

Metoda: Nepřímá imunofluorescence

Studentka: Adéla Brzáková, 2. ročník - Zdravotní laborant

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Princip: Tato metoda je založená na vizualizaci reakce antigen - protilátka. Imunofluorescence se dělí na dva základní typy - přímá a nepřímá. U přímé imunofluorescence dochází k detekci antigenu a konjugát se váže přímo na antigen, zatím co u nepřímé imunofluorescence dochází k detekci protilátek, která probíhá ve dvou krocích - nejprve se protilátky z testovaného séra navážou na antigenní substrát a poté se na tyto protilátky váže konjugát (specifický k lidským imunoglobulinům - IgG, IgM, IgA). Konjugát je protilátka s navázaným fluorescenčním barvivem (fluorochromem). Nejčastěji používaný fluorochrom je FITC (fluoresceinizothiokyanát) - excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (emituje zelené světlo). U nepřímé imunofluorescence je konjugát specifický k lidským imunoglobulinům ve třídách IgG/IgM/IgA. Pro některá autoimunitní onemocnění má klinický význam výskyt autoprotiátek v určité izotypové třídě (např. celiakie - IgA). Jako antigenní substrát se při nepřímé imunofluorescenci nejčastěji využívají HEp2 buňky (Human Epithelial). Jedná se o rychle se dělící buňky, u kterých je v mitóze pozorovatelná chromatinová destička, která je důležitým znakem pro odlišení jednotlivých typů ANA.

Uplatnění metody: Metoda nepřímé imunofluorescence se využívá především k průkazu specifických protilátek, nejčastěji autoprotiátek. Autoprotiátky detekované nepřímou imunofluorescencí můžeme rozdělit na orgánově nespecifické (např. ANA - antinukleární, AMA - antimitochondriální,...) a orgánově specifické (např. GPC - proti parietálním buňkám žaludku,...). Uplatnění metody je tedy zejména při diagnostice autoimunitních chorob. Autoimunitní choroby jsou onemocnění, při kterém autoprotiátky nebo autoreaktivní T- lymfocyty reagují s endogenními antigeny a tím dochází k poškození vlastních buněk a tkání.

Úskalí metody: Tato metoda je zatížena velkou subjektivitou. Záleží na kvalitativním rozhodnutí odečítajícího laboratorního pracovníka, zda a jak preparát svítí. Odečítající musí dobře znát histologii příslušných tkání a buněk, aby se dokázal orientovat ve strukturách. Dalším úskalím u nepřímé imunofluorescence je faktor nespecifické fluorescence, která může být způsobena například špatným vymytím protilátek.

Přístrojové vybavení: Z přístrojového vybavení je k nepřímé imunofluorescenci nezbytný fluorescenční mikroskop. Mezi jeho hlavní součásti patří zdroj světla, kterým může být rtuťová výbojka, nebo LED dioda. Dalšími součástmi jsou excitační filtr, který propouští pouze část spektra potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu záření v oblasti emisní vlnové délky, které by vytvářelo pozadí a emisní (bariérový) filtr, který propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního záření.

Odběr a transport: Odebíraným materiálem je žilní krev (5 ml). Odebírá se do zkumavky se separačním gelem (Vacuette - červený uzávěr). Na přípravu pacienta před odběrem a ani na transport nejsou stanoveny žádné zvláštní požadavky.