám žaludku) – prim. perniciózne anémie
  - RET (proti retikulínu)



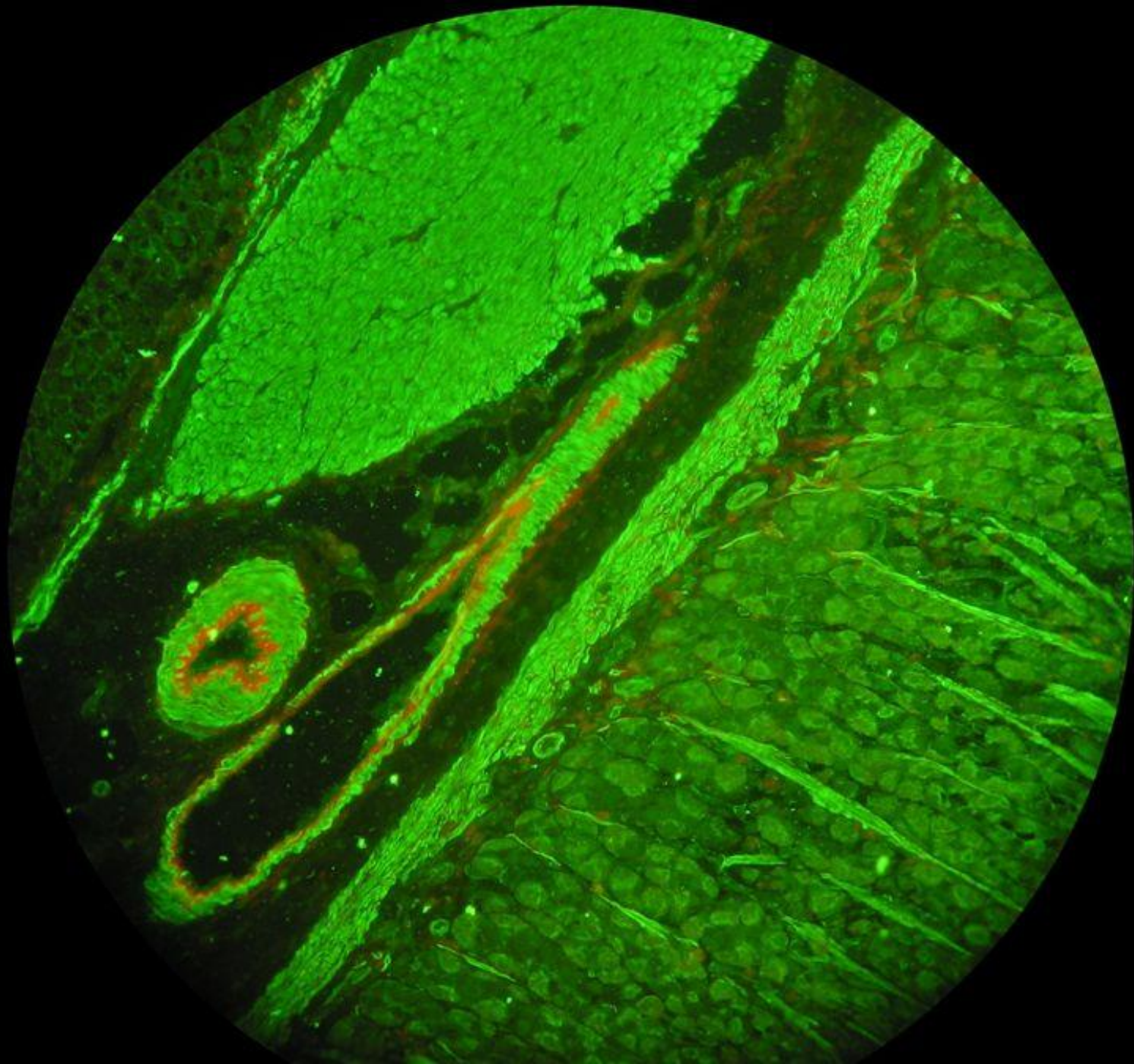


AMA (antimitochondriálne) – kryší žalúdok, ledviny, jatra

---







ASMA

(proti hladkému svalu)

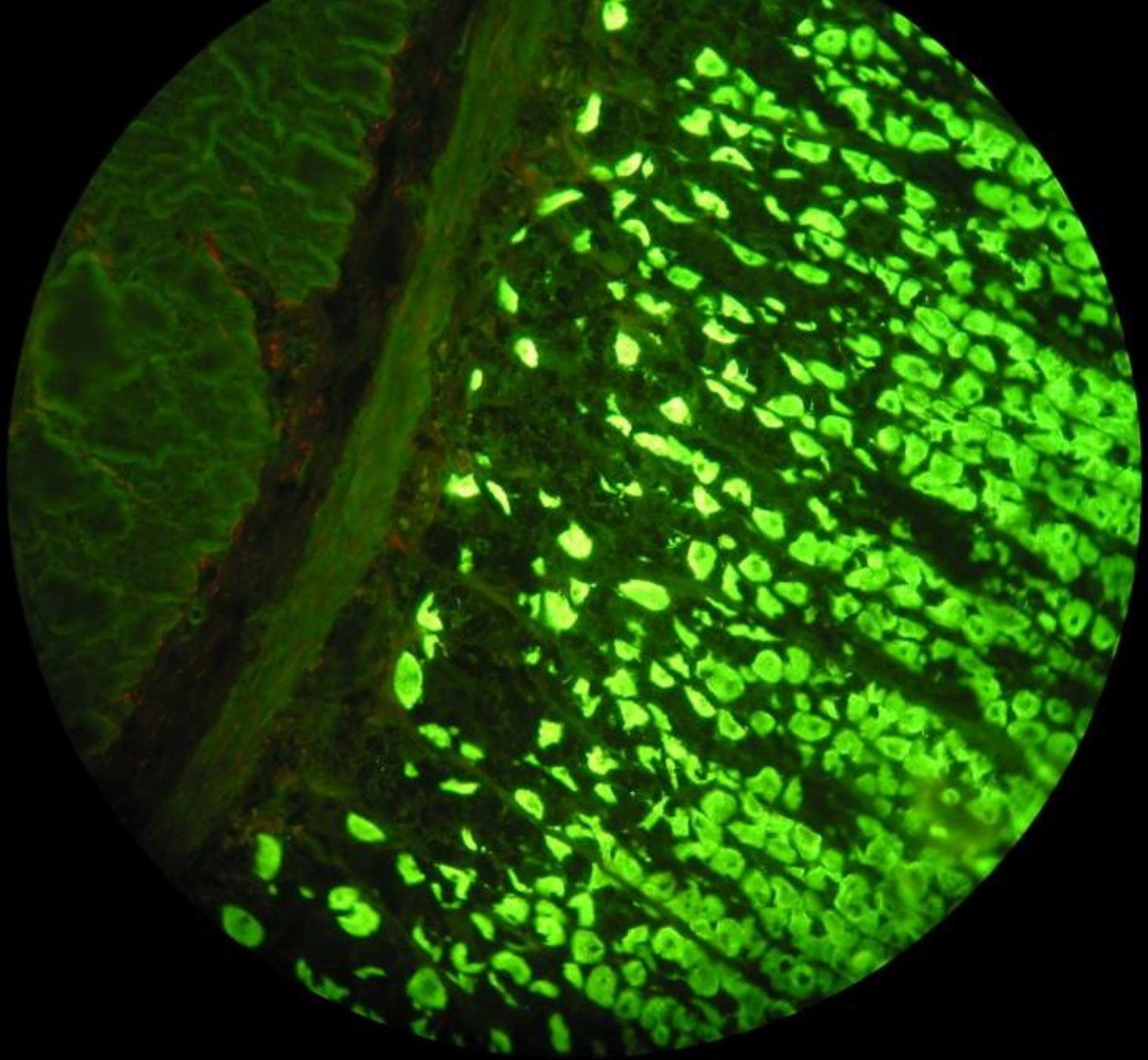
– krysí žalúdok



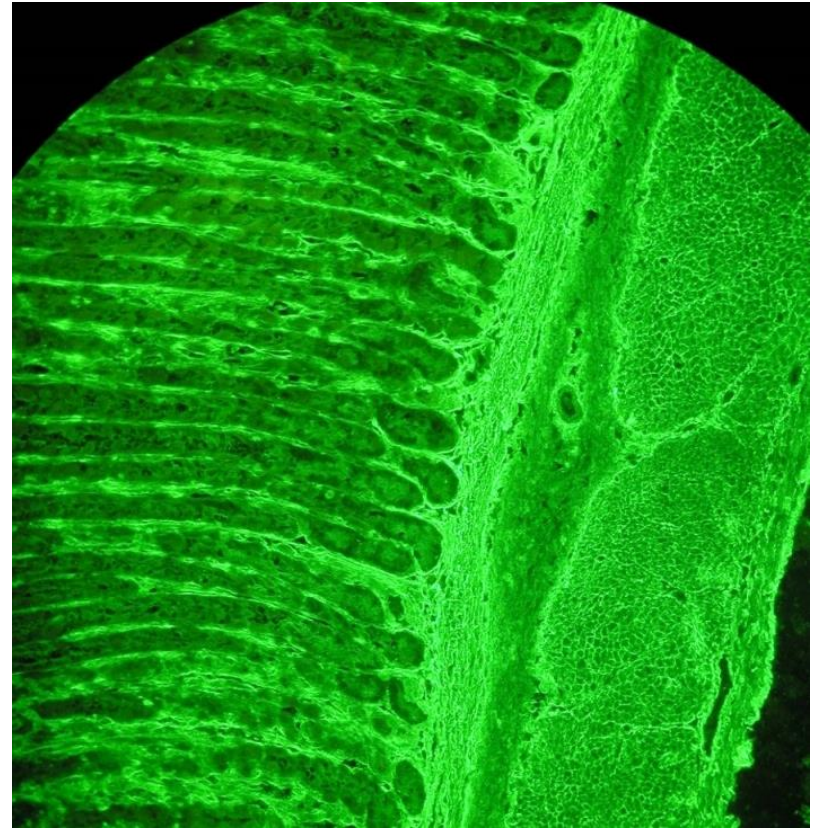
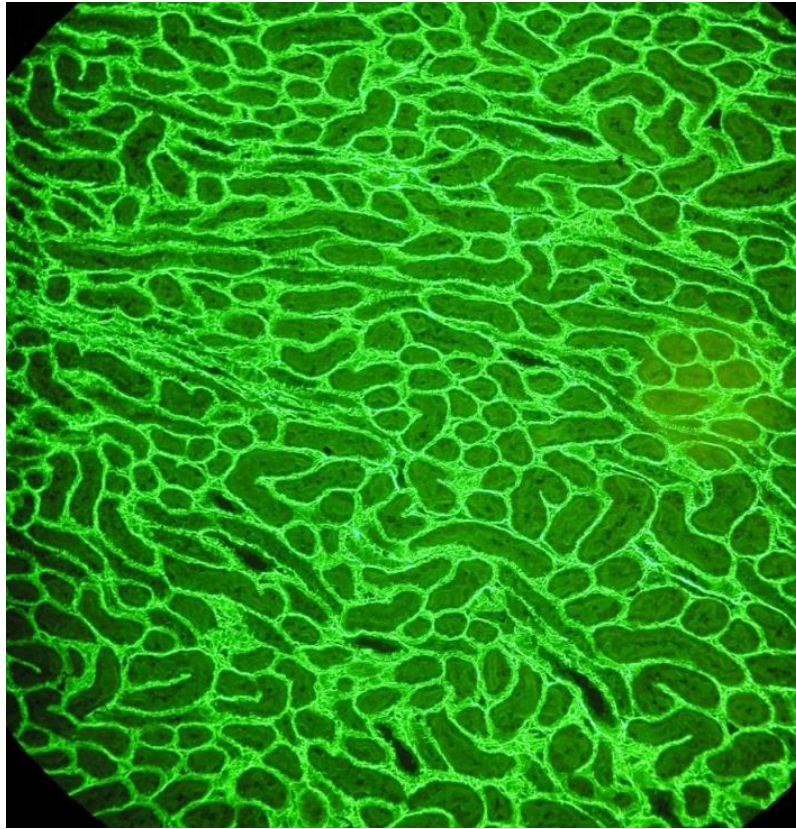
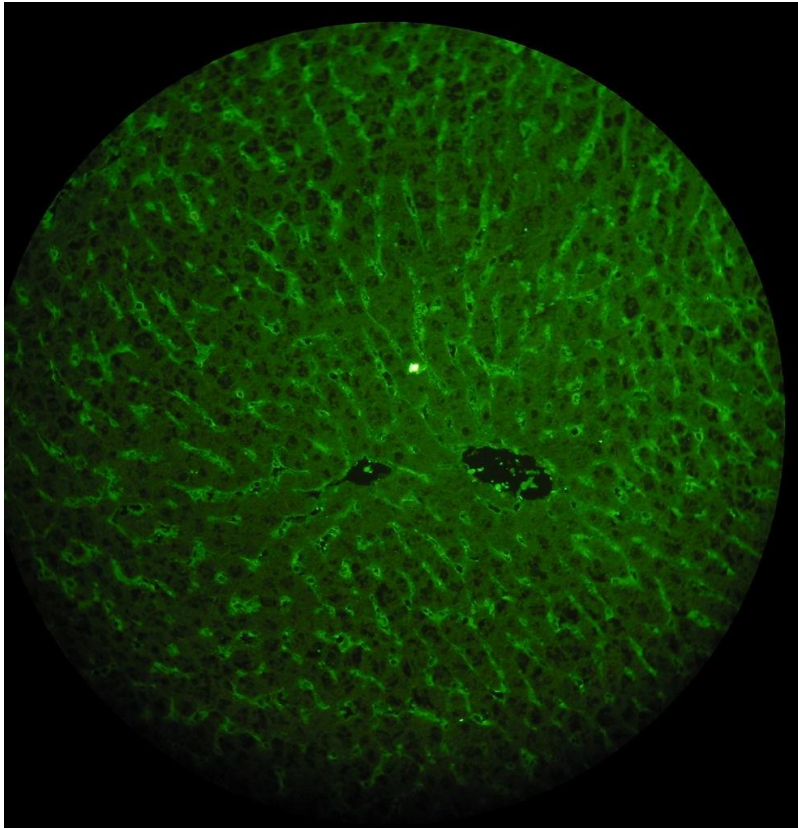
GPC

(proti parietálnym bunkám žaludku)

– krysí žalúdok







RET (proti retikulínu) – krysí žalúdok, ledviny, játra

---

# Imunofluorescencie

- Zlatý štandard
- Na prvom mieste – každé imun. lab. by malo poskytovať stanovenie autoprotílátok IF metódou
- Kombinácia s ELISA + Imuno-Blot
- Interpretácia výsledkov:
  - záleží na type
  - pozitívna/negatívna alebo titer Ab
  - autoimunitné protílátky sa ↑ s vekom (!! Deti !!)

# Imunofluorescencie

- Popis vzoriek + sklíčka
- Pracovný list – zoznam pacientov → zápis výsledkov
- Prepis do systému