

Metoda: Nepřímá imunofluorescence

Klára Mičkeová, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitel: Ing. Tomáš Vlas

Princip: Fluorescence je založena na absorpci záření o určité vlnové délce a emisi záření o delší vlnové délce (nižší energii). Emise přetrvává pouze po dobu, kdy je látka vystavena danému záření. V imunofluorescenci se používá fluorescenční mikroskop, jehož zdroj světla je halogenová žárovka nebo LED dioda (např. rtuťová výbojka). Systém excitačních filtrů a zrcadel vyčlení pouze požadovanou část světla, v tom-to případě modré záření. Vzorek modré záření absorbuje, fluorescenční látka přejde do stavu s vyšší energií a poté jí uvolní při následném přechodu na základní energetickou hladinu. Tímto dojde k emisi zeleného světla, které má nižší energii než modré záření.

Nepřímá imunofluorescence pracuje na základě vazby antigen-protilátka. Detekce protilátek probíhá ve dvou krocích. Nejprve se protilátky ze séra pacienta navážou na specifické antigeny v buněčné struktuře HEp-2 buňek, kterými jsou potaženy jamky na mikroskopickém sklíčku. Druhým krokem je odstranění nenavázaných protilátek promytím a přidáním konjugátu (protilátka proti lidským imunoglobulinům) značený fluorescenčním barvivem (tzv. fluorescein). Tato látka se naváže na vytvořené komplexy Ab-Ag. Poté musí proběhnout inkubace v temnu. Po inkubaci je možné odečítat na mikroskopu.

Tato metoda se věnuje především diagnostice autoimunitních onemocnění, onemocnění kůže a sledování průběhu léčby pacientů. Sérum pacienta se zředí, nanese na speciální mikroskopické sklíčko obsahující jamky potažené HEp-2 buňkami a přidá se konjugát s fluorescenční látkou. Mohou se ale použít i sklíčka potažené jinými buňkami. Další antigenní substrát může být prvok *Crithidia luciliae* (detekce dsDNA), neutrofilní granulocyty (ANCA), či zvířecí buňky (potkaní ledviny, opičí jícen). Každé mikroskopické sklíčko má 10 jamek. V pozitivním případě sledujeme pod fluorescenčním mikroskopem charakteristické zelené světlo o různé intenzitě. Pro správné porovnání se do jedné jamky nanese pozitivní kontrola a do další negativní kontrola. Dle použitého typu protilátky je zabrána daná struktura. Existuje mnoho typů fluorescence (zrnitá, homogenní, nukleární, centromerová ...), rozličné množství protilátek (antinukleární, proti cytoplazmě neutrofilů, antimitochondriální, ...). Určitý typ fluorescence je charakteristický pro daný typ autoimunitní choroby a intenzita záření poukazuje na závažnost choroby.

Uplatnění metody: Diagnostika autoimunitních a imunopatologických chorob, sledování průběhu léčby a závažnosti nemoci pacienta.

Úskalí metody: Subjektivita pozorování fluorescence. Nutná správně provedená inkubace (ve tmě) a dobrý oplach vzorku pro odstranění nenavázaných protilátek. Nelze provádět u ikterických, hemolytických a lipemických vzorků séra.

Přístrojové vybavení: Fluorescenční mikroskop s FITC systémem

Odběr a transport: Odběr krve do zkumavky Vacuette, na transport nejsou kladeny zvláštní požadavky. Vzorek séra je optimální ihned zpracovat, při laboratorní teplotě je stabilní 8 hodin, pro delší uchování se zmrazí na -20°C, nesmí se ale mrazit opakovaně.