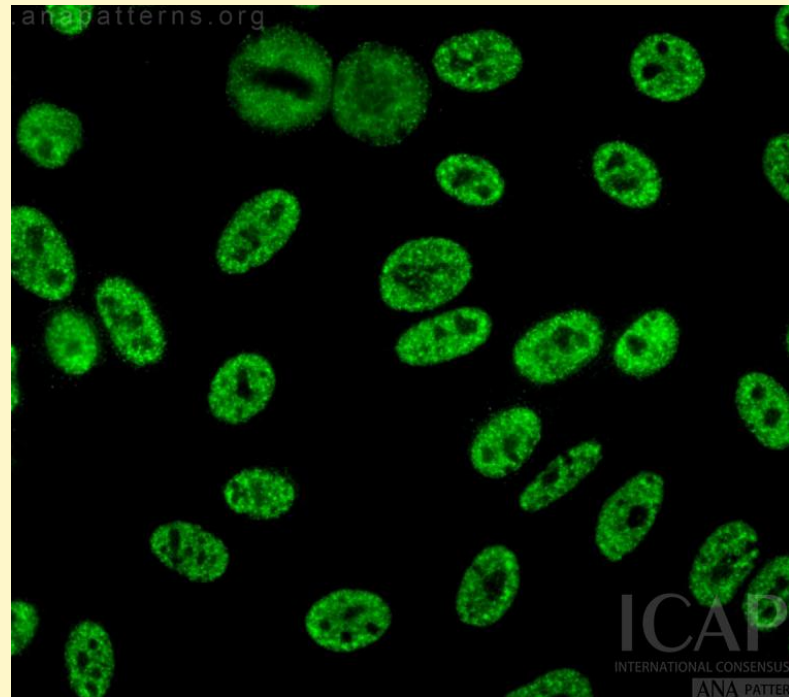


IMUNOFLUORESCENCE



Mgr. Petr Bejdák

Ústav klinické imunologie a alergologie

Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

IMUNOFLUORESCENCE

Luminiscence

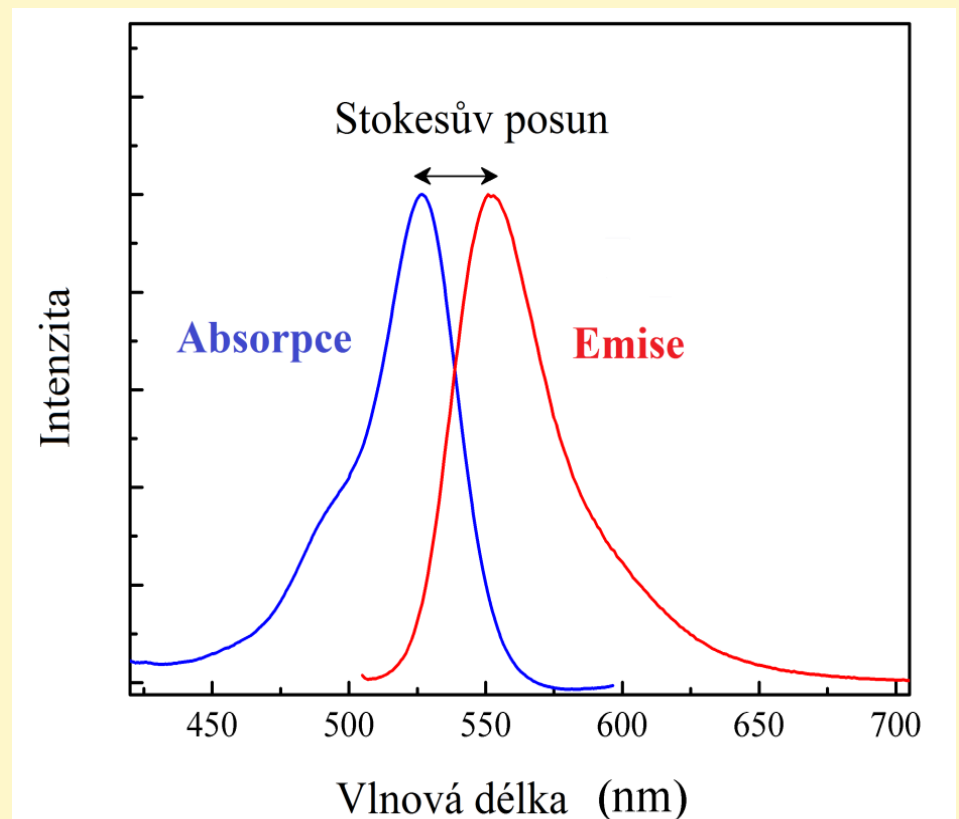
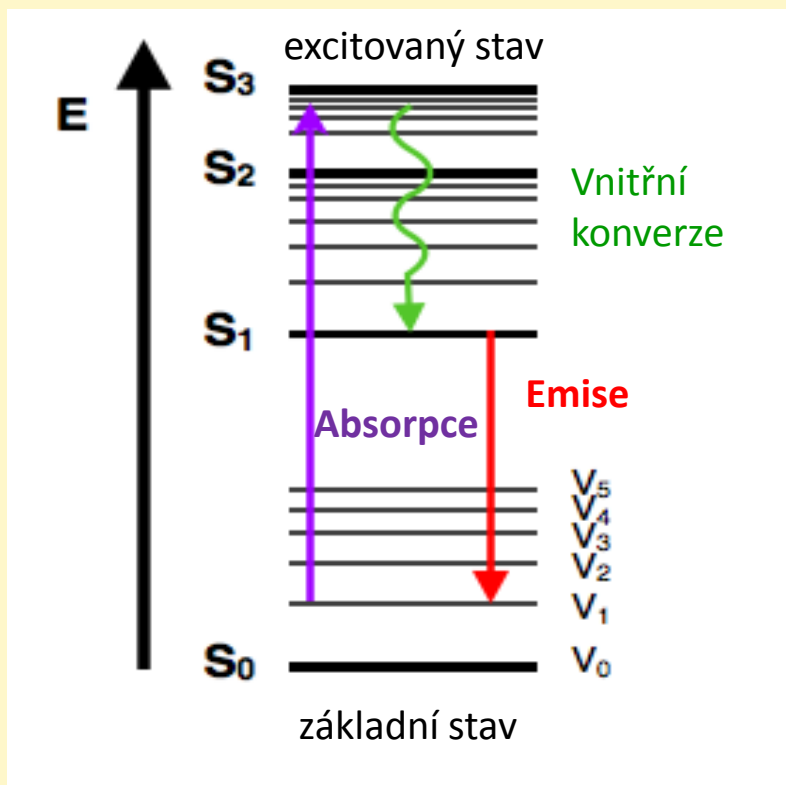
jev, při kterém látka emituje záření po absorpci excitačního záření (fotoluminiscence) nebo při chemické reakci (chemiluminiscence)



IMUNOFLUORESCENCE

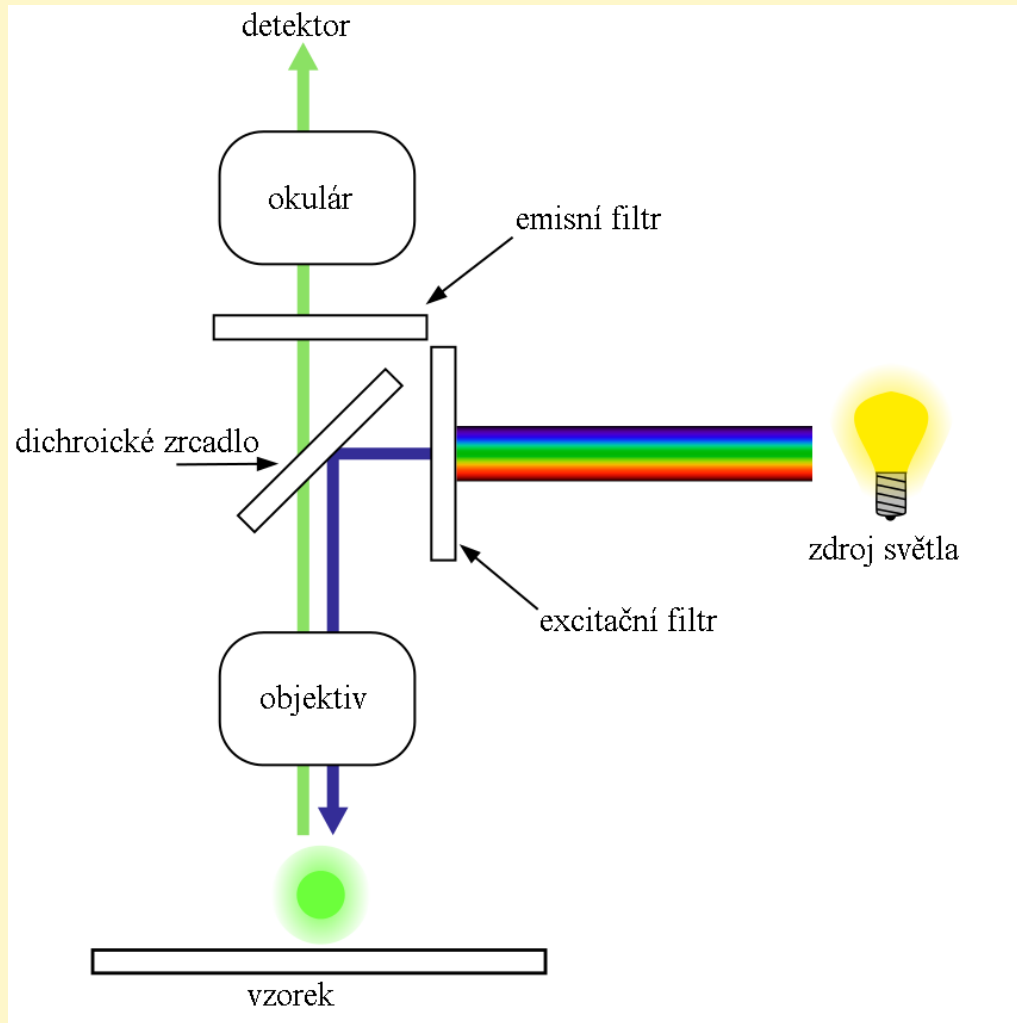
Fluorescence

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



IMUNOFLUORESCENCE

Schéma fluorescenčního mikroskopu



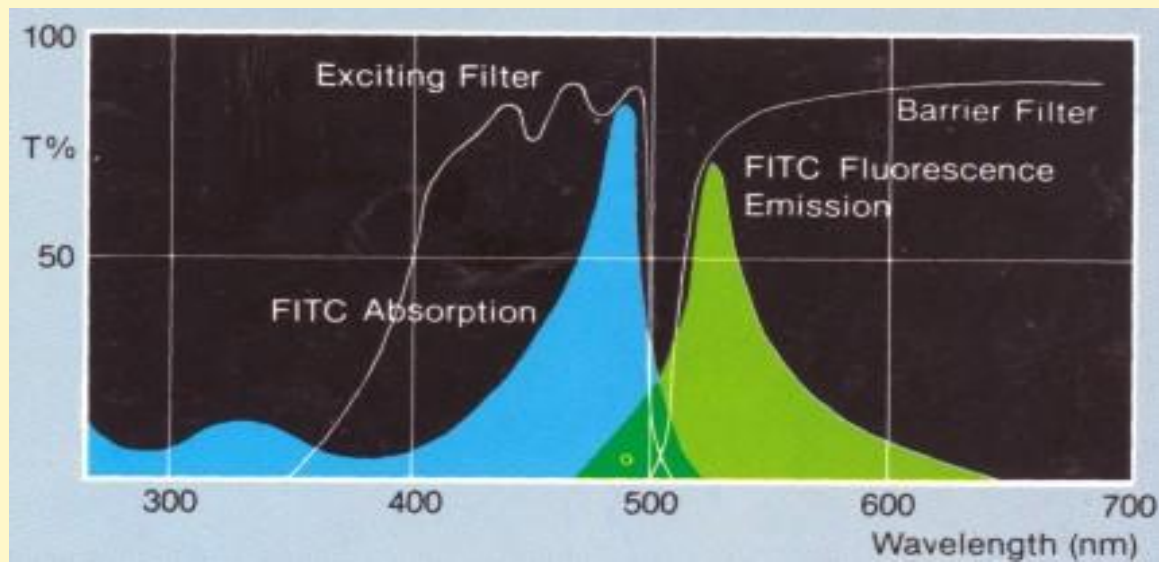
IMUNOFLUORESCENCE

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



Přímá IF

detekce antigenu, vazba konjugátu přímo na antigen

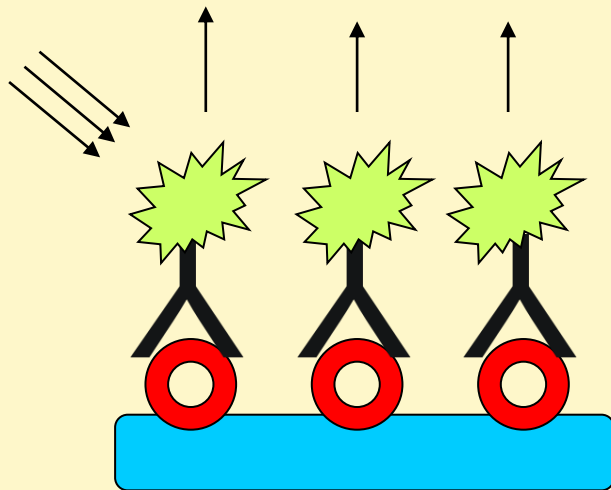
Nepřímá IF

detekce protilátek, probíhá ve 2 krocích:

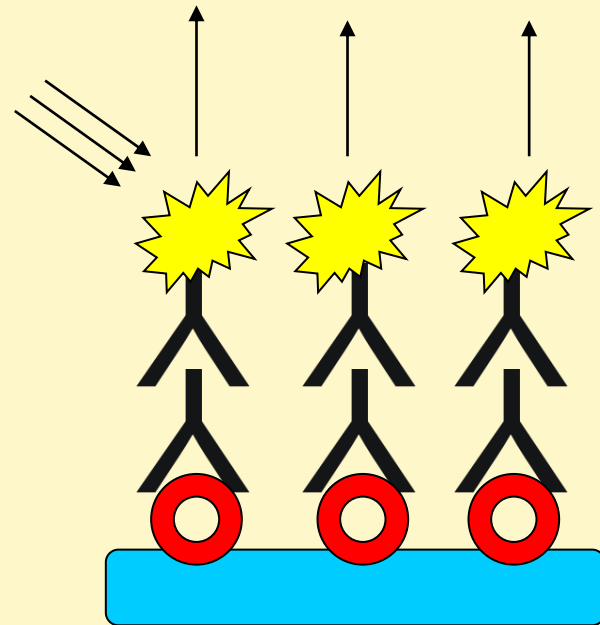
1. protilátky z testovaného séra se navážou na antigenní substrát
2. na tyto protilátky se potom váže konjugát (specifický k lidským imunoglobulinům - IgG/IgM/IgA)

IMUNOFLUORESCENCE

PŘÍMÁ



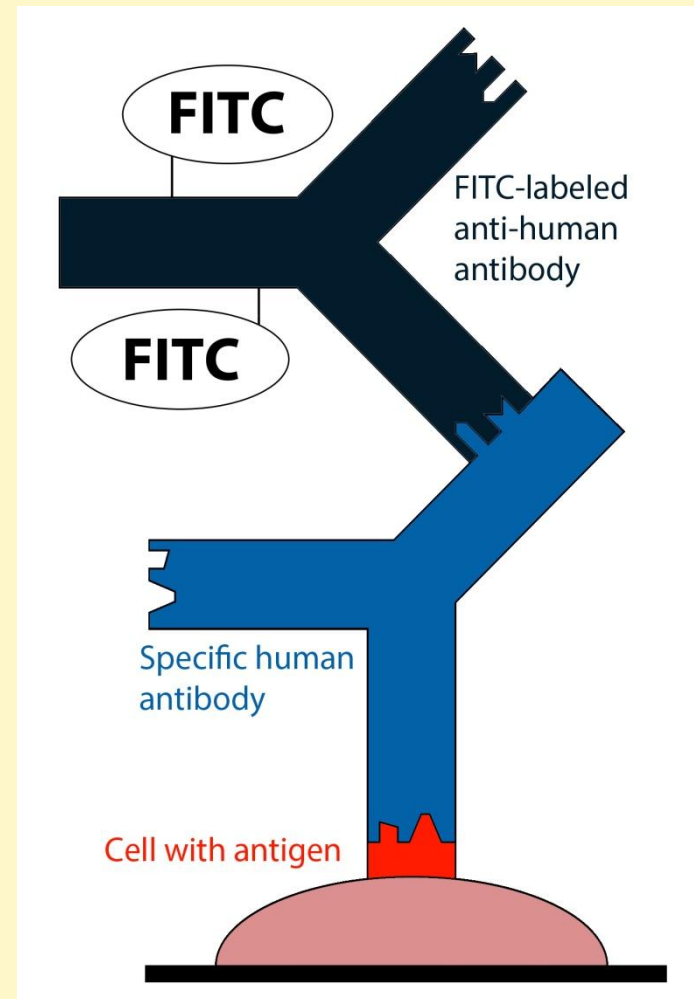
NEPŘÍMÁ



IMUNOFLUORESCENCE

Konjugát

- protilátka s navázaných fluorescenčním barvivem (fluorochromem)
- nejčastěji používaný flourochrom je FITC (fluoresceinizothiokyanát) - excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (emituje zelené světlo)
- u nepřímé IF – konjugát specifický k lidským imunoglobulinům ve třídách IgG / IgM / IgA
- pro některá autoimunitní onemocnění má klinický význam výskyt autoprotilátek v určité izotypové třídě (př. celiakie - IgA)



IMUNOFLUORESCENCE

Využití přímé IF

- průkaz antigenu v tkáňových řezech nebo dalších biologických vzorcích
- rychlý průkaz patogenů ve sputu nebo bronchoalveolární laváži

Využití nepřímé IF

- průkaz specifických protilátek, nejčastěji autoproti látek

IMUNOFLUORESCENCE

Autoprotilátky detekované nepřímou IF

1. orgánově nespecifické

- antinukleární (ANA)
- antimitochondriální (AMA)
- antiendomysální (EMA)
- proti cytoplasmě neutrofilů (ANCA)
- proti retikulinu (RET)
- proti hladkému svalu (ASMA)

2. orgánově specifické

- proti parietálním buňkám žaludku (GPC)
- proti bazální membráně glomerulů (GBM)

atd.

IMUNOFLUORESCENCE

Antigenní substráty používané při nepřímé IF

HEp2 (Human Epithelial)

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

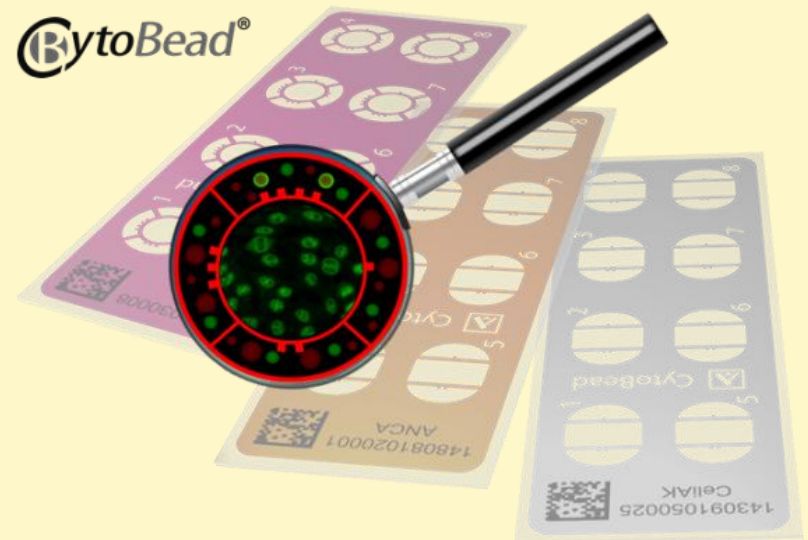
Neutrofilní granulocyty – ANCA

Crithidia luciliae – prvok,
detekce protilátek proti dsDNA

LKS (liver, kidney, stomach)

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

Řez opičího jícnu – EMA



IMUNOFLUORESCENCE

ANA (autoprotiátky proti jaderným antigenům) - HEp2 buňky
typy fluorescence (antigen):

- homogenní (dsDNA, histony, nukleozómy a jiné DNA-vazebné proteiny)
- nukleární membrána (laminy, proteiny jaderných pórů)
- granulární=zrnitý=skvrnitý (SS-A, SS-B, Sm/RNP...)
- jadéřkový=nukleolární (Scl-70 = DNA-topoizomeráza I)
- centromerový (centromera)
- ojedinělé tečky (coilin p-80)
- četné tečky (glykoprotein Sp 100)
- PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen = Cyclin I)

Antigeny v cytoplazmě HEp2 – mitochondrie, cytoskelet (aktin, vimentin...), Jo-1 (hystidyl-tRNA syntetáza), lysozomy, peroxizomy, Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum, mitotický aparát

IMUNOFLUORESCENCE

ANCA (autoproti látky proti cytoplazmě neutrofilů), typy:

- perinukleární (pANCA), antigenem je MPO (myeloperoxidáza)
- cytoplazmatická (cANCA), antigenem je PR3 (proteináza 3)
- atypická ANCA, různé antigeny (elastáza, lysozym, katepsin...)

LKS (kombinace 3 poktaních tkání – liver, kidney, stomach)

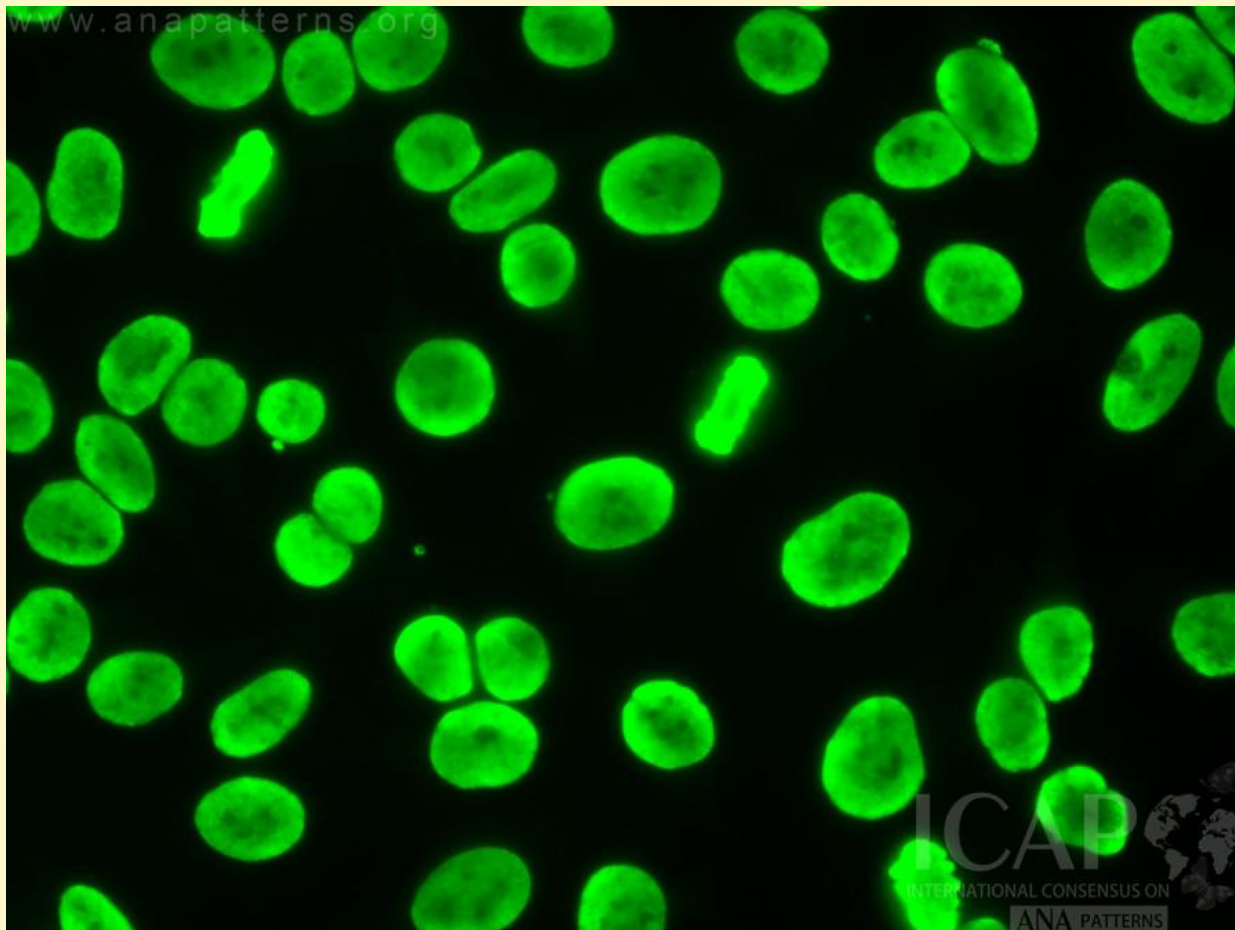
typy:

- AMA (antimitochondriální) – různé typy (častý je AMA M2 – antigen pyruvát dehydrogenáza)
- ASMA (proti hladkému svalu) – antigen aktin
- GPC, RET aj.

EMA – autoproti látky proti endomysiu (kde se nachází cílový autoantigen TTG – tkáňová transglutamináza) ve třídě IgA

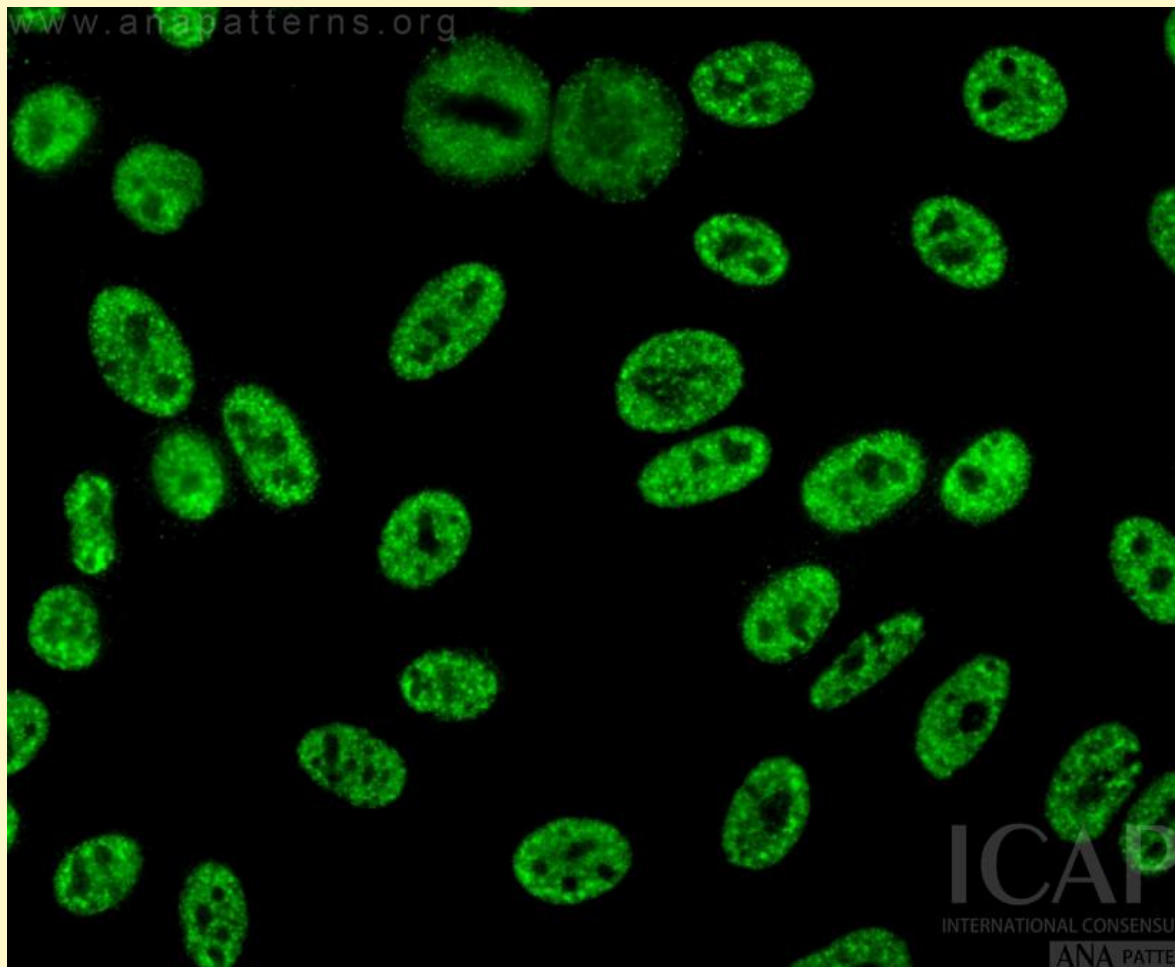
IMUNOFLUORESCENCE

HEp2 - ANA - typ homogenní



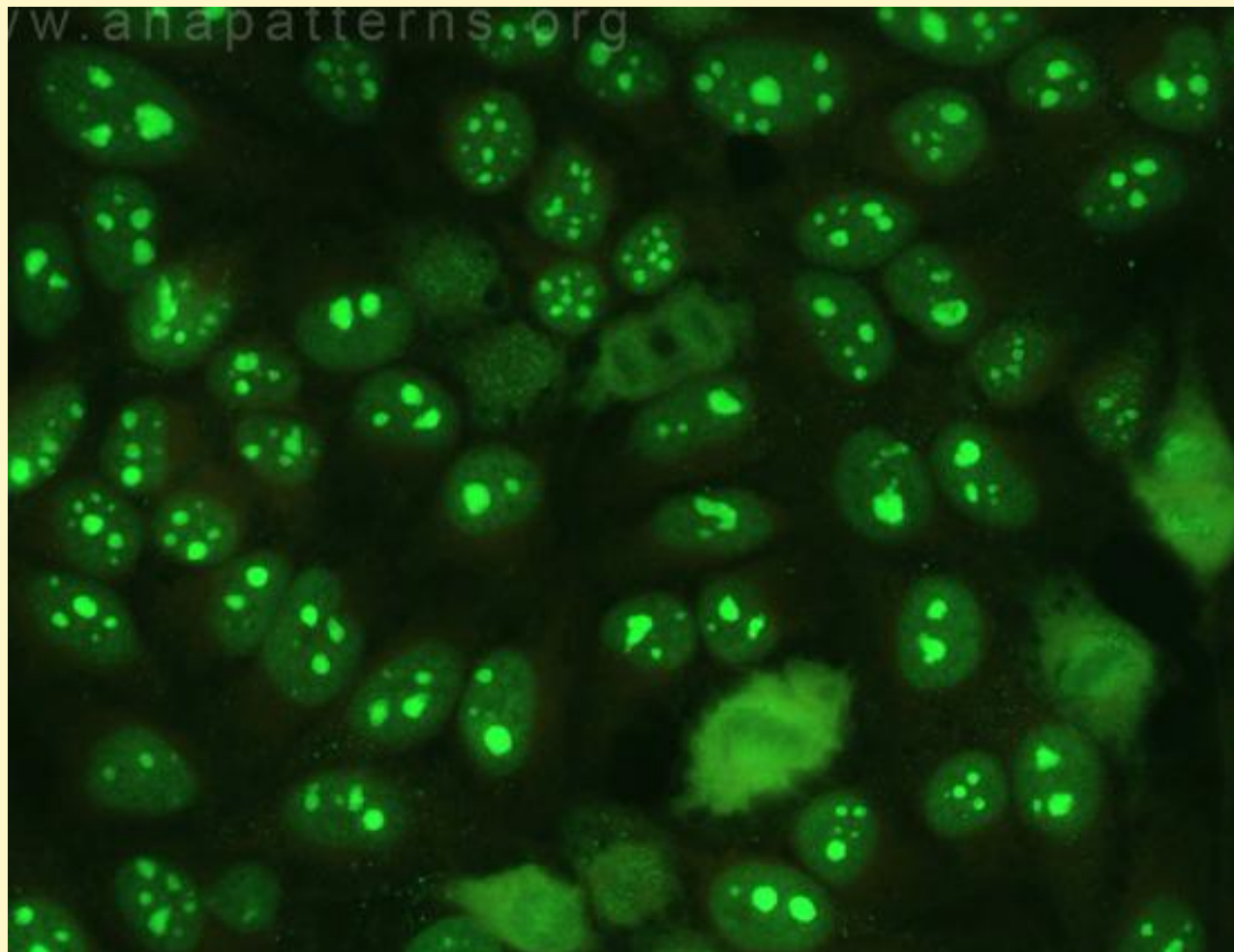
IMUNOFLUORESCENCE

HEp2 - ANA - typ granulární



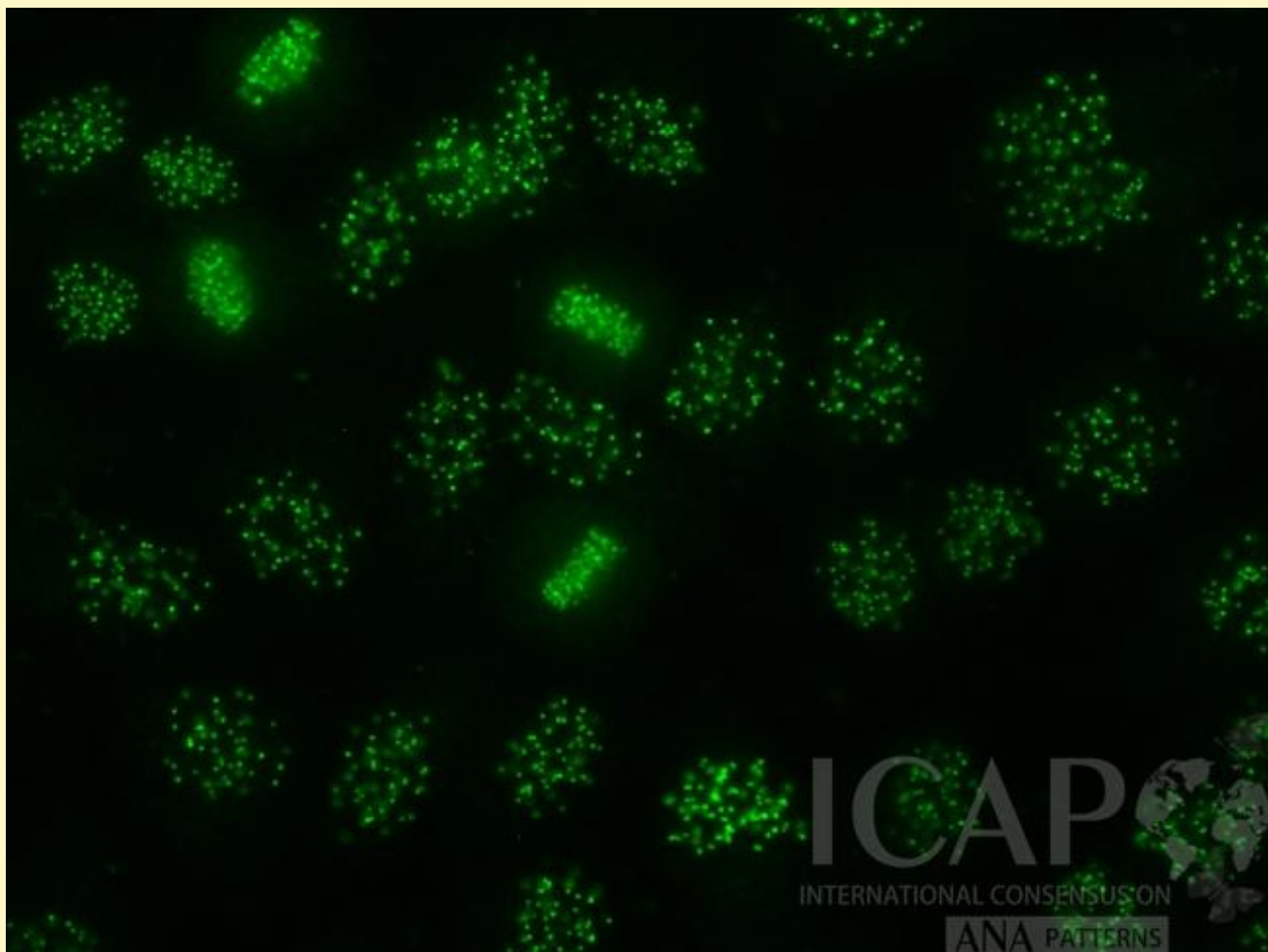
IMUNOFLUORESCENCE

HEp2 - ANA - typ nukleolární



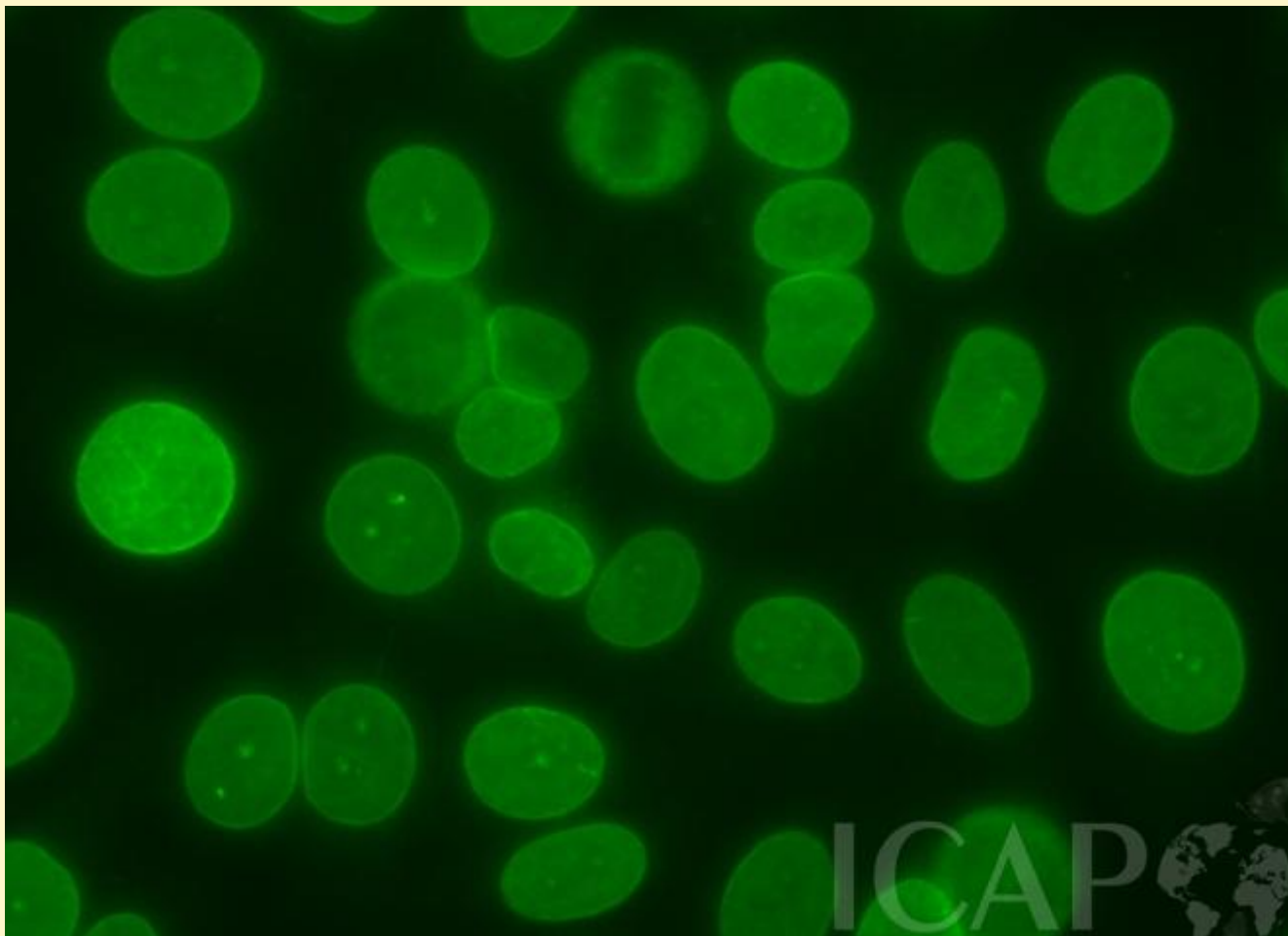
IMUNOFLUORESCENCE

HEp2 - ANA - typ centromerový



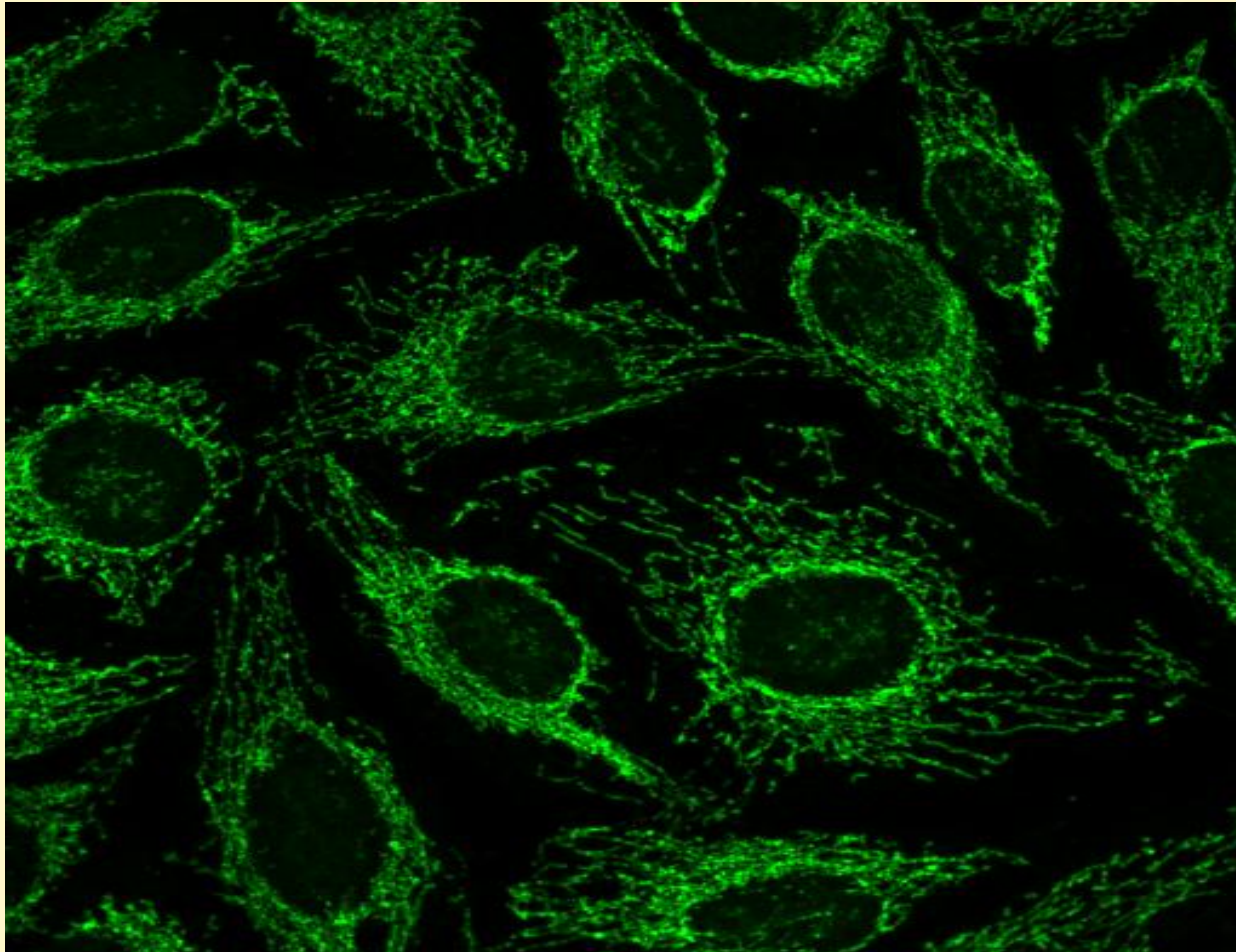
IMUNOFLUORESCENCE

HEp2 - ANA - typ nukleární membrána



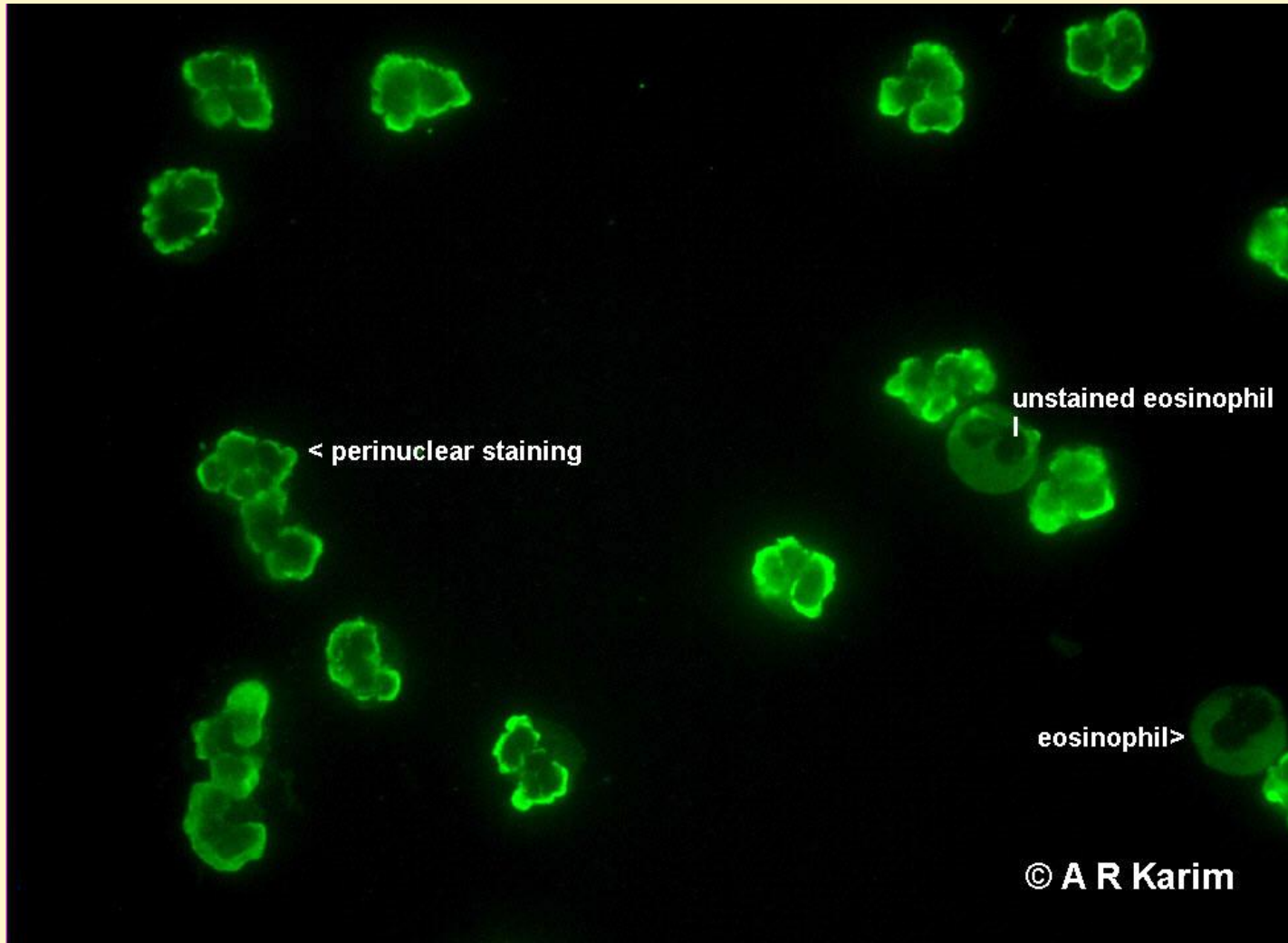
IMUNOFLUORESCENCE

HEp2 - cytoplazma – typ AMA



IMUNOFLUORESCENCE

Neutrofilní granulocyty - pANCA



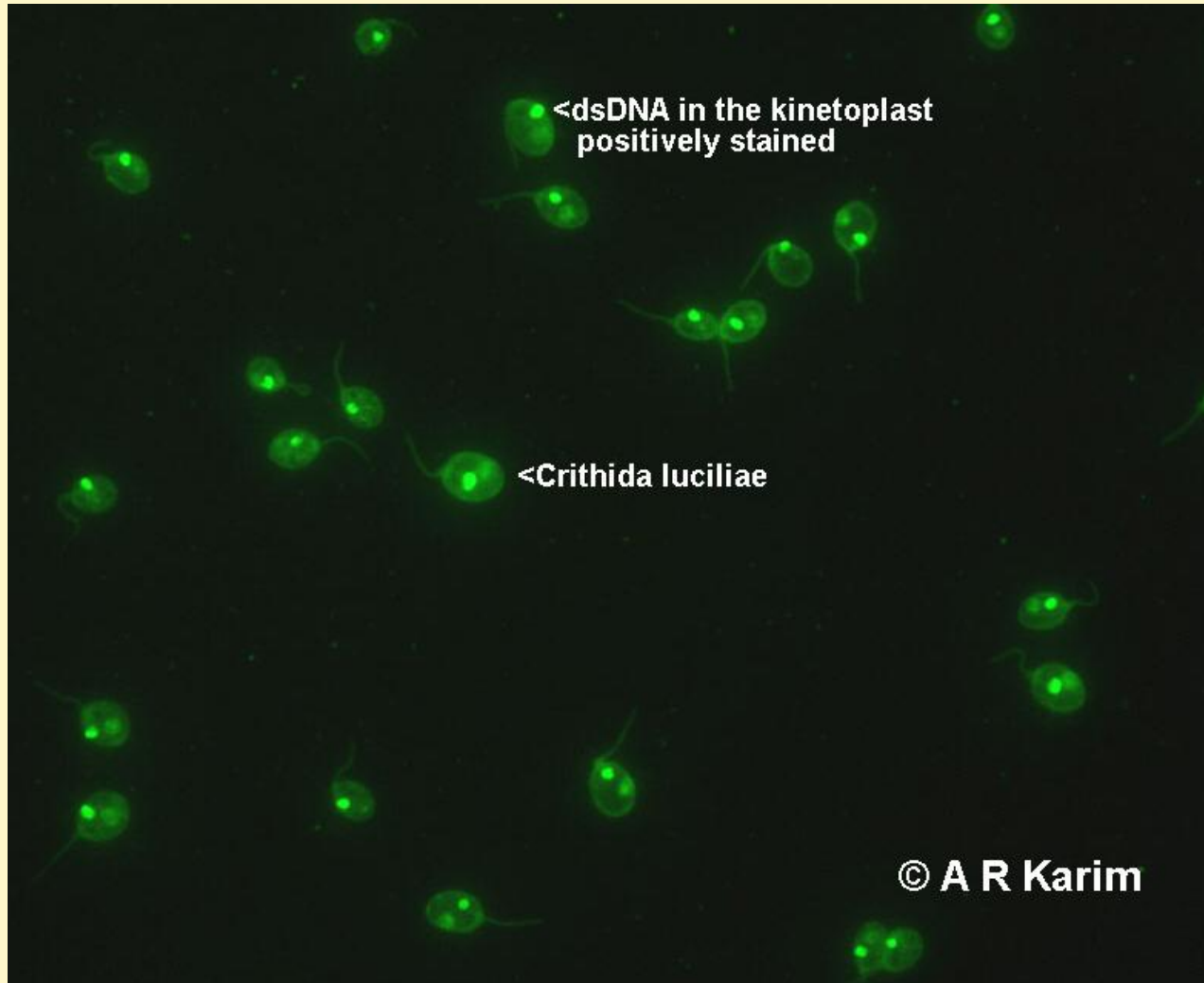
IMUNOFLUORESCENCE

Neutrofilní granulocyty - cANCA



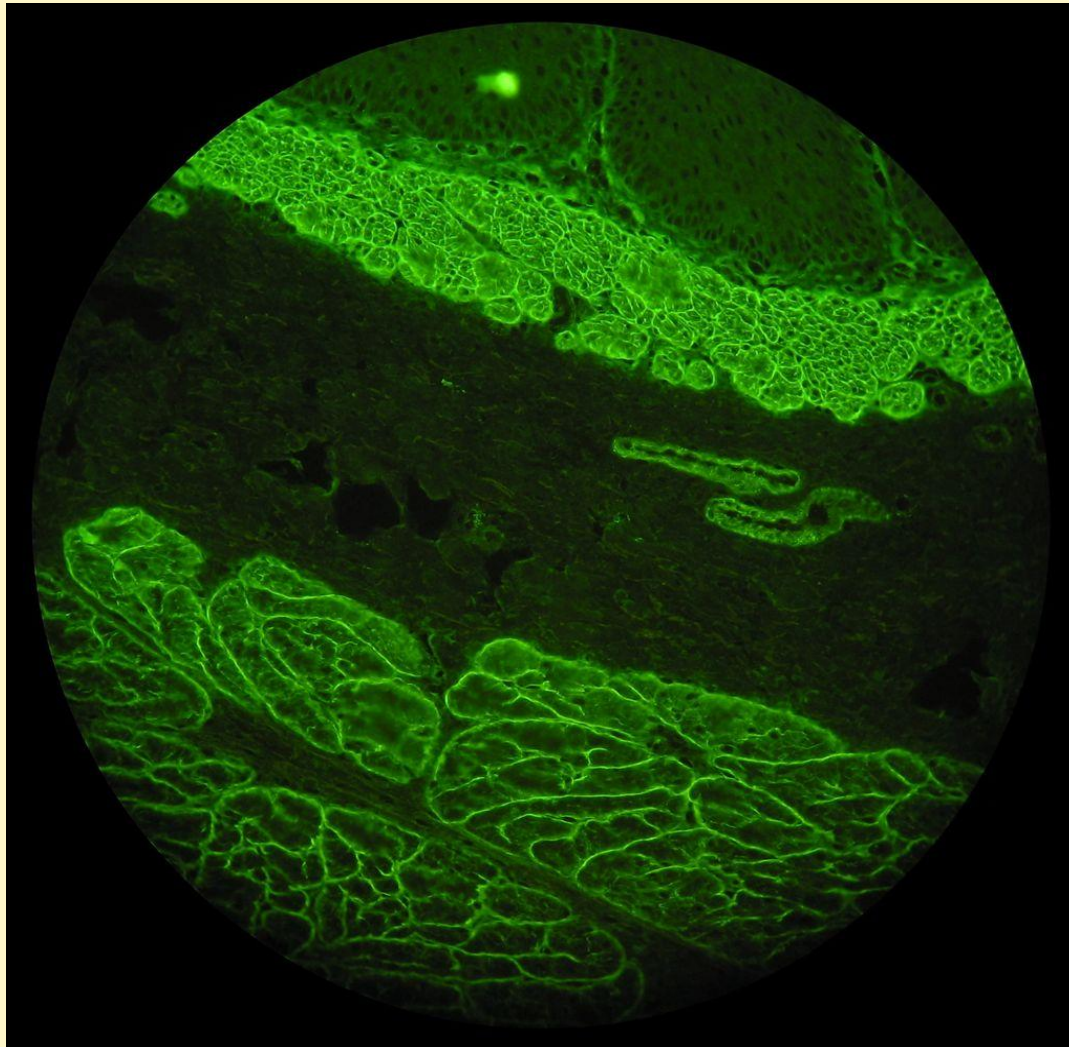
IMUNOFLUORESCENCE

Prvok *Crithidia luciliae* - dsDNA



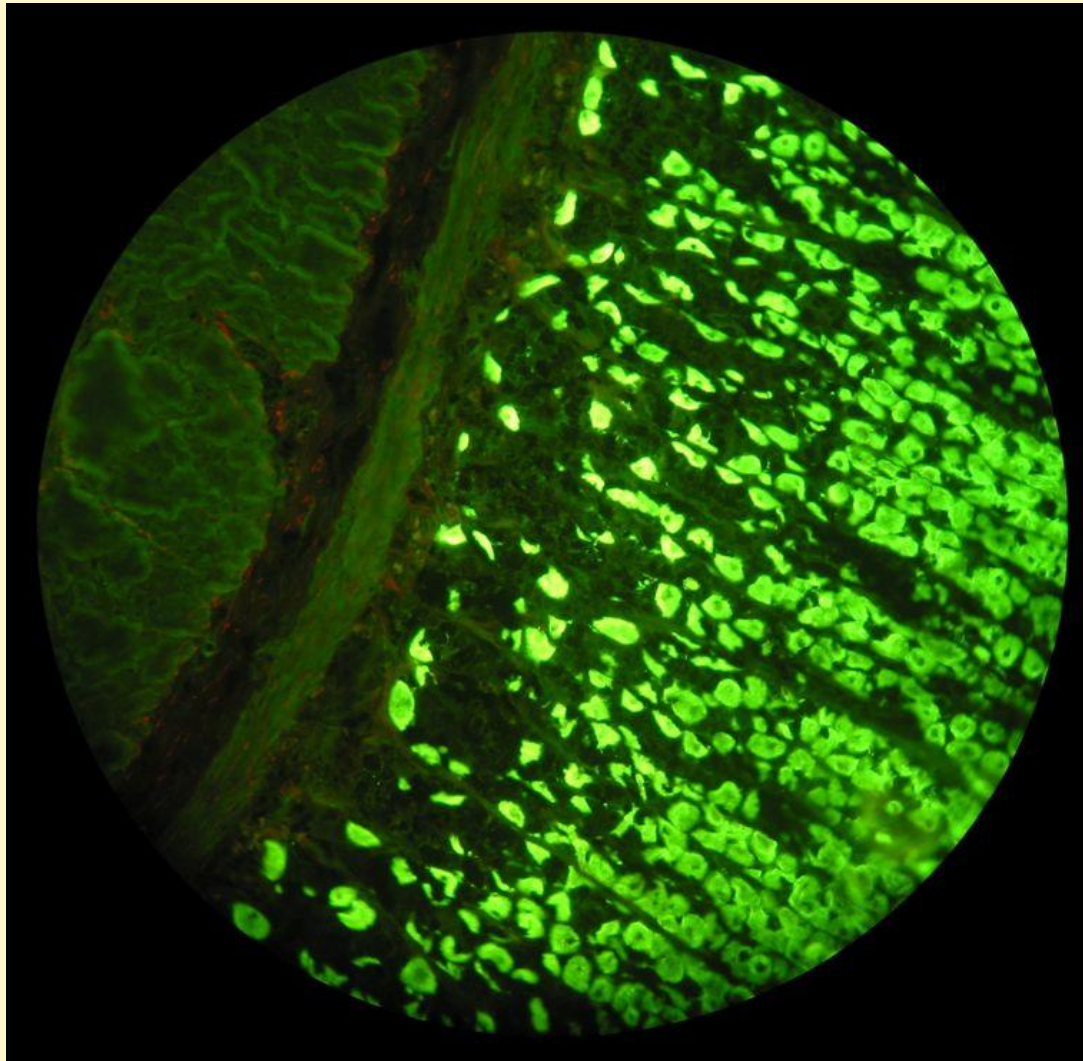
IMUNOFLUORESCENCE

Opičí jícn – EMA



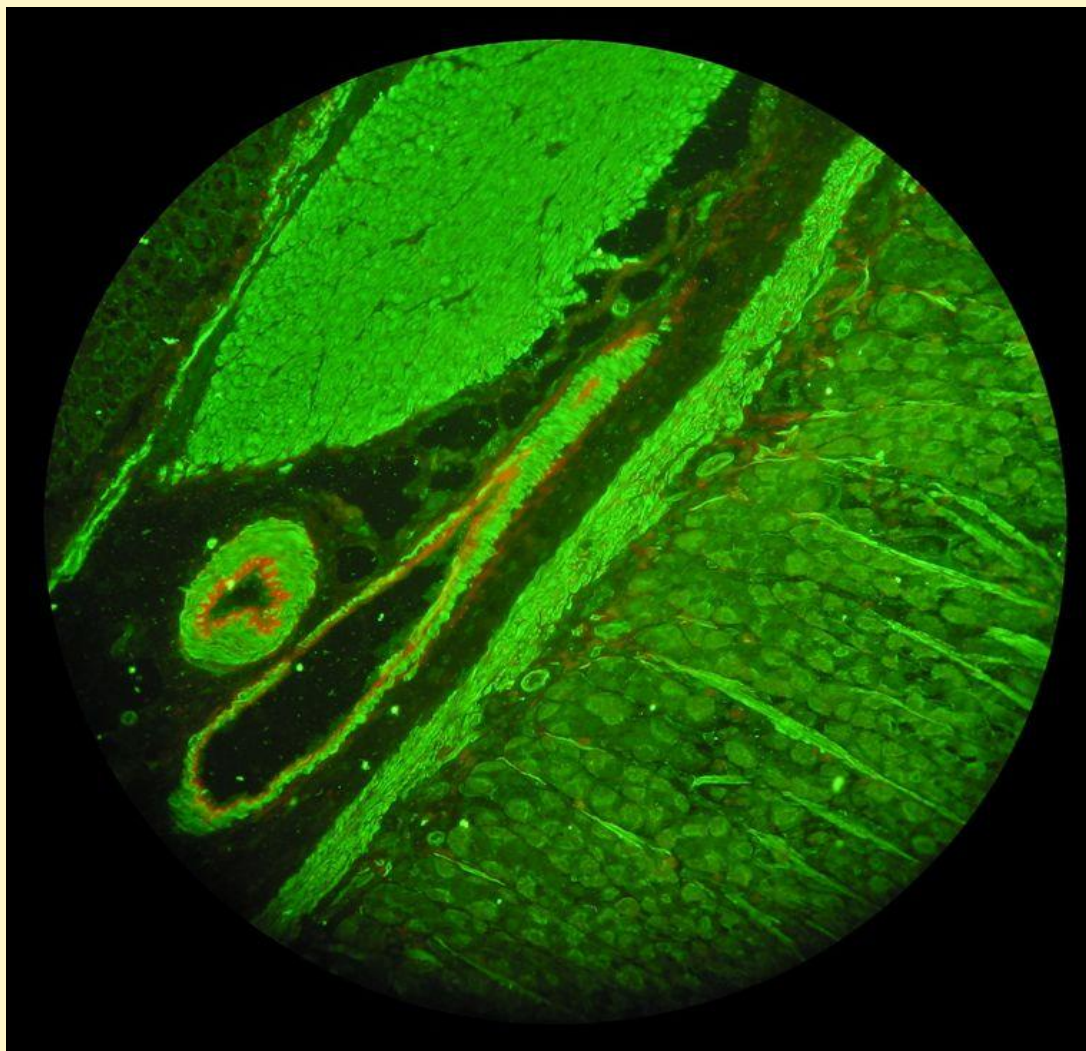
IMUNOFLUORESCENCE

Potkaní žaludek – GPC



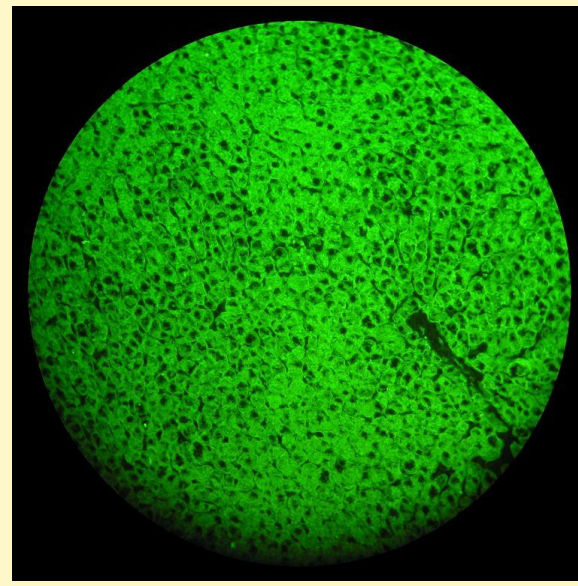
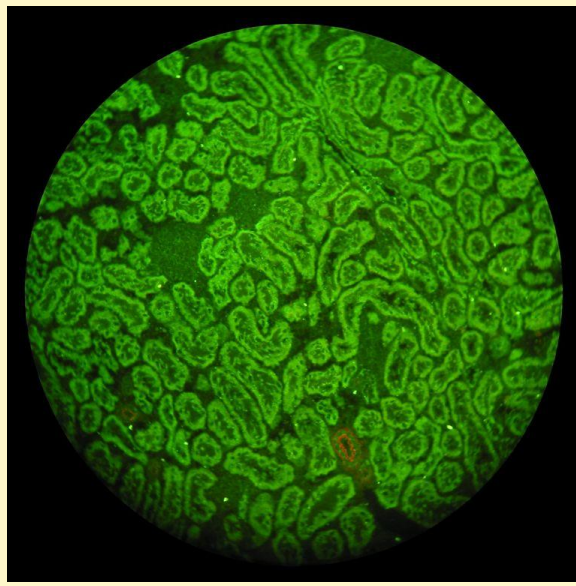
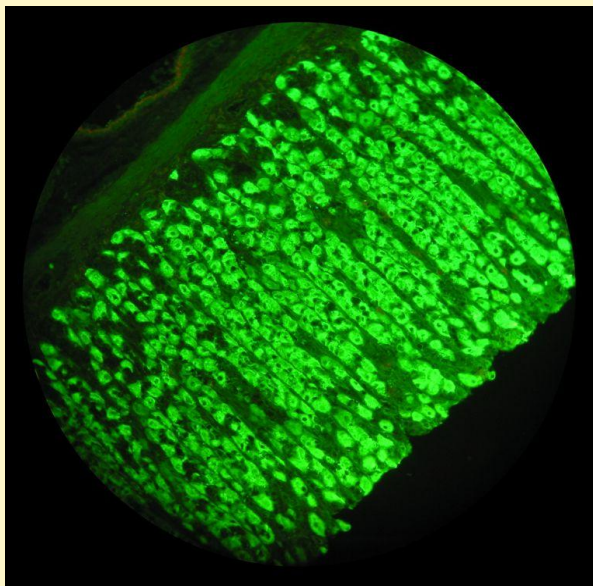
IMUNOFLUORESCENCE

Potkaní žaludek – ASMA



IMUNOFLUORESCENCE

AMA – potkaní žaludek, ledviny, játra



IMUNOFLUORESCENCE

RET – potkaní žaludek, ledviny, játra

