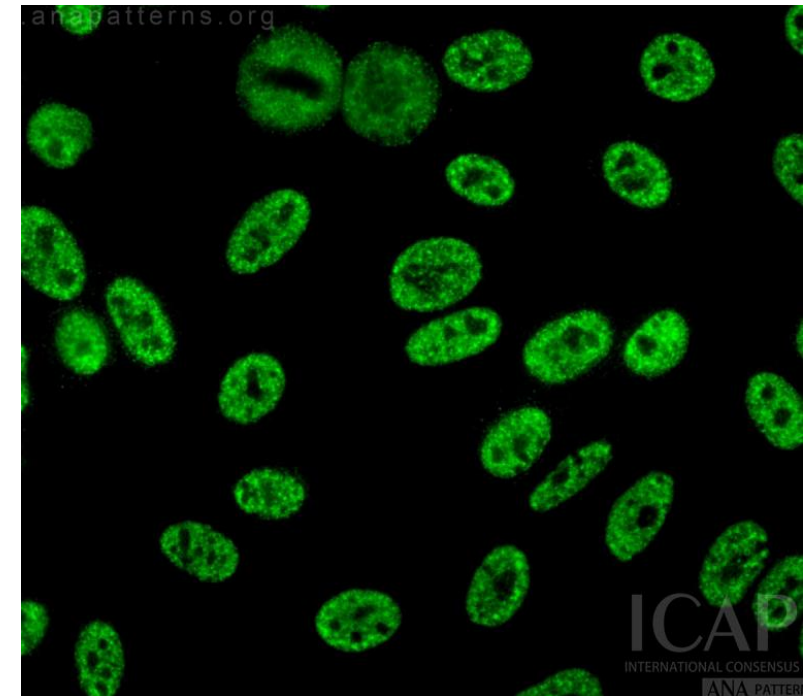




Imunofluorescence

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

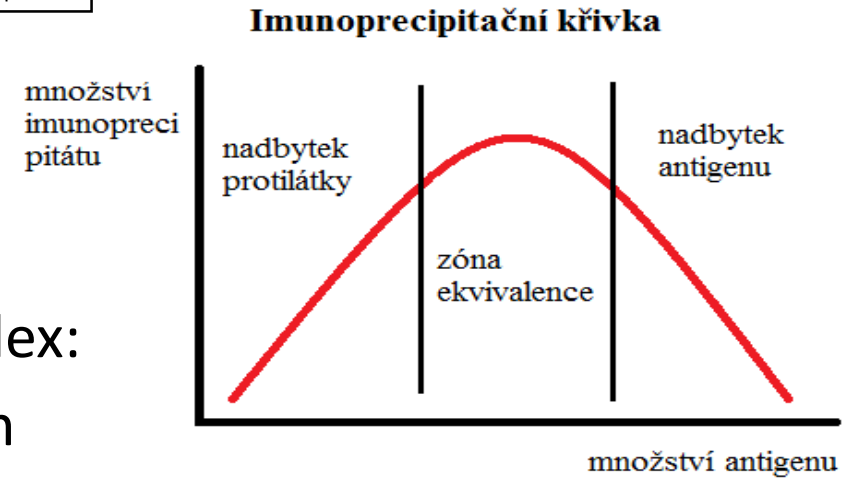


Serologické metódy

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/



Zdroj: www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html

Fotoluminiscencia

Fluorescencia

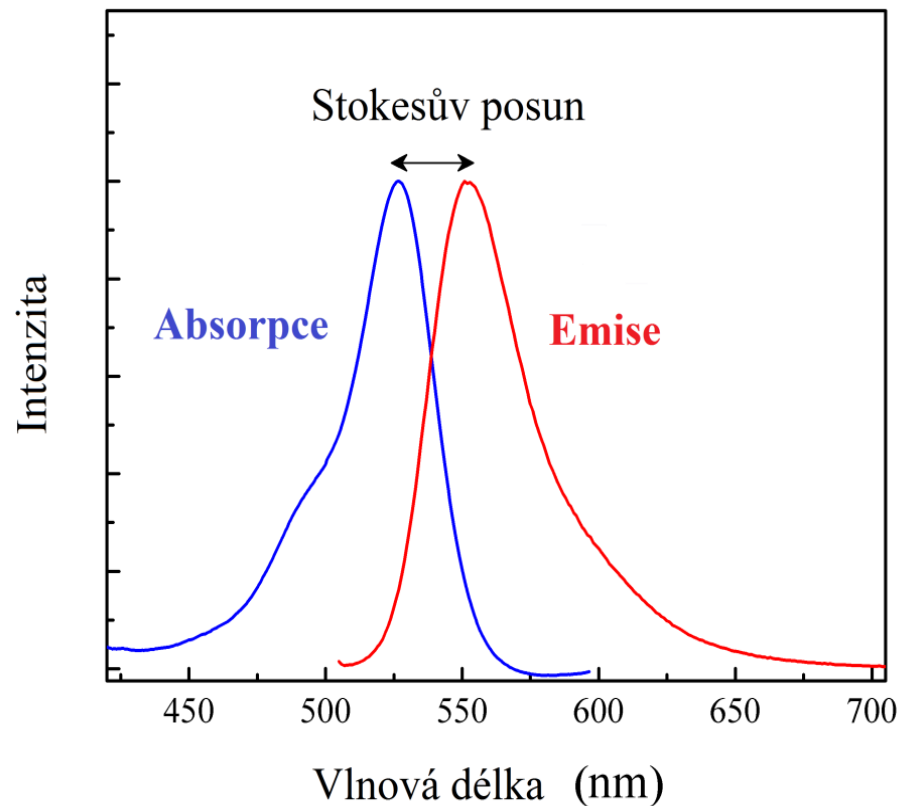
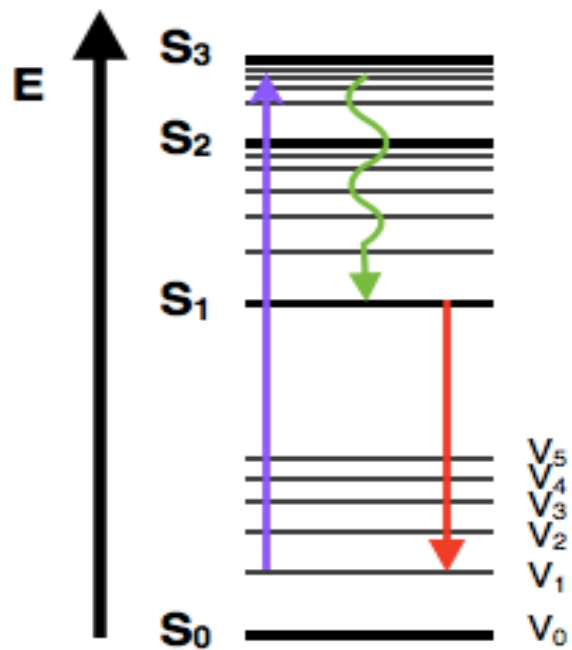
emisija žiarenia krátko po excitácii (10^{-8} až 10^{-5} s)

Fosforescencia

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

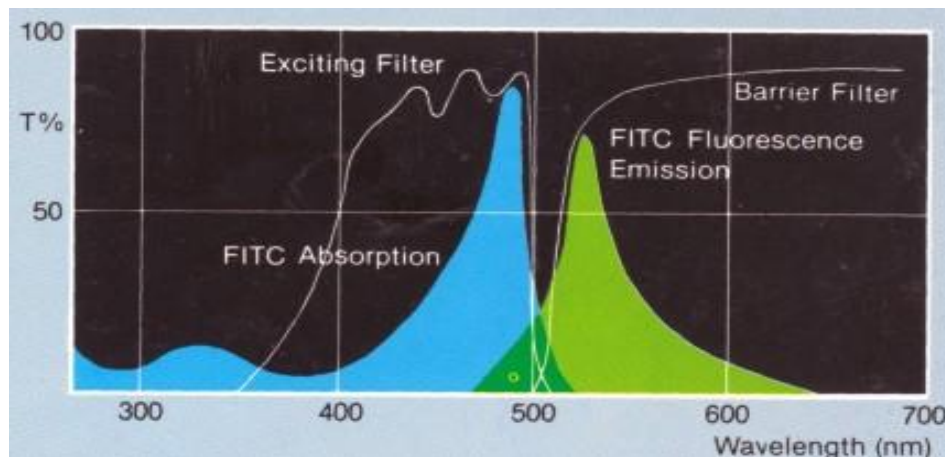
Fluorescencia

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



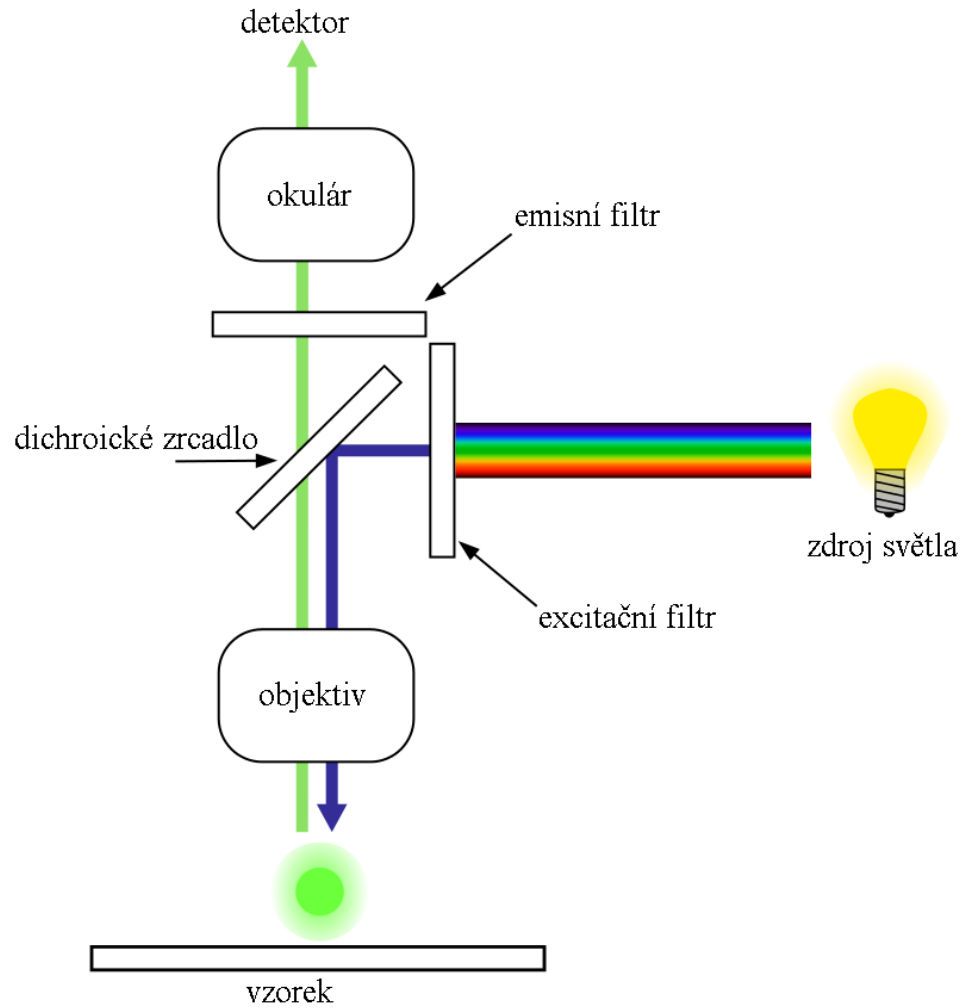
Fluorescenčný mikroskop

- 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

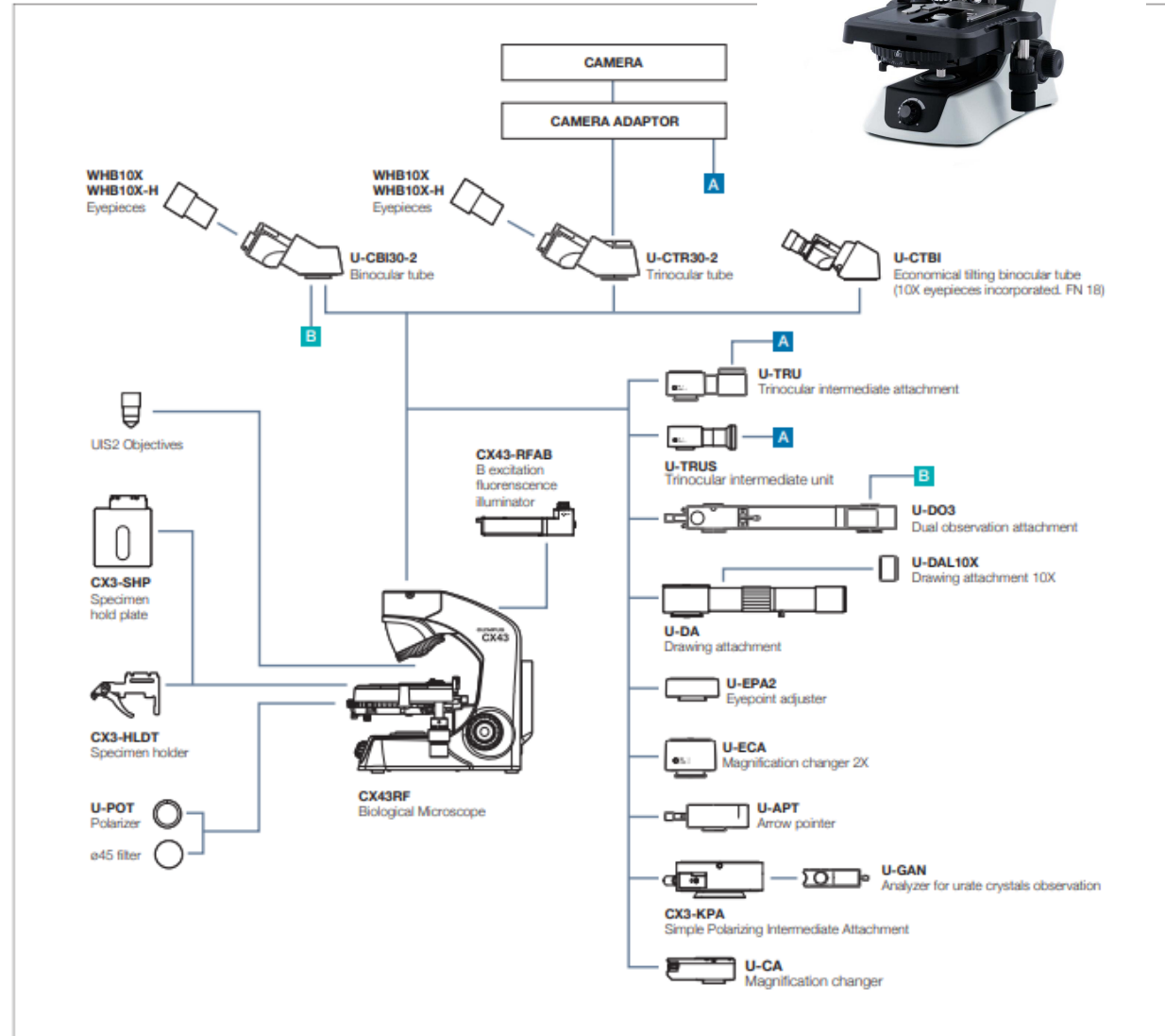


- **Binokulár/trinokulár**
- Jednoduché polarizované svetlo, Brightfield, Darkfield, **Fluorescencia**

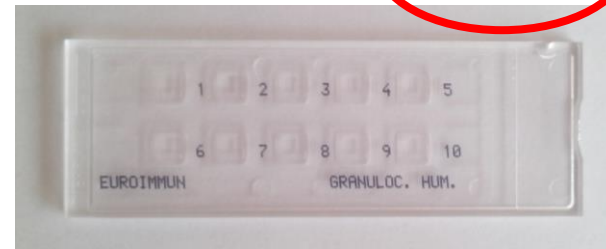
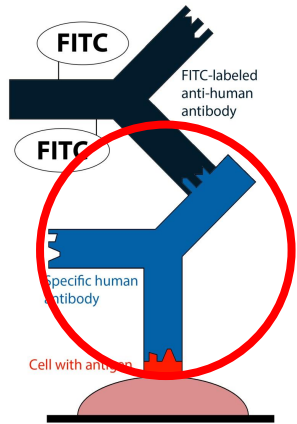
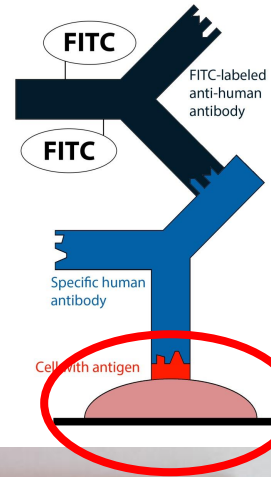
Schéma fluorescenčního mikroskopu



CX43 System

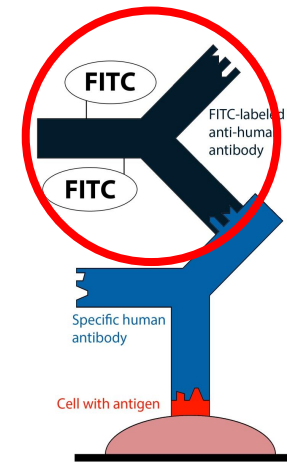
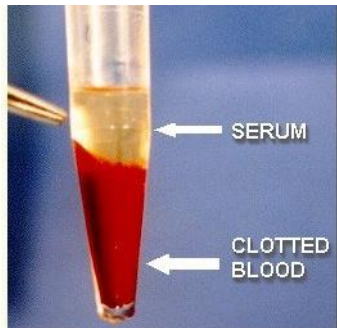


Základný princíp



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

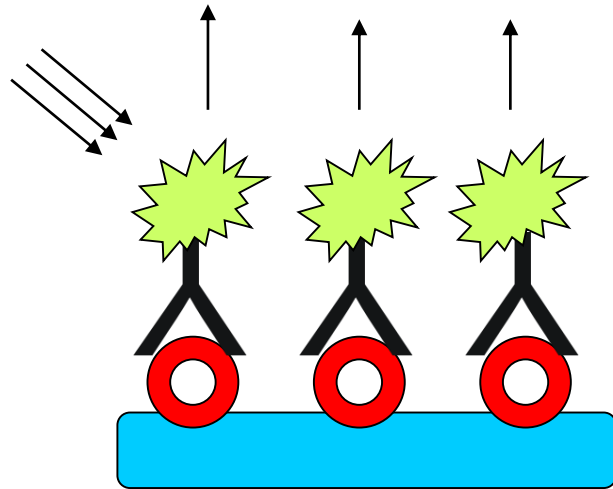
Používa sa k detekcii protilátok, väzba protilátok a konjugátu v 2 krokoch:

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

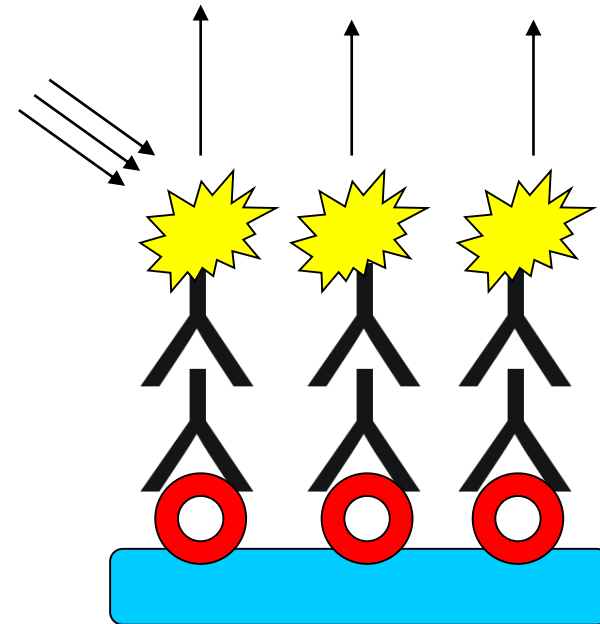
Využite: dôkaz špecifických protilátok, najčastejšie autoprottilátok

Imunofluorescencia

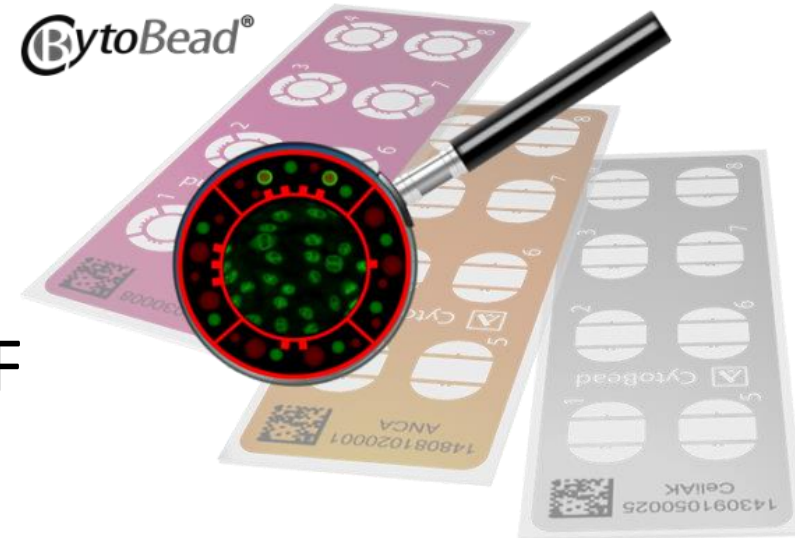
PRIAMA



NEPRIAMA



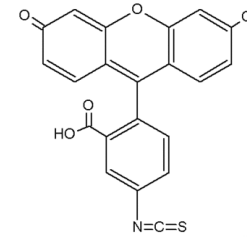
Imunofluorescencie



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 – dŕoŕžitý znak pre odlíŕenie 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

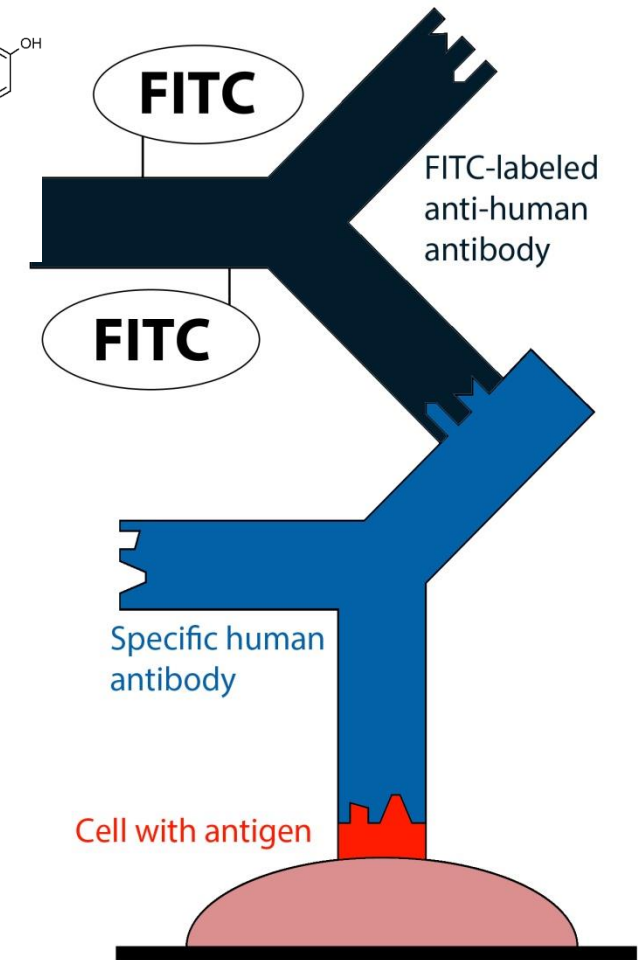


- Protilátka s naviazaným fluorescenčným farbivom (fluorochromom)
- Najčastejšie používaný fluorochrom je **FITC** (fluoresceinizothiokyanát)



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)

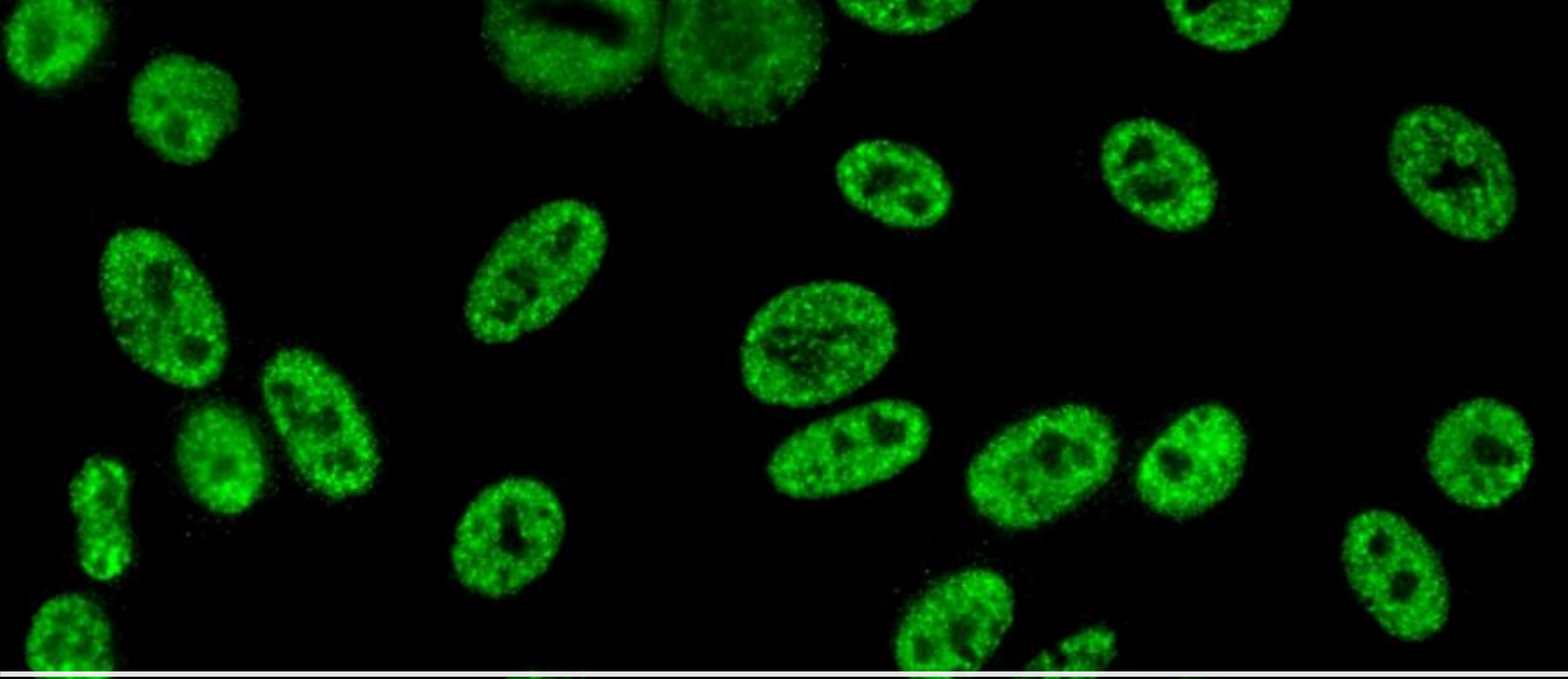
- Veľká skupina protilátok
- Viažu sa na rôzne antigény v jadre (DNA, RNA, centroméry, ...)
- Výskyt pri rôznych autoimunitných ochoreniach (systémový lupus erytematodes, Sjögrenov syndróm, reumatoídna artritída, ...)



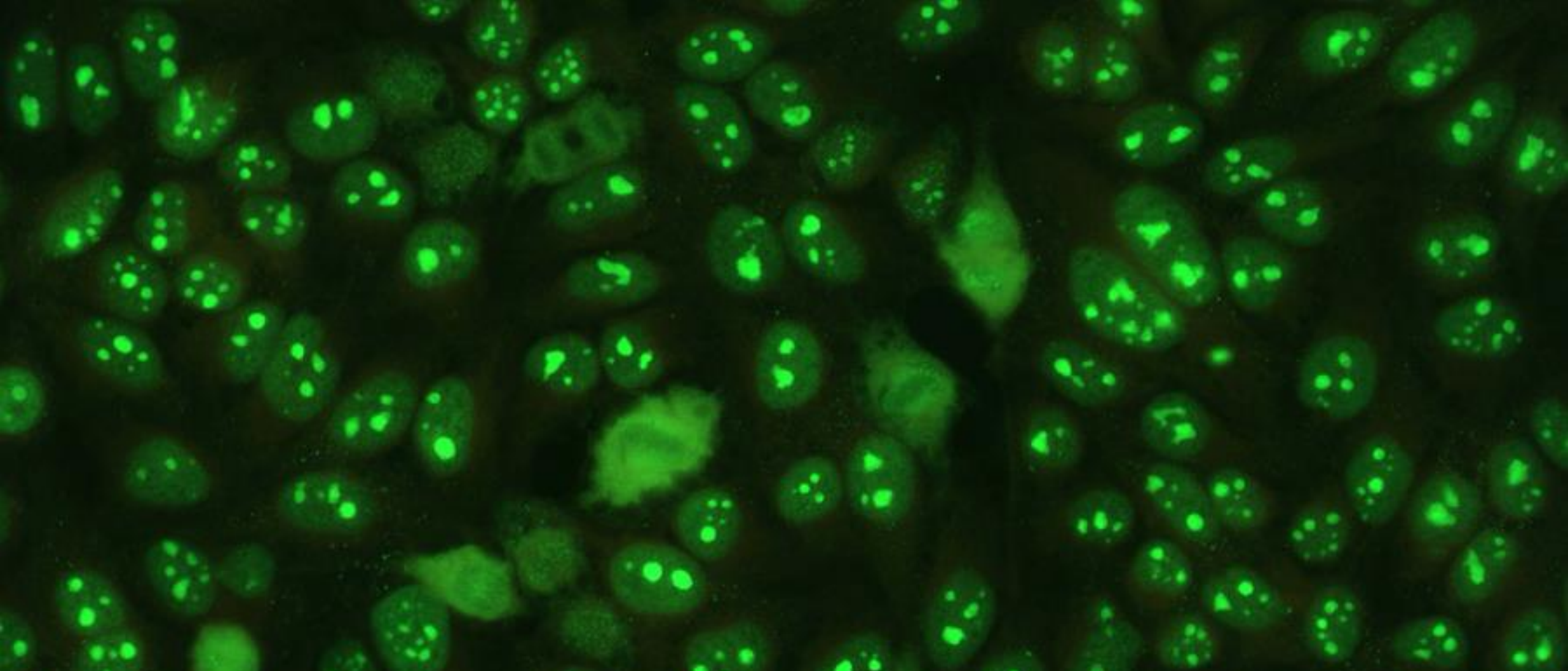
Fluorescenčný obraz v mikroskope môže vyzeráť rovnako alebo podobne u rôznych protilátok – keď vidíme určitý obraz, nevieme ešte o akú autoprottilátku ide (na aký antigén sa viaže), k jej bližšiemu určaniu môžu pomôcť iné metódy (ELISA, imunoblot)

A fluorescence microscopy image showing numerous cells with bright green fluorescence against a dark 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)



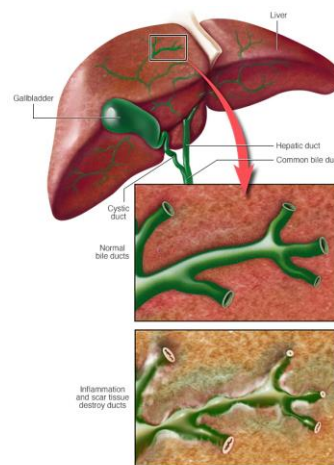
ANA – typ nukleolárny (jadierkový)





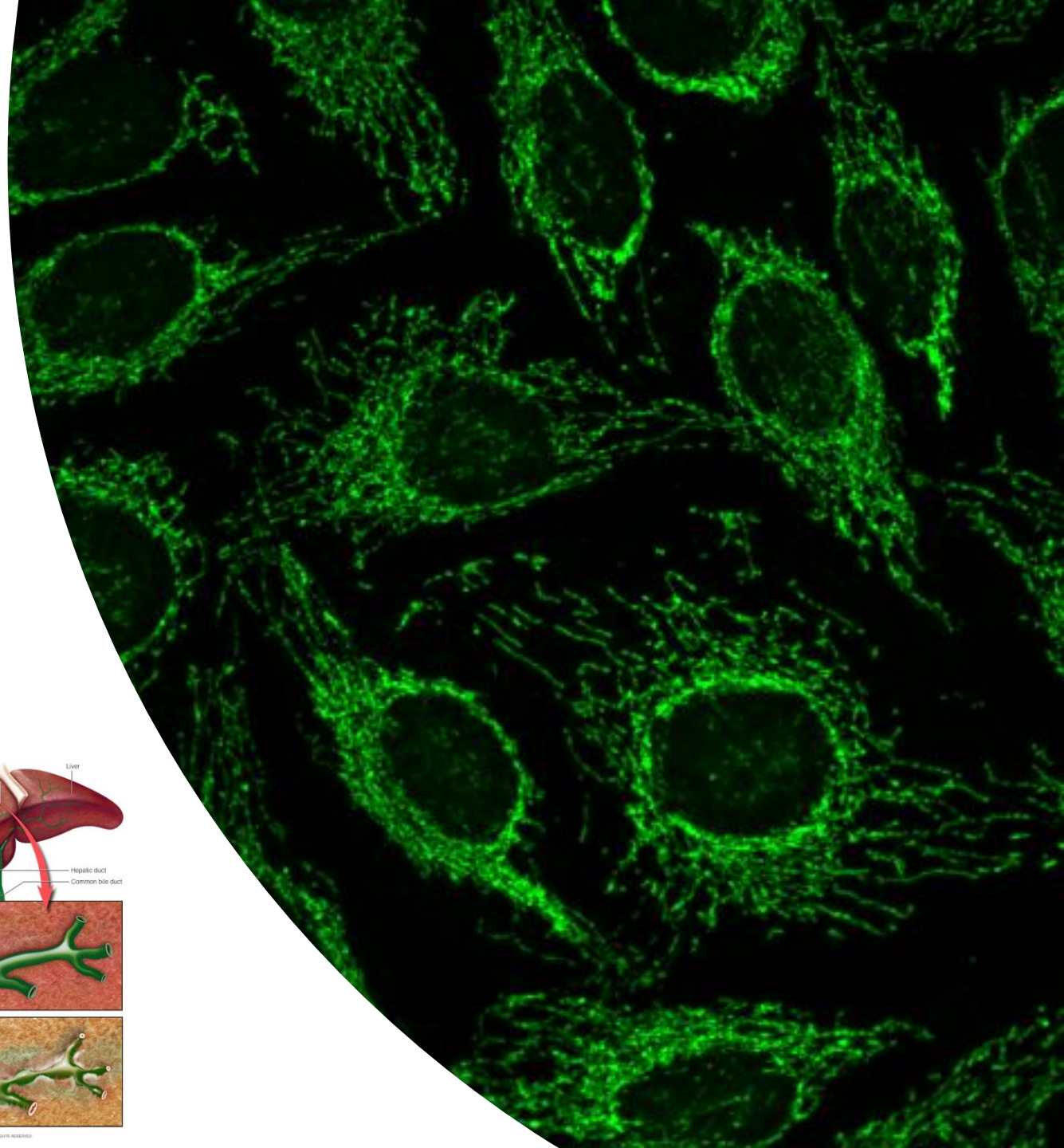
ANA – typ centromerový (CREST syndrom)

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

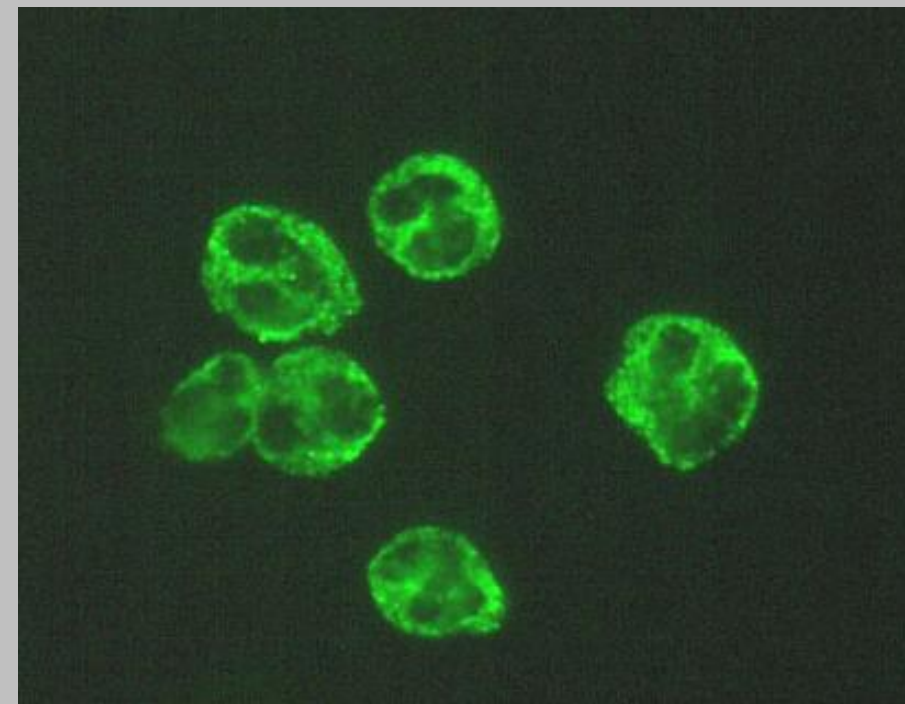
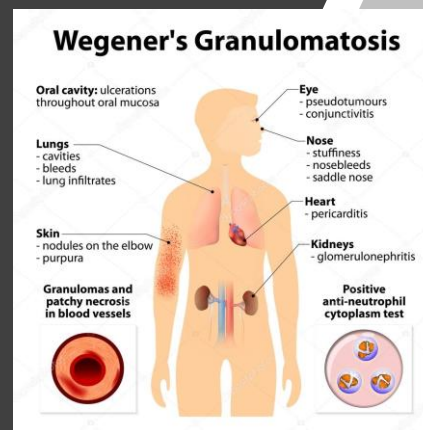
© 2010 FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.




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 specifically binds to double-stranded DNA (dsDNA) in the kinetoplast. The cells are elongated and have a distinct flagellum. The background is dark, making the green-stained cells stand out. Two white arrows point to specific cells, one at the top and one in the middle, with corresponding text labels.

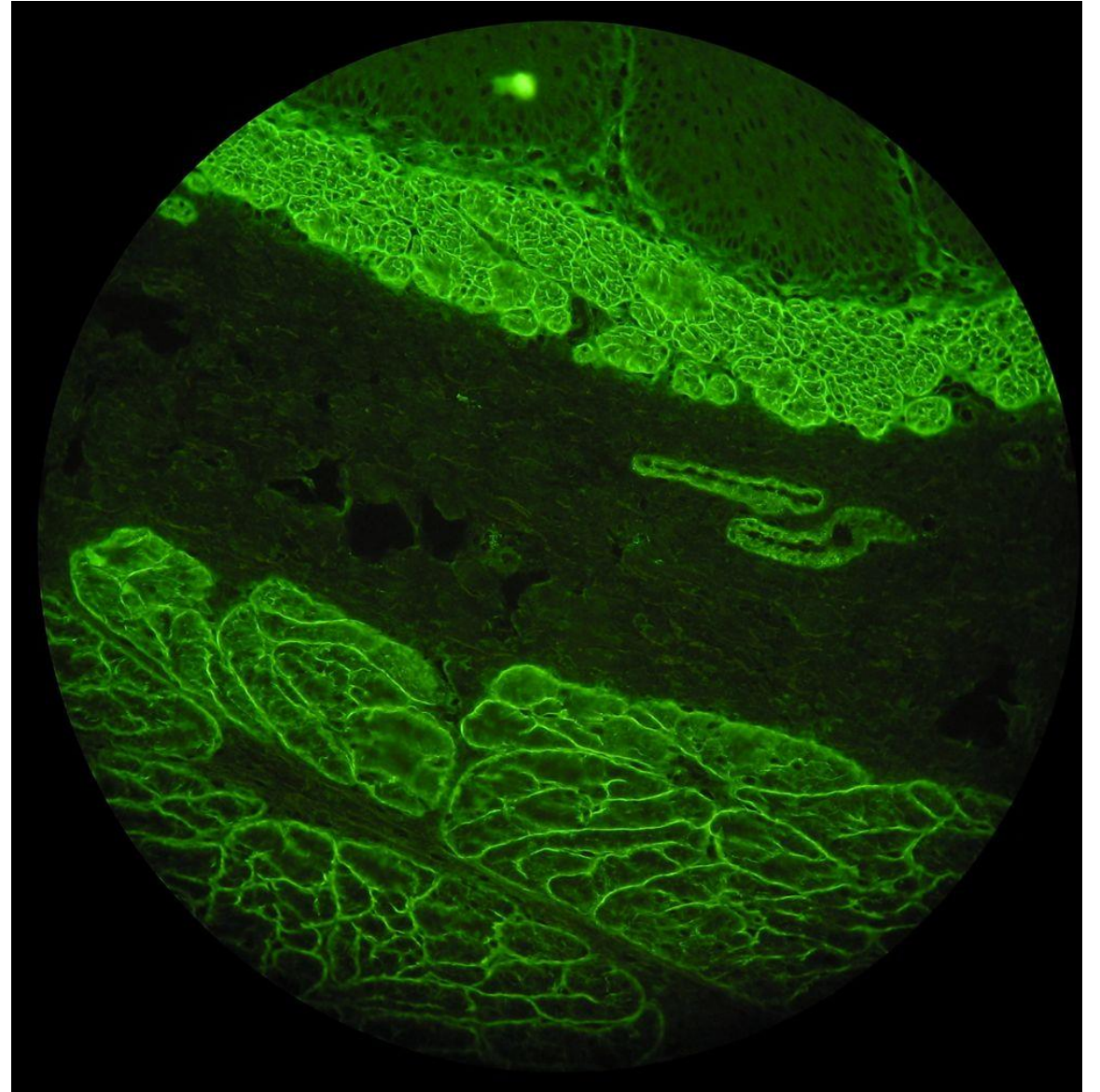
<dsDNA in the kinetoplast
positively stained

<Crithida luciliae

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

EMA (protilátky proti endomysiu)

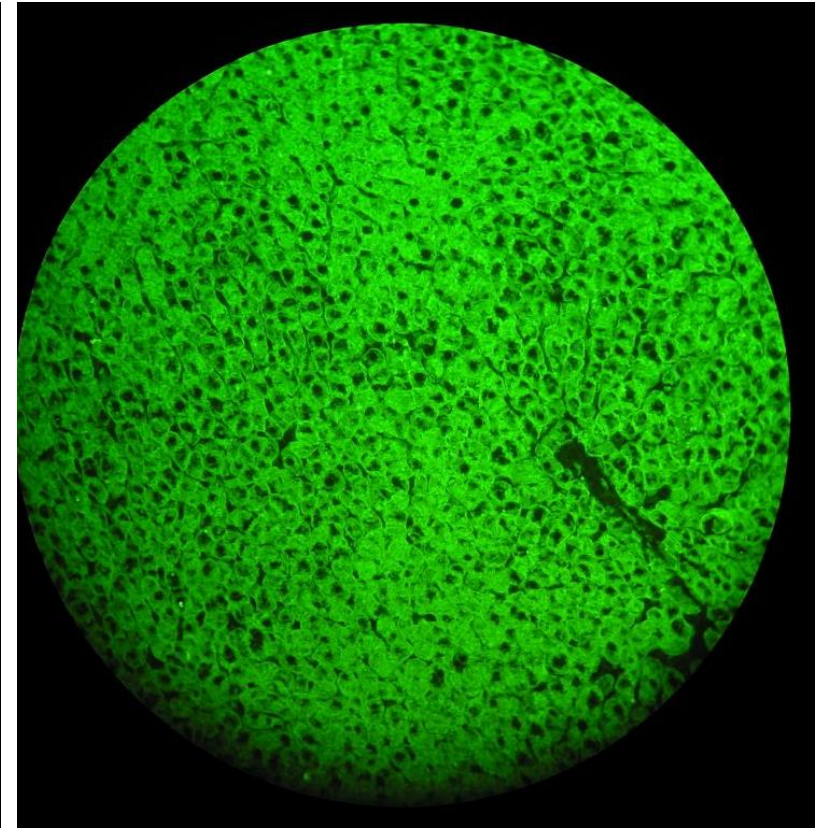
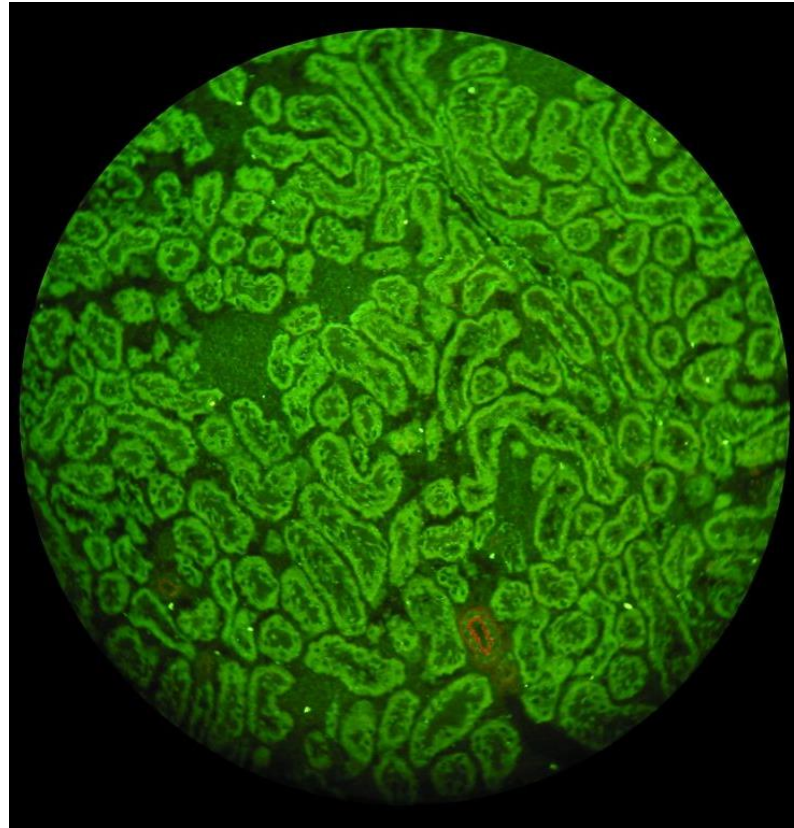
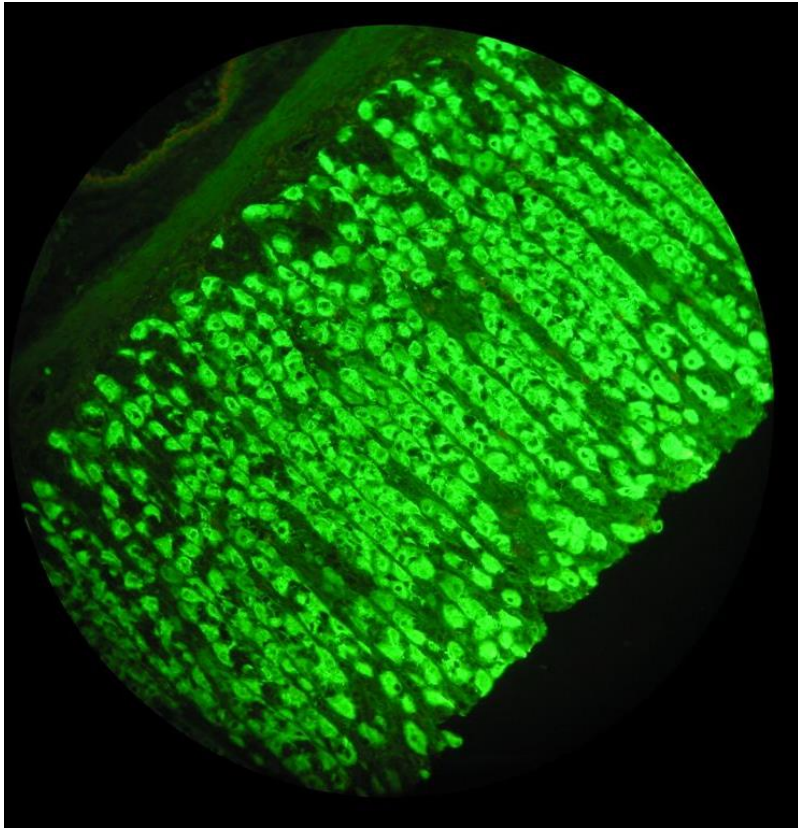
- Na reze opičieho jícnu
- Ag je TTG (tkanivová transglutamináza) – tiež ELISA
- Výskyt u *celiakie* (hlavne IgA)



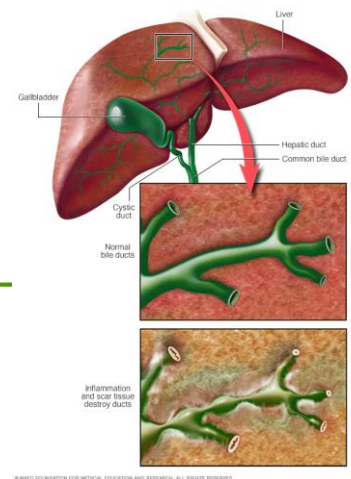
Substrát LKS

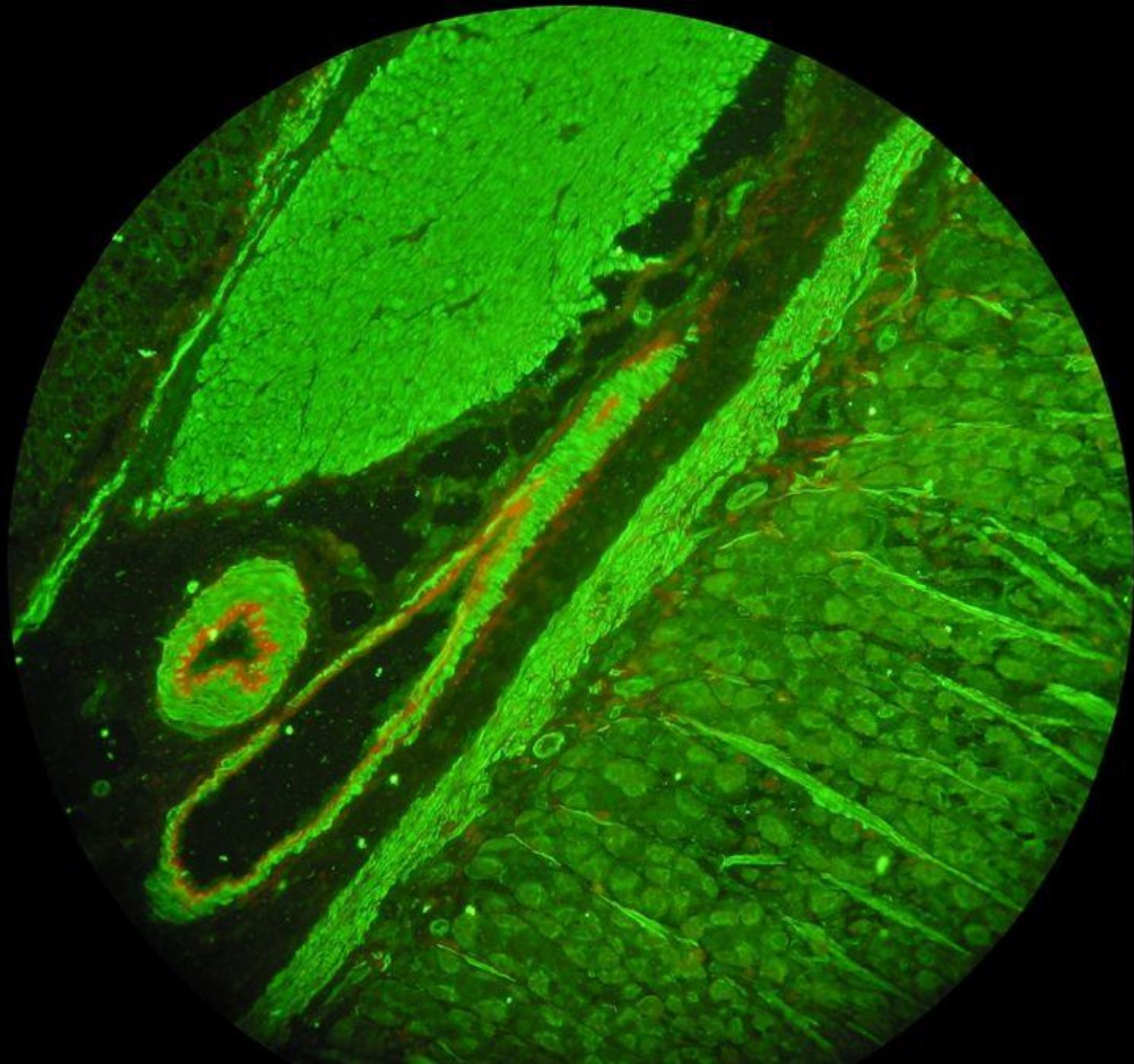
- Kombinácia 3 krysích tkanív
 - játra (Liver)
 - ledviny (Kidney)
 - žalúdok (Stomach)

- 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) – krysí žalúdok, ledviny, jatra





ASMA

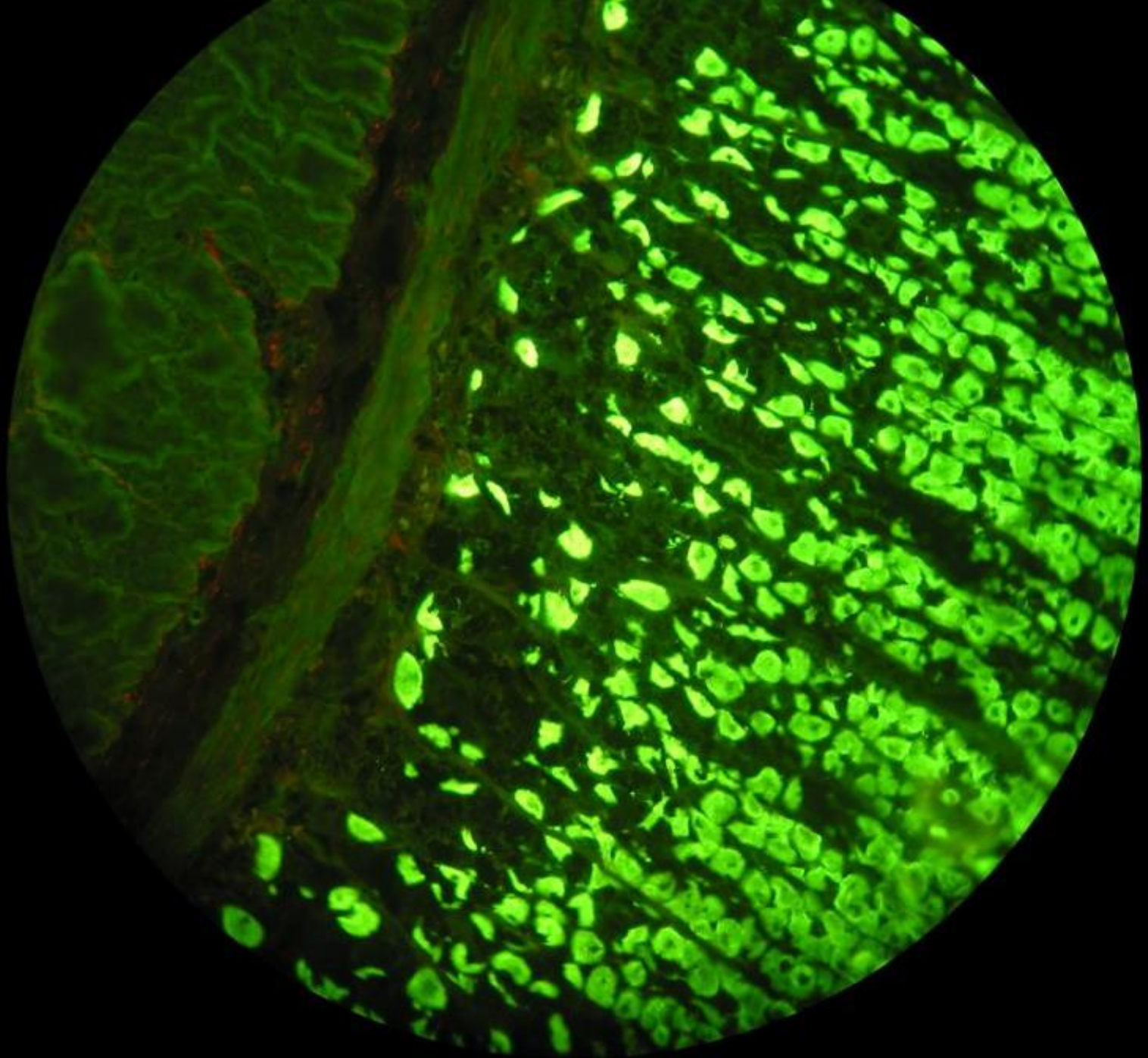
(proti hladkému svalu)

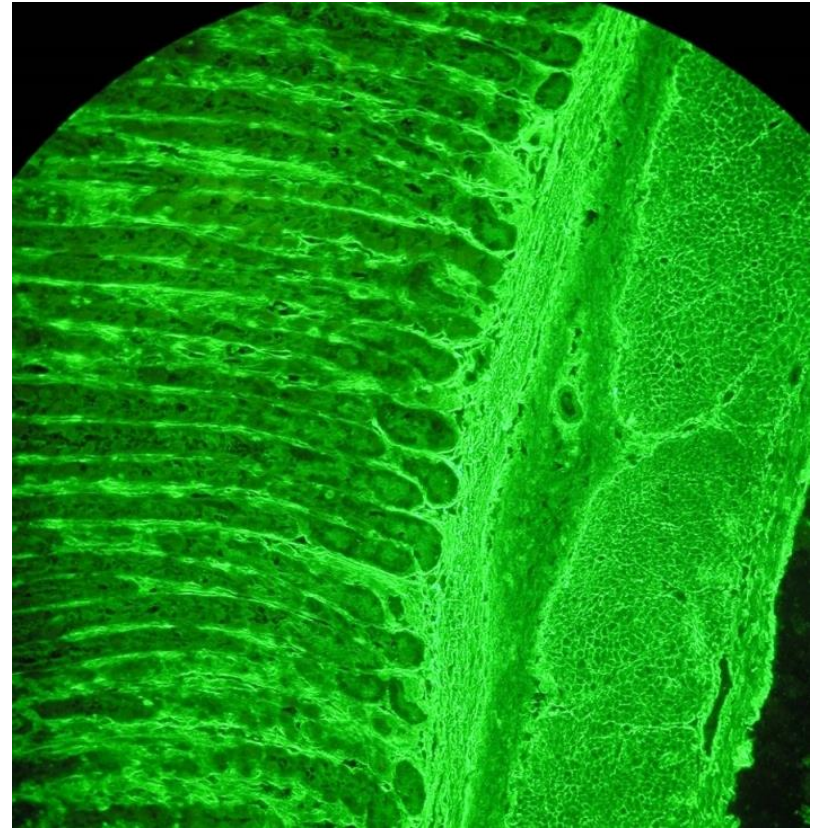
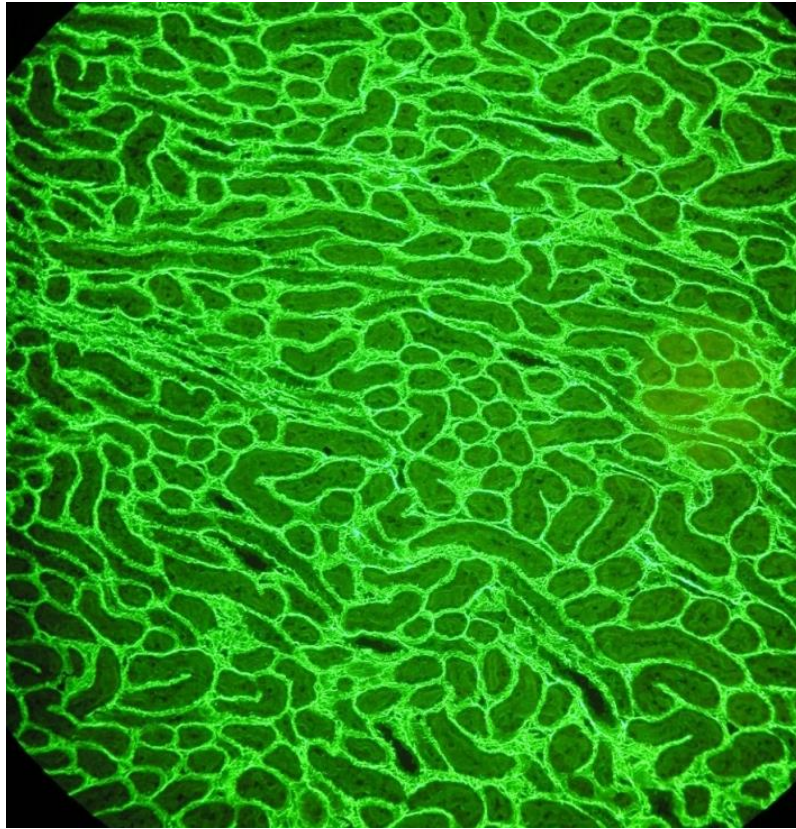
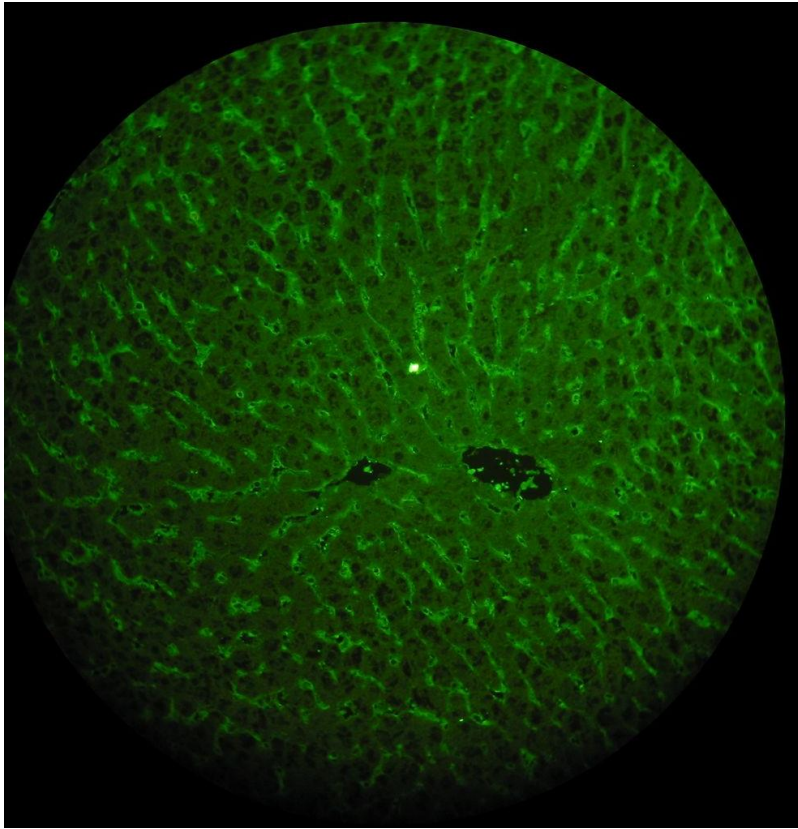
– krysí žalúdok

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