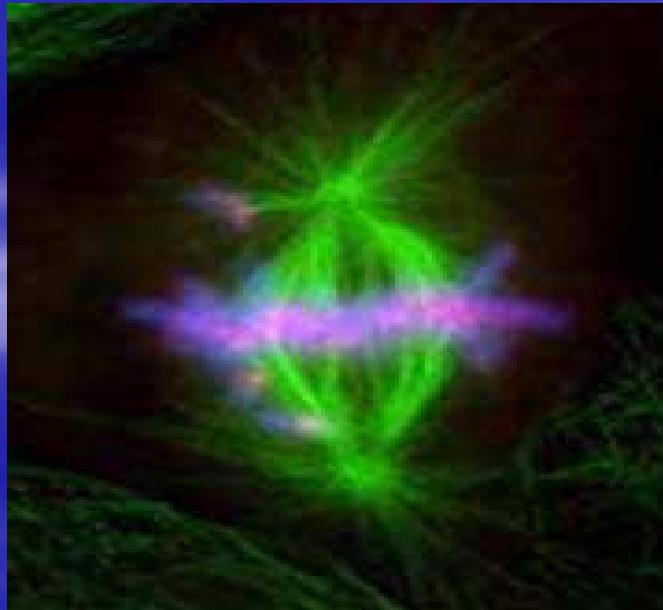


INMUNOFLUORESCENCIA



Que es la fluorescencia?

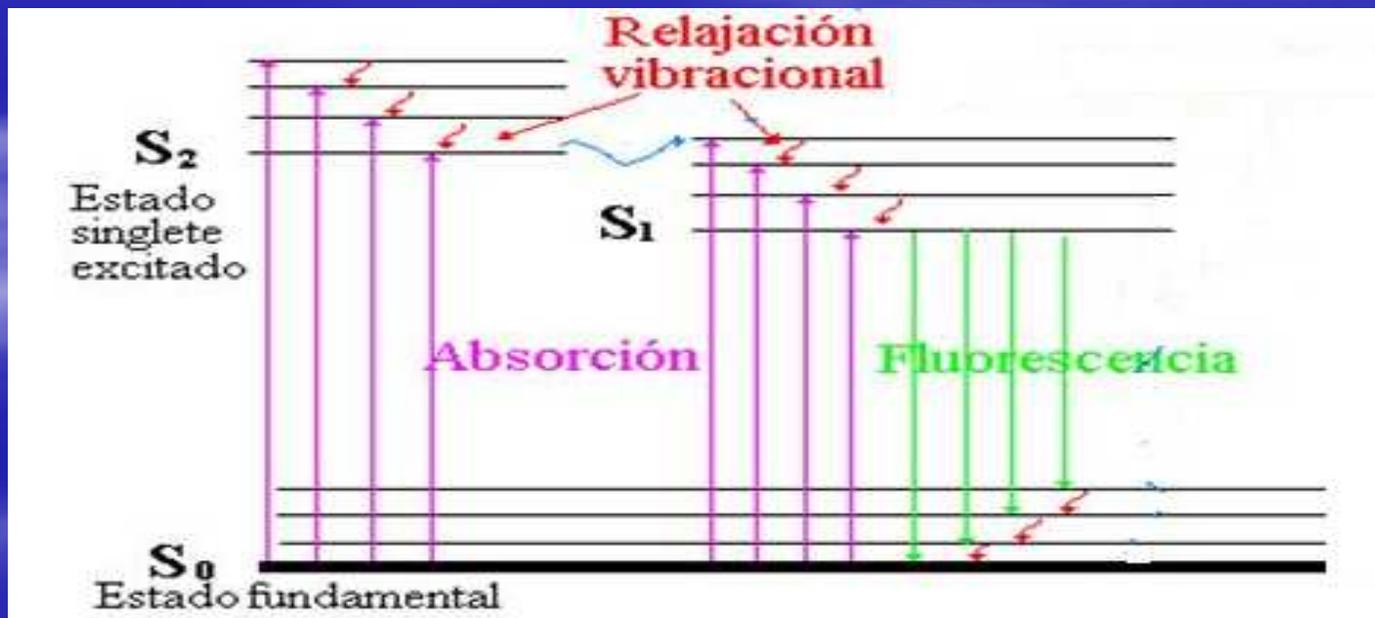
.....Es la propiedad de una sustancia de emitir luz cuando es expuesta a radiaciones de baja longitud de onda y alta energía (UV - Rx). Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo), son transformadas en luz visible, o sea de una longitud de onda mayor a la incidente.

Como se produce la fluorescencia?

La absorción de luz por parte de la molécula de fluorocromo la eleva a un estado de excitación en el cual contiene mayor energía.

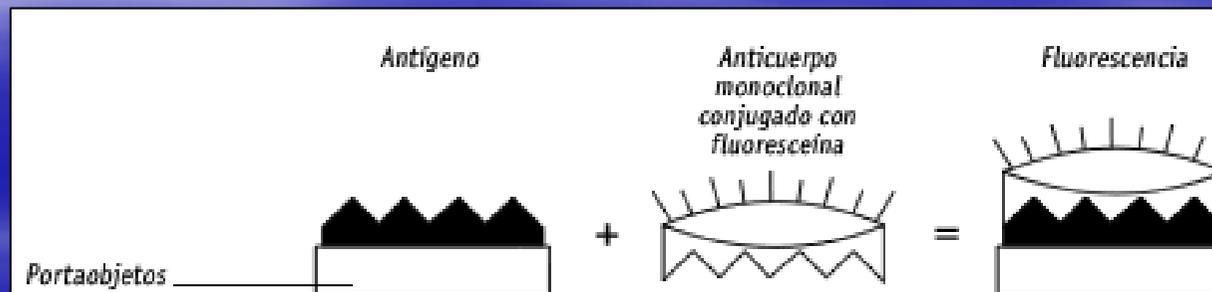
La molécula permanece en el estado de excitación por un período de tiempo muy corto.

El retorno a un nivel de energía menor es acompañado por emisión de luz (fluorescencia)



Inmunofluorescencia Directa

El procedimiento se realiza en **un paso básico** de reacción. La muestra clínica que presuntamente contiene antígenos del microorganismo bajo estudio es puesta en contacto con un anticuerpo monoclonal dirigido contra dicho microorganismo conjugado con fluoresceína. Si el antígeno esperado está presente se formará un complejo antígeno-anticuerpo. La reacción positiva en forma de fluorescencia verde manzana puede verse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.



Esquema de la técnica

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA



**CONJUGADO
FLUORESCENTE.**



Inmunofluorescencia Indirecta

Es una técnica de doble capa en donde se aplica el **anticuerpo sin marcar** directamente sobre el sustrato de tejido y se visualiza por tratamiento con un suero **anti-inmunoglobulina conjugado con fluorocromo**

El proceso consta de **dos etapas**:

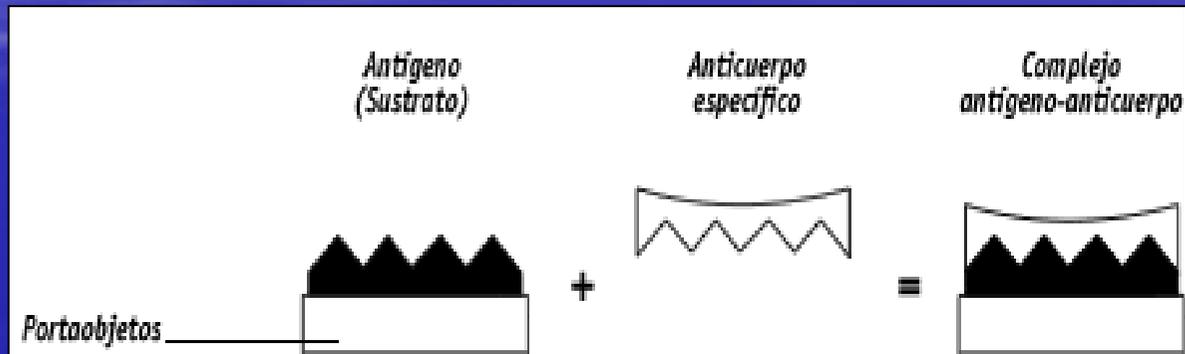
Primera etapa: se fijan sobre un portaobjetos los antígenos que constituyen el sustrato conocido específico (células que contiene virus, *T. gondii*, *T. pallidum*, etc.) sobre él se coloca el suero de quien se sospecha la presencia de anticuerpos específicos, si la reacción es positiva se dará formación de complejo antígeno-anticuerpo no visible ya que el anticuerpo no estaba marcado

Segunda etapa: se agrega una anti-inmunoglobulina humana **marcada**, que reaccionará con el anticuerpo del complejo producido en la primera etapa.

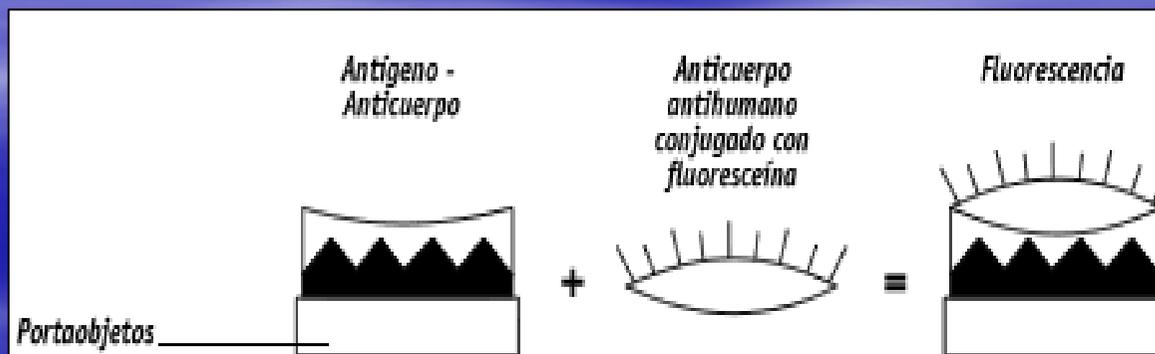
Inmunofluorescencia Indirecta

La técnica se realiza en dos etapas

PRIMERA ETAPA



SEGUNDA ETAPA



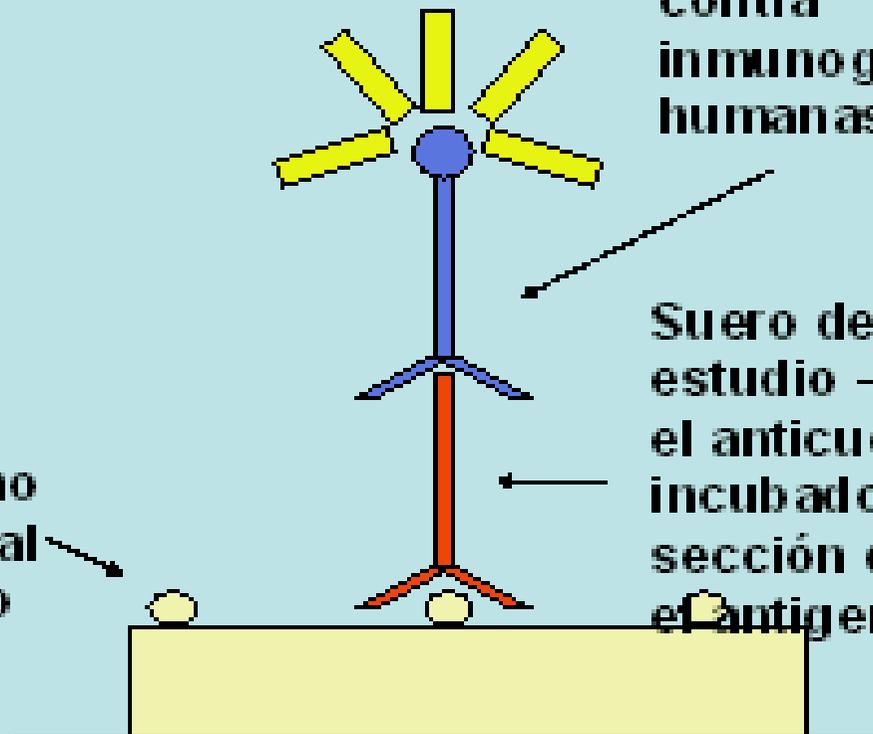
Inmunofluorescencia indirecta

Anticuerpo unido a fluoresceína dirigido contra inmunoglobulinas humanas

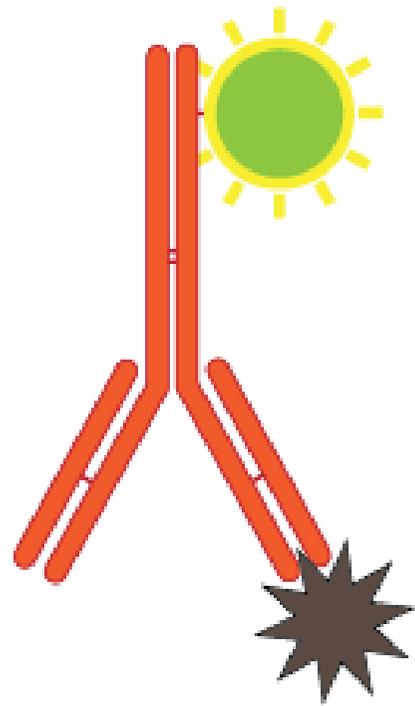
Antígeno similar al humano

Suero del paciente en estudio -conteniendo el anticuerpo- incubado con la sección que contiene el antígeno

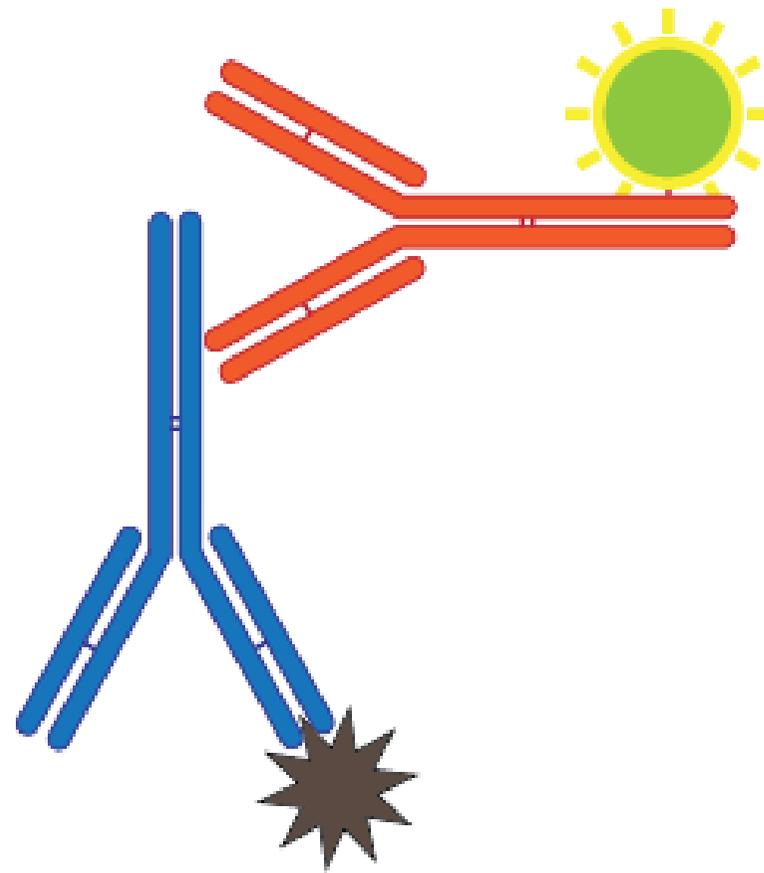
Substrato: tejido animal



Inmunofluorescencia



directa



indirecta

Microscopio de inmunofluorescencia

Fuente de luz (lámpara de mercurio)

Filtros

Espejo dicróico

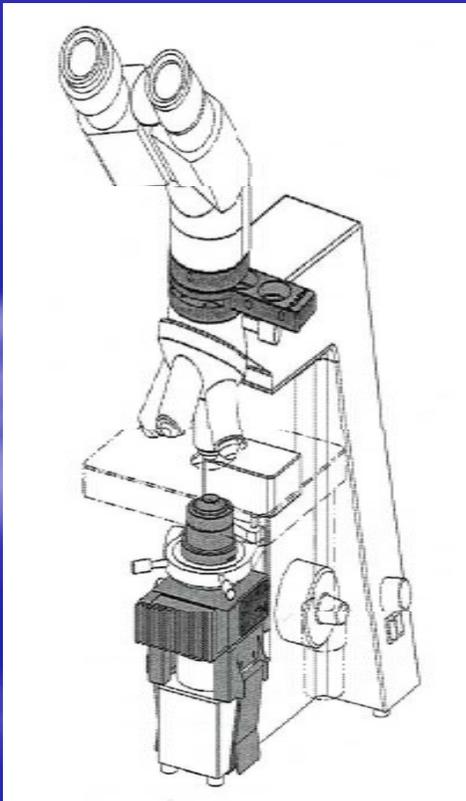
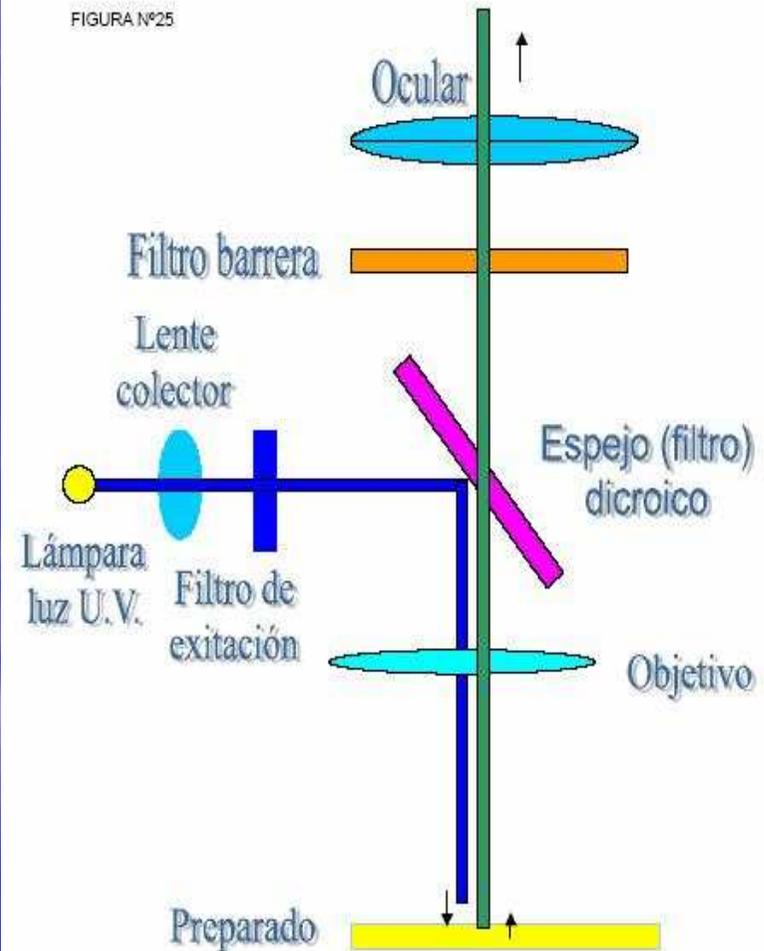
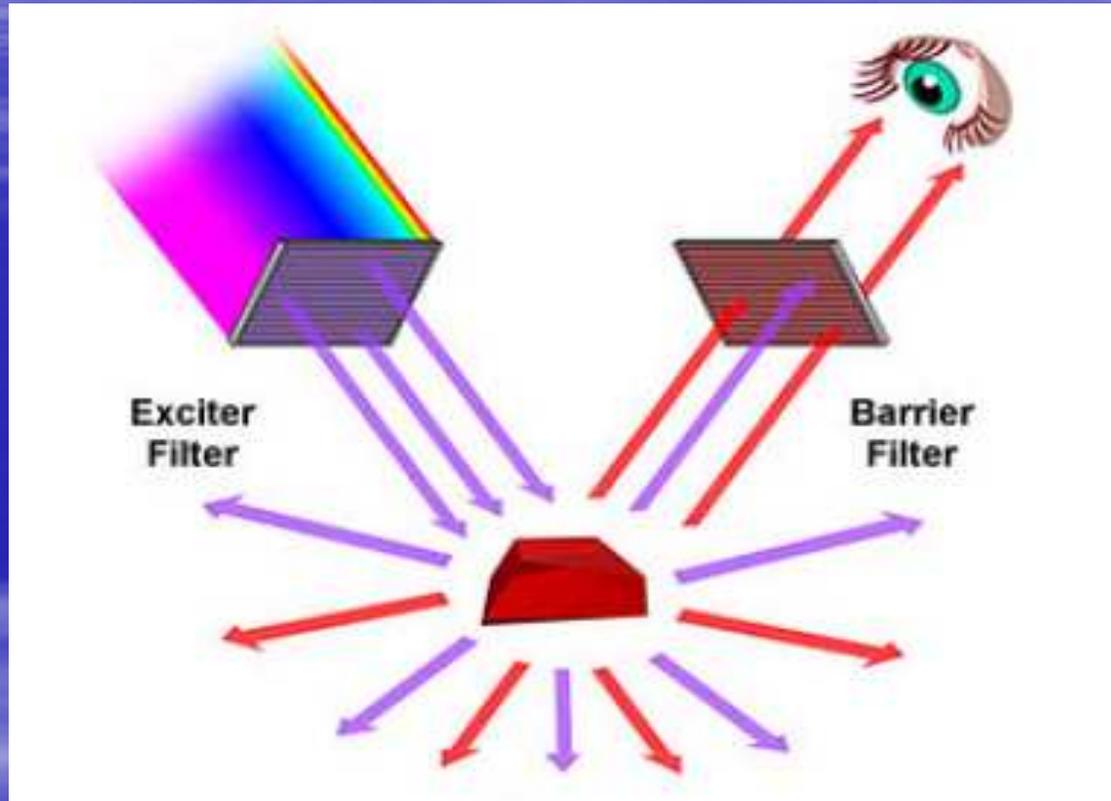


FIGURA Nº25

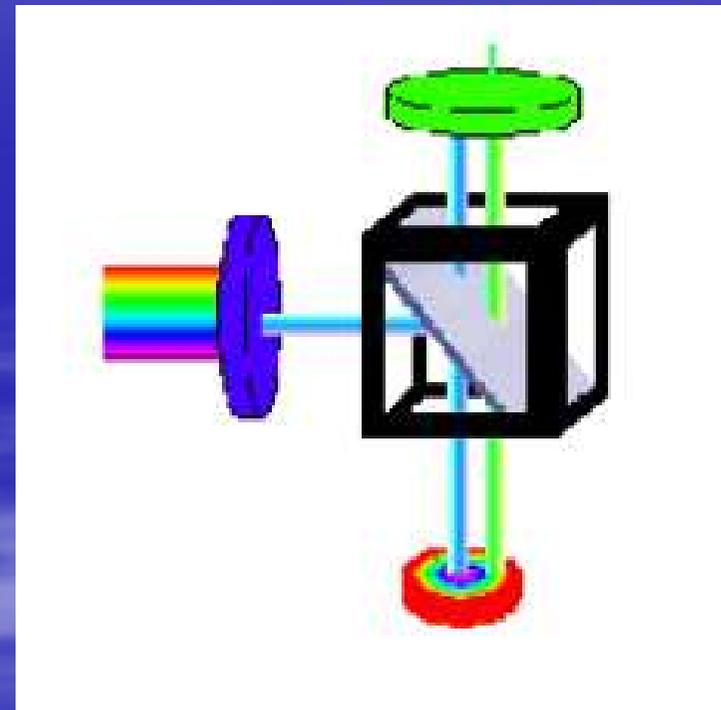


Excitación - Emisión



Tipos de filtros

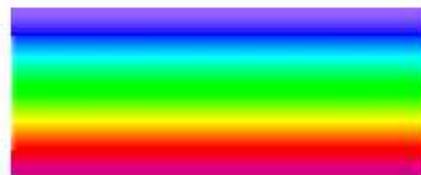
- **FILTRO EXCITACIÓN**
Selecciona el espectro de excitación
- **ESPEJO DICROICO**
Refleja la parte del espectro necesaria para la excitación y transmite el resto
- **FILTRO BARRERA**
Deja pasar la parte de la emisión de la muestra que nos interesa



I. La lámpara emite luz en todo el espectro



Lámpara

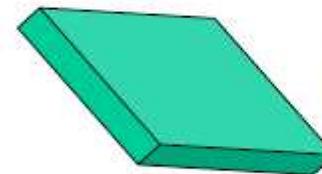


BP490

Filtro de excitación



Filtro de emisión

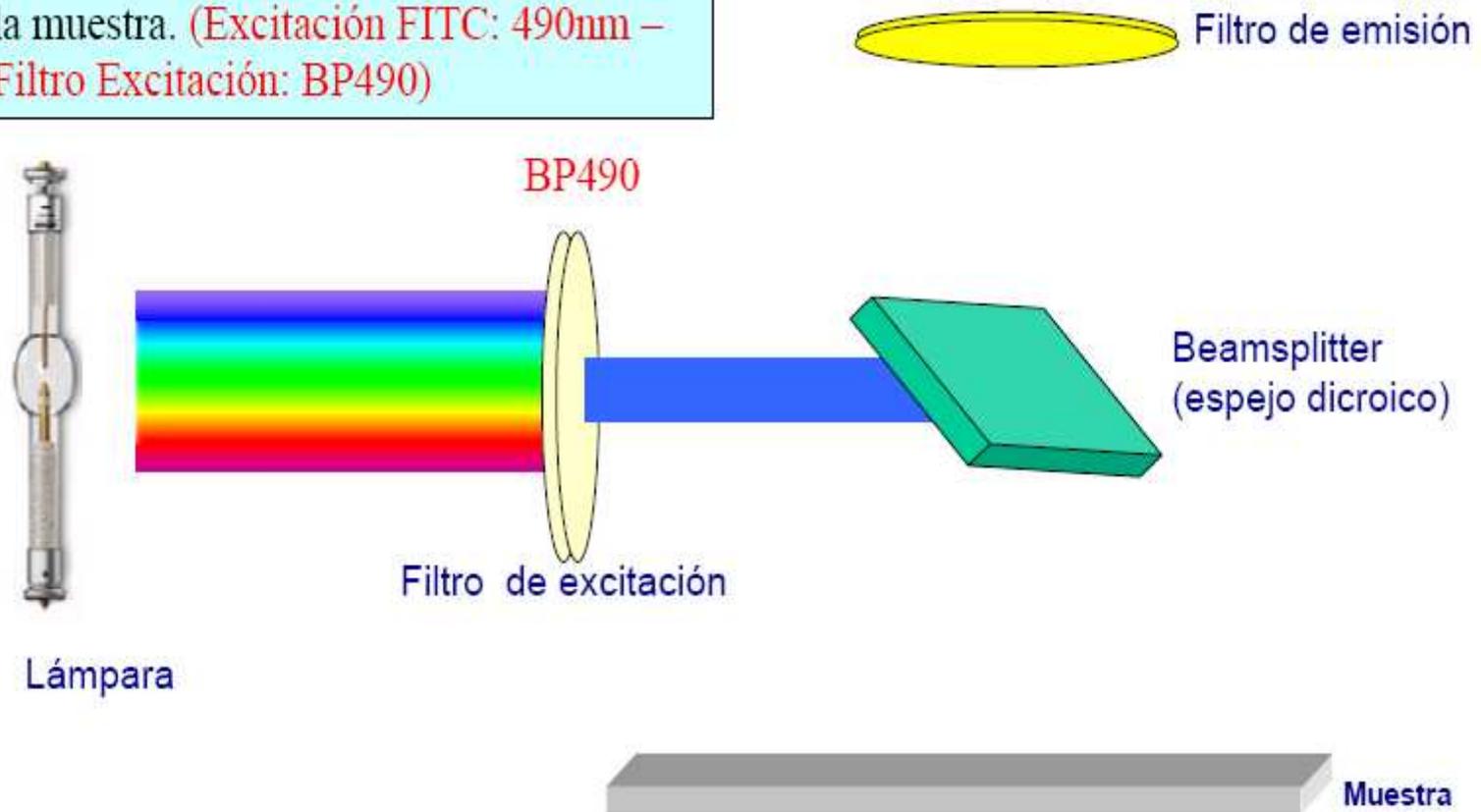


Beamsplitter
(espejo dicróico)

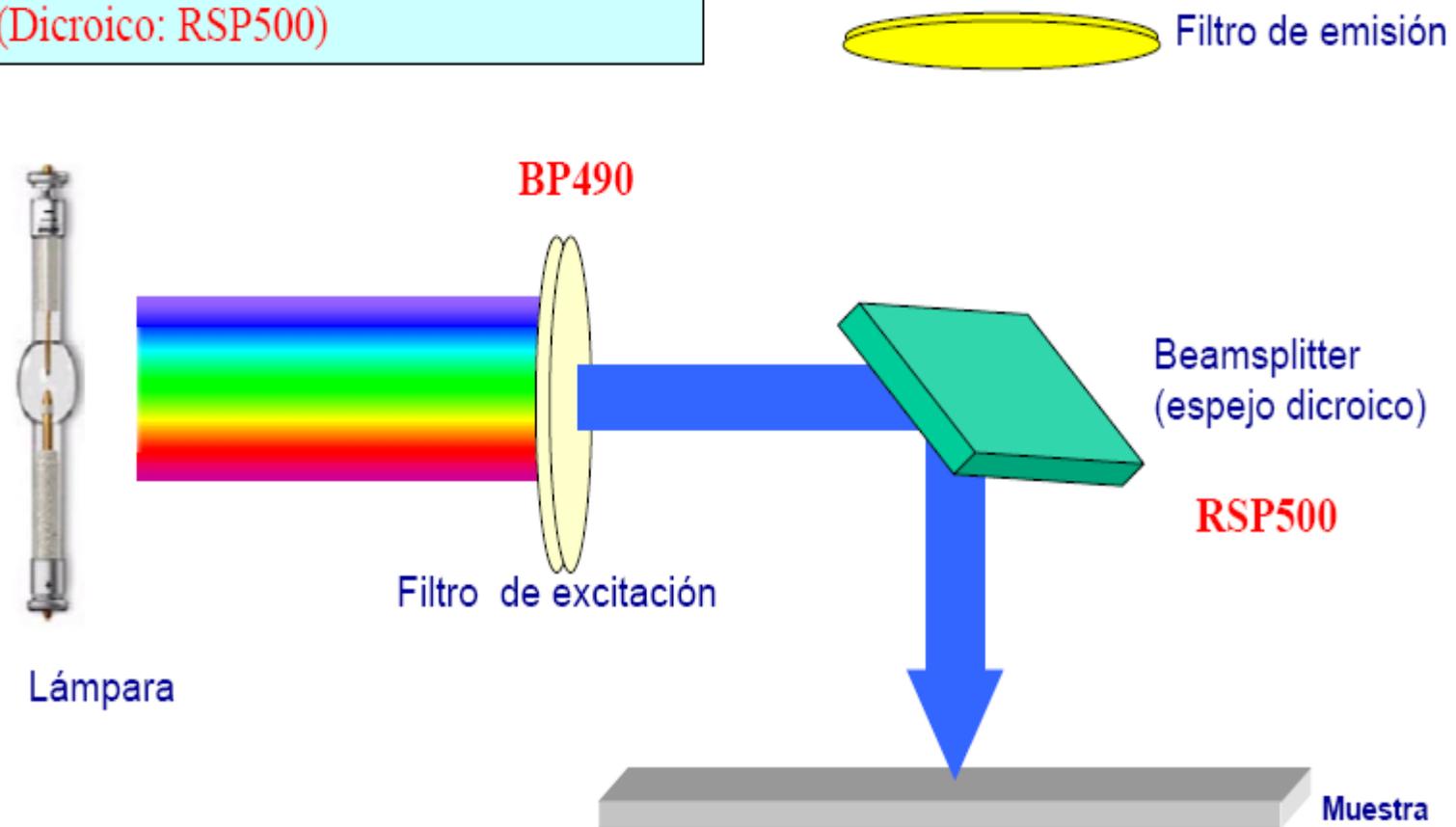


Muestra

II. El filtro de excitación solo deja pasar la parte del espectro necesaria para excitar la muestra. (Excitación FITC: 490nm – Filtro Excitación: BP490)



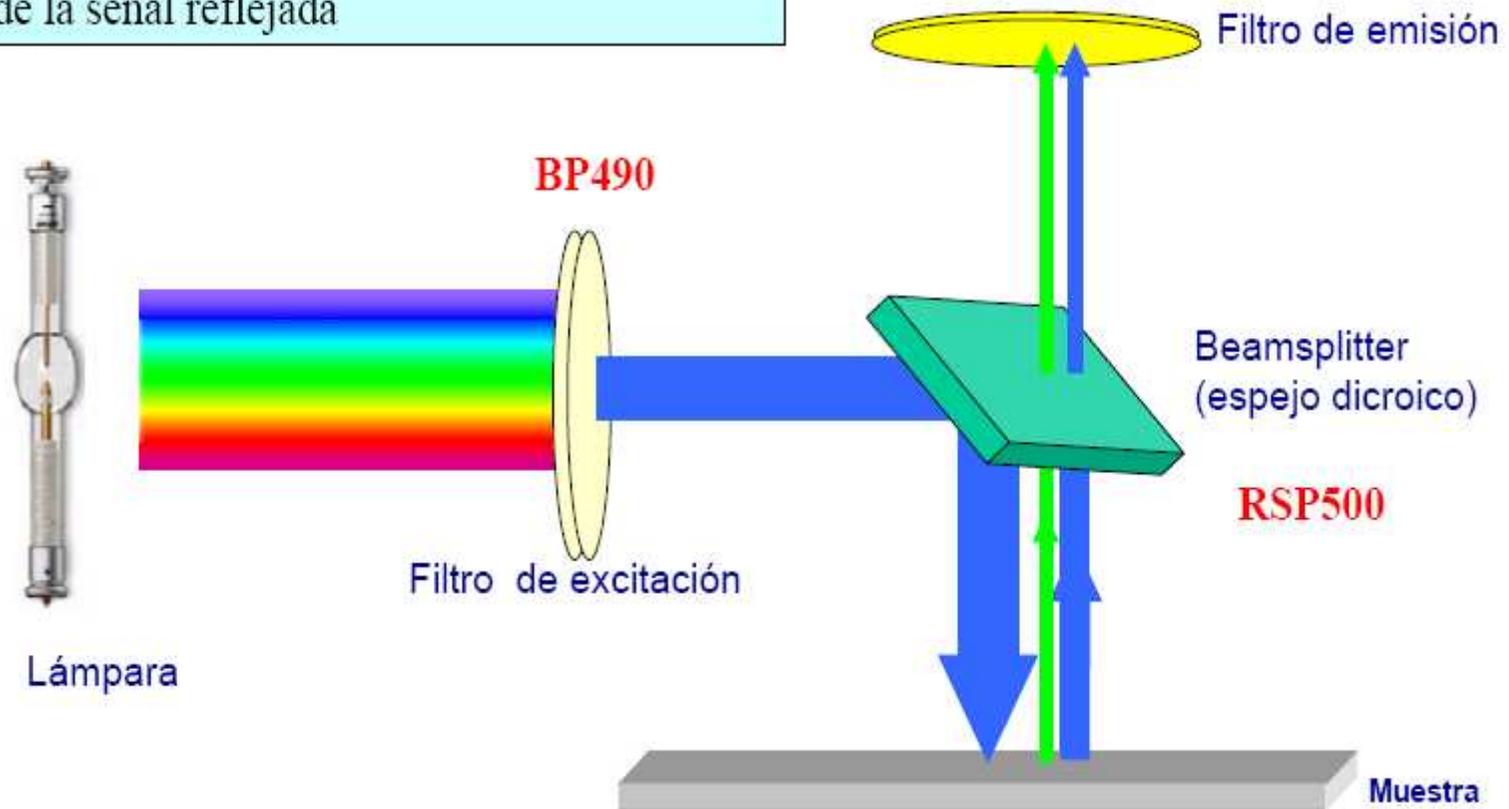
III. El espejo dicroico refleja hacia la muestra la excitación correspondiente.
(Dicroico: RSP500)



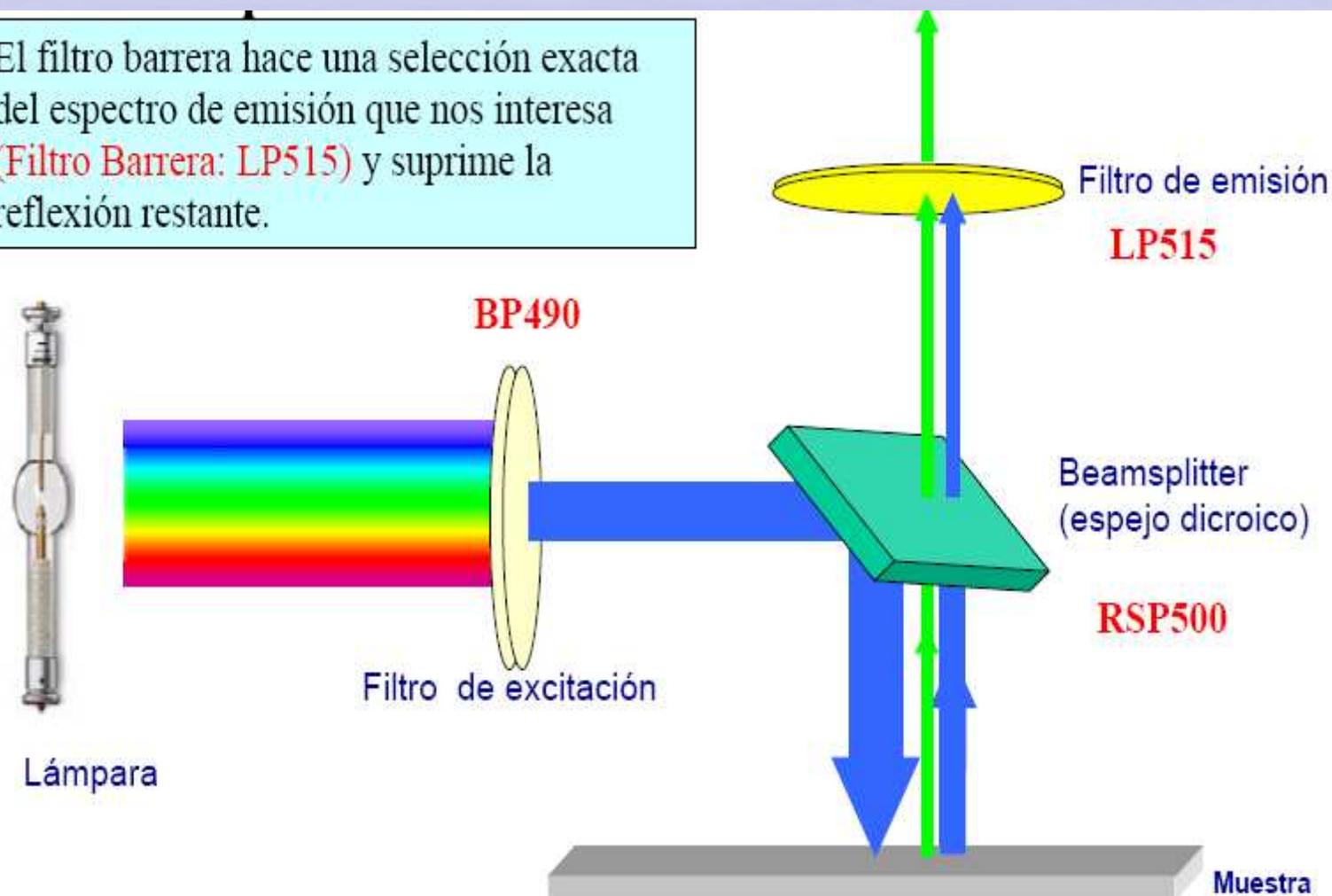
IV. La muestra se excita con la luz que le llega y emite en un espectro superior al de la excitación. (Emisión FITC: 520nm). También refleja parte de la excitación.



V. El espejo dicroico transmite la emisión de la muestra. (**Dicroico: RSP500**) y filtra parte de la señal reflejada



VI. El filtro barrera hace una selección exacta del espectro de emisión que nos interesa (**Filtro Barrera: LP515**) y suprime la reflexión restante.



Fluorocromos

Sustancias que emiten un fotón cuando son excitados por un fotón incidente.

Formen uniones con las proteínas (Ac) pero sin afectar los grupos de combinación específica del anticuerpo

La reacción de unión ocurre entre los grupos amino y carboxilo de la proteína y los grupos tiocianato o cloruro de sulfonilo de los colorantes

El pH afecta la fluorescencia y por esta razón se debe trabajar a pH estable y adecuado dependiendo del colorante : fluoresceína (pH 8), rodamina (pH 7),

DANS (pH 1.6-14)

Longitudes de onda de excitación y de emisión de algunos marcadores fluorescentes

| Fluoróforo | Excitación (nm) | Emisión (nm) |
|----------------------------|-----------------|--------------|
| <i>Fluoresceína</i> | 500 | 520 |
| <i>Indo-1</i> | 350 | 405/400 |
| <i>CFP</i> | 433/455 | 475/501 |
| <i>Naranja de Acridina</i> | 490 | 530/640 |
| <i>Calceína</i> | 495 | 520 |
| <i>Rodamina</i> | 500 | 540 |
| <i>Verde de Calcio</i> | 506 | 526 |
| <i>Azul de Evans</i> | 550 | 625 |

PARÁMETROS DE FLUORESCENCIA

Afinidad

Selectividad

Especificidad

Intensidad (brillo)

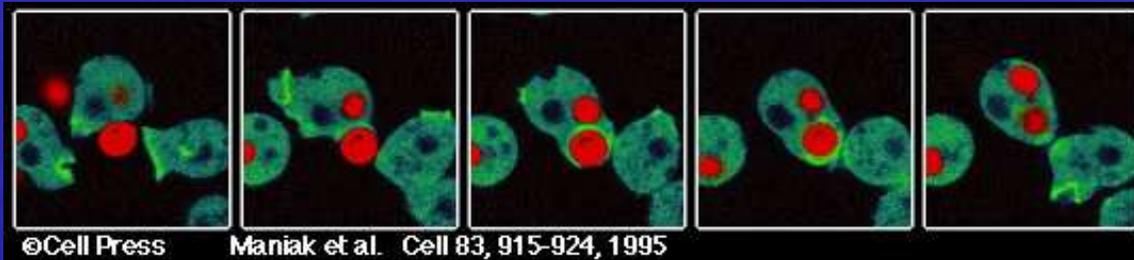
Estabilidad

Competitividad

Ventajas y desventajas

VENTAJAS

- Se pueden obtener resultados rápidos.
- No es necesario realizar cultivos.
- Se puede identificar microorganismos específicos en un grupo mixto.
- Determina la identidad de un organismo muerto. Es sensible.



DESVENTAJAS

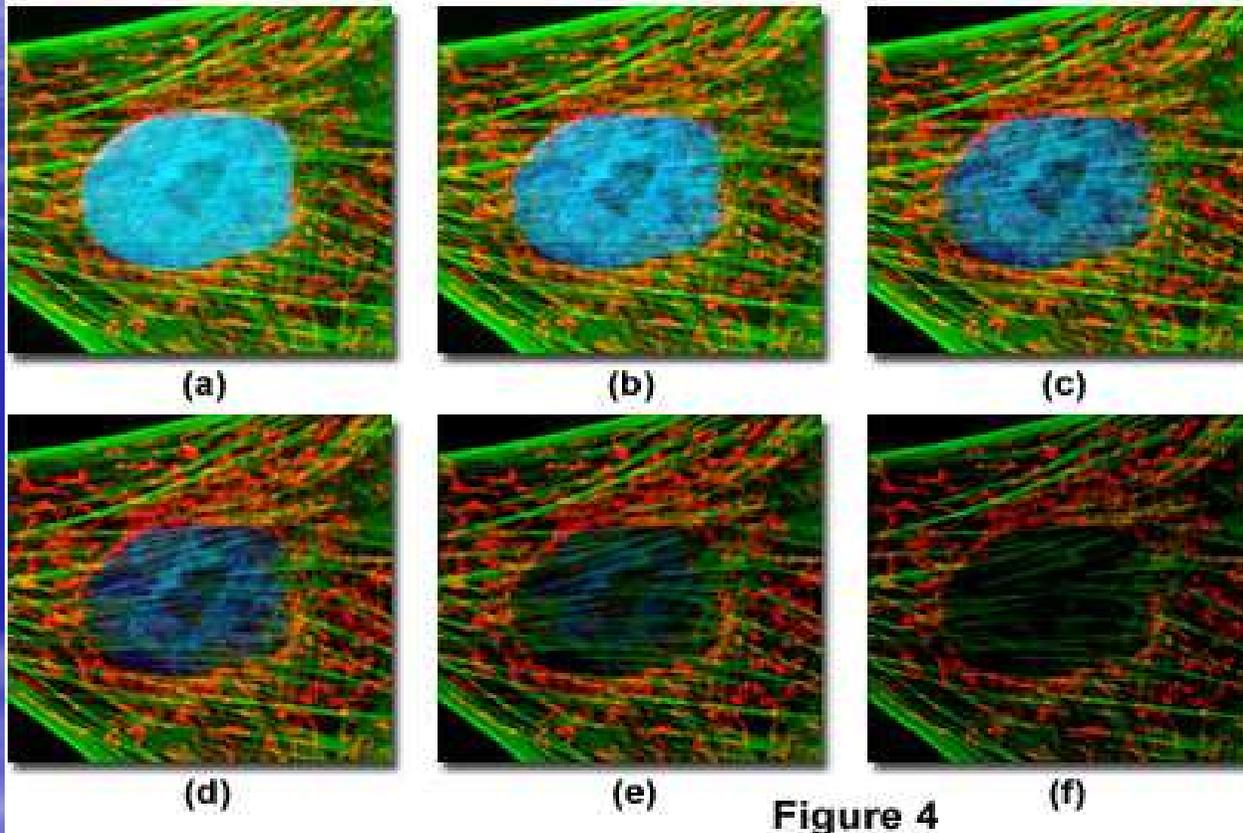
- Costos en reactivo y equipo
- Debe ser realizado por personal muy especializado.
- Los resultados no son 100% específicos



Photobleaching

- Es la disminución de la intensidad de emisión de la muestra debido a la descomposición irreversible de la fluorescencia de las moléculas.
- Este fenómeno está directamente relacionado con la intensidad de excitación y con el tiempo durante el cual estamos excitando la muestra.
- Para reducir este efecto podemos utilizar "anti fading" (glicerina) en la preparación de la muestra.

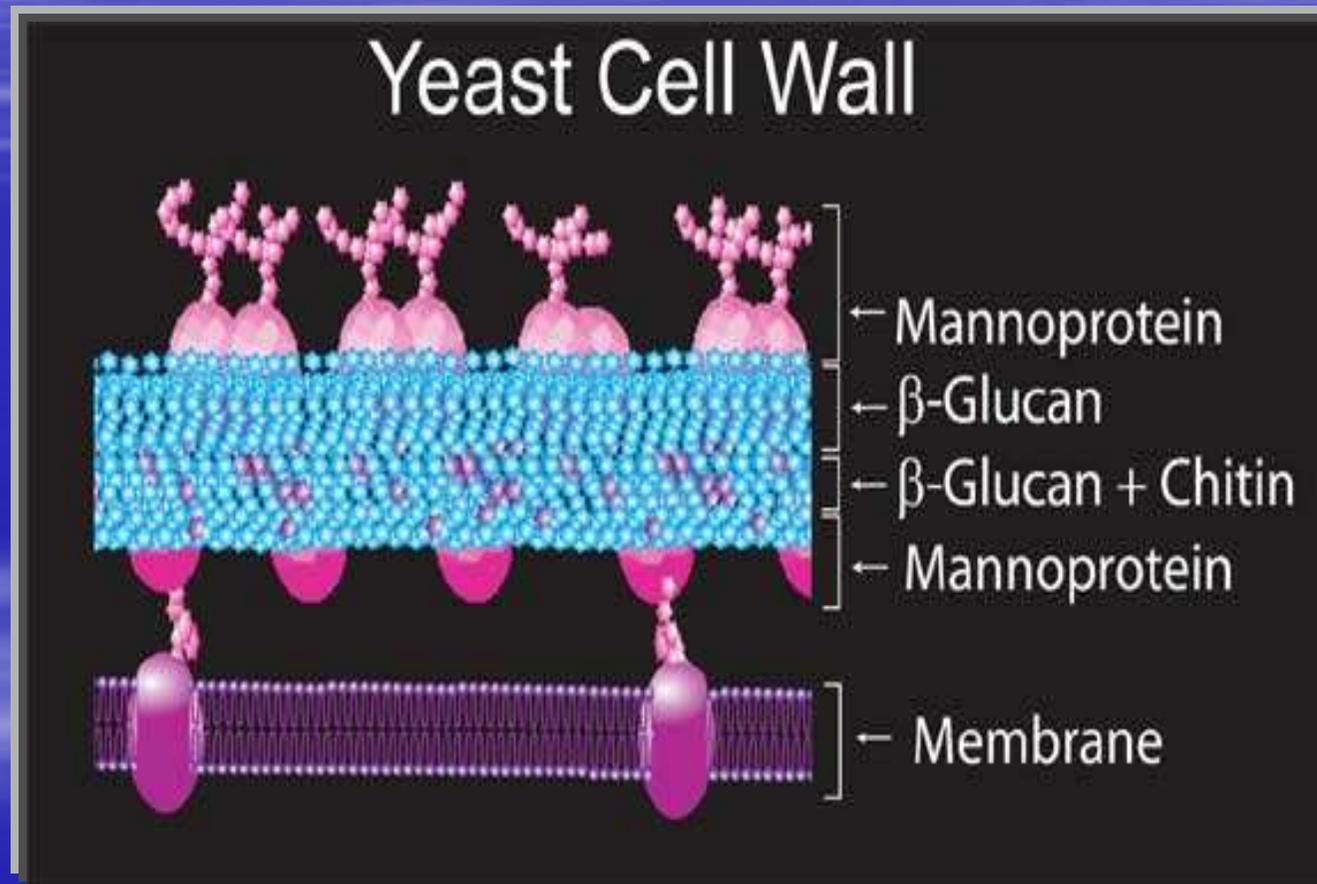
Photobleaching Rates in Multiply Stained Specimens



Detección de Anticuerpos Anti-Cándidas por Inmunofluorescencia

- 1 - Colocar 10 μ l de una suspensión de 10^6 cándidas en cada well de un portaobjeto de 7 wells. Dejar secar.
- 2 - Agregar 20 μ l de suero diluído 1/16- 1/32- 1/ 64- 1/128- 1/256- 1/512- negativo en cada well. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 3- Lavar 5 minutos con PBS. (Repetir 2 veces). Secar los bordes.
- 4- Agregar 20 μ l de suero anti Fc- FITC (dilución 1/100). Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad en cámara húmeda.
- 5- Lavar 5 minutos con PBS. (Repetir 2 veces). Secar los bordes.
- 6- Montar con 1 gota de glicerina bufferada.
- 7- Observar en microscopio de Inmunofluorescencia. La imagen es positiva si permite ver fluorescente el contorno de la levadura.

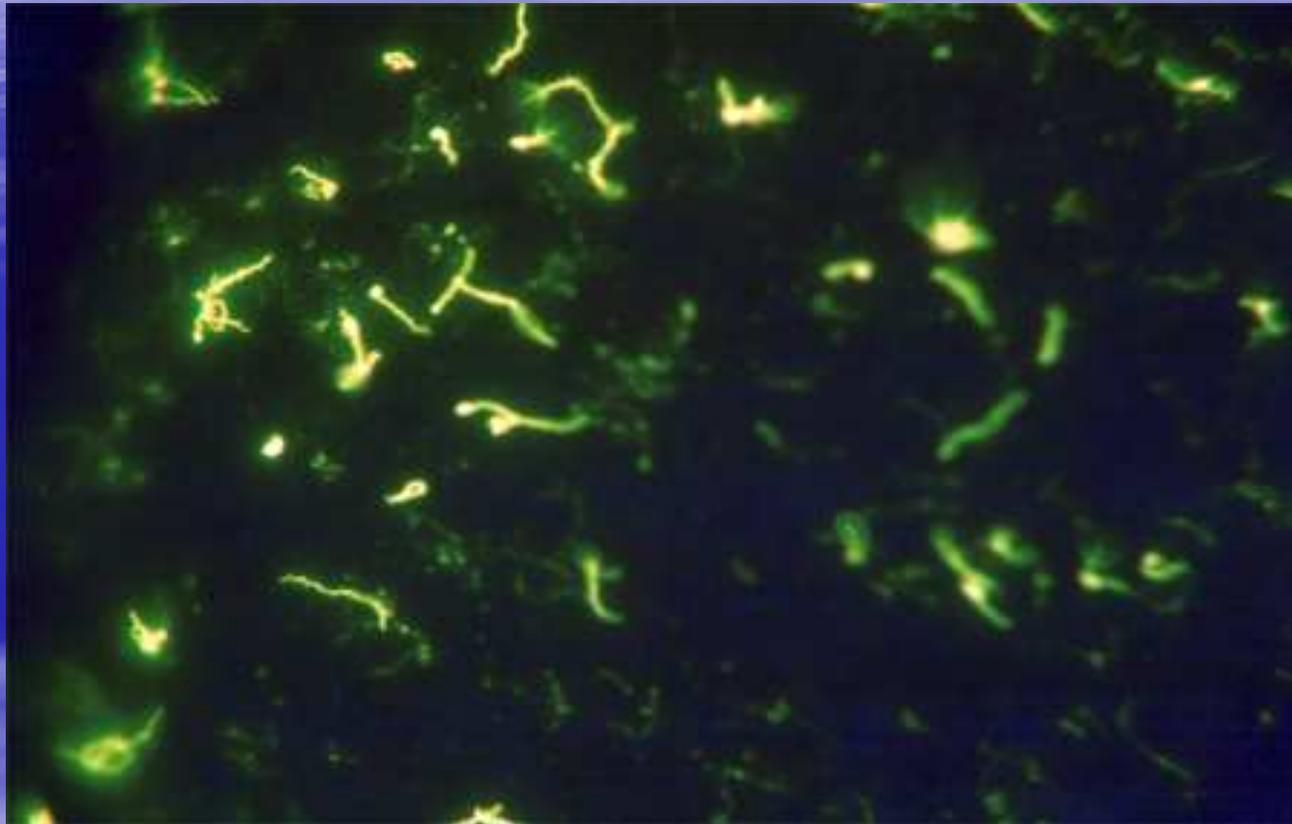
Para recordar.....



APLICACIONES

- Técnicas analíticas (cuali-y cuantitativas) en Química y Bioquímica.
- Métodos inmunológicos de diagnóstico médico.
- Procedimientos microscópicos en Microbiología, Genética, Histología, Histoquímica, Biología Celular, Biología Molecular, Biología del Desarrollo, Patología (sondas vitales, ensayos de viabilidad, indicadores, inmunofluorescencia, FISH).
- Análisis poblacional de células (citofluorimetría de flujo).

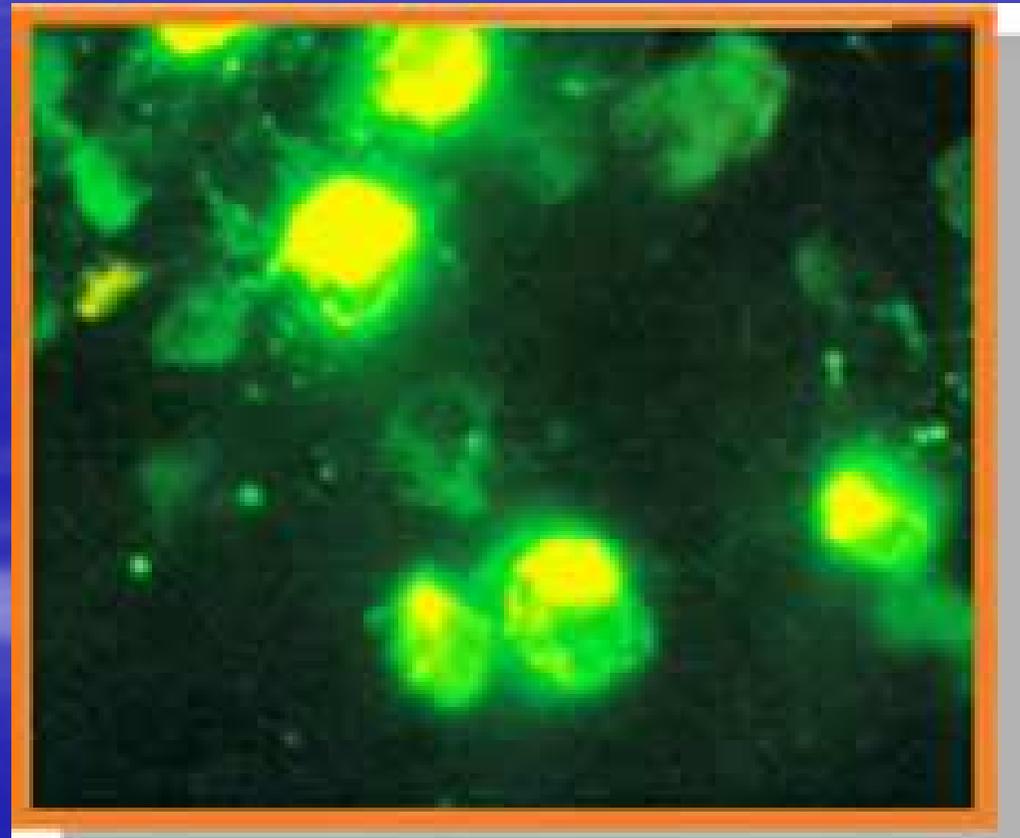
APLICACIONES



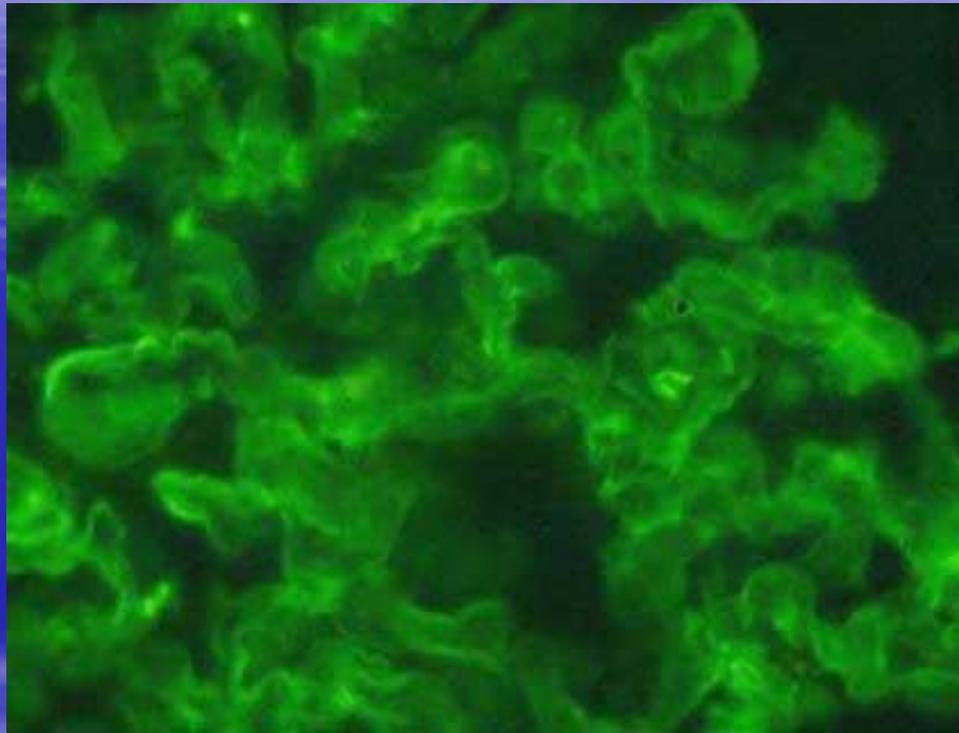
Treponema Pallidum agente etiológico de la Sífilis. Determinación por inmunofluorescencia donde se observa la forma de espiroqueta

Dengue

- Las células fluorescentes representan células infectadas con el virus dengue. Infección evidenciada con anticuerpos monoclonales para cada serotipo.

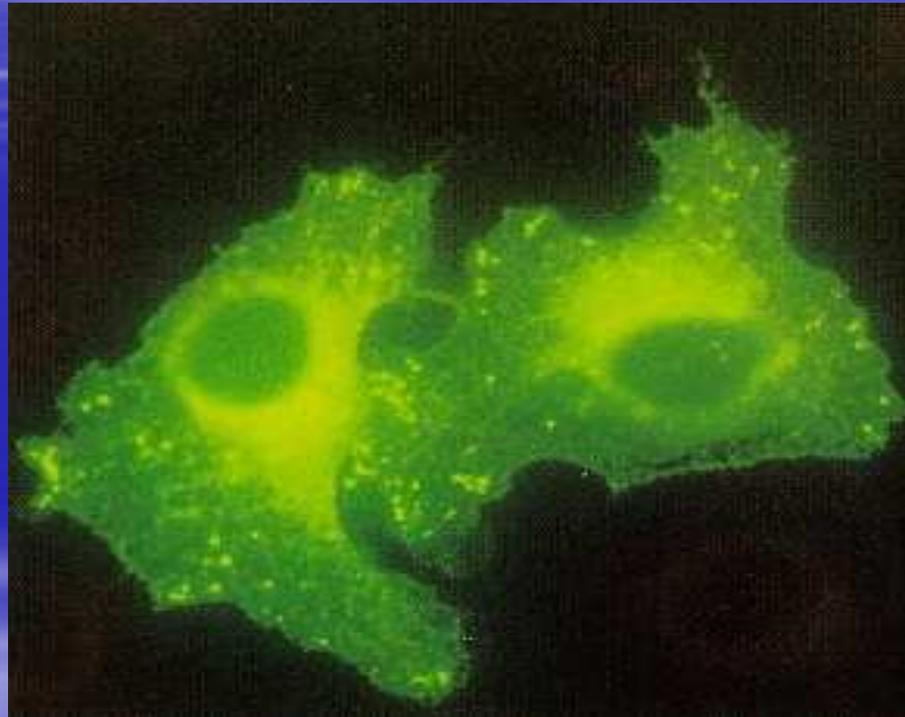


Biopsias renales :



Anticuerpos contra Membrana basal glomerular de tipo IgG

Virus Respiratorios



Virus Influenza B (IFD detección de antígeno)

Serotipificación

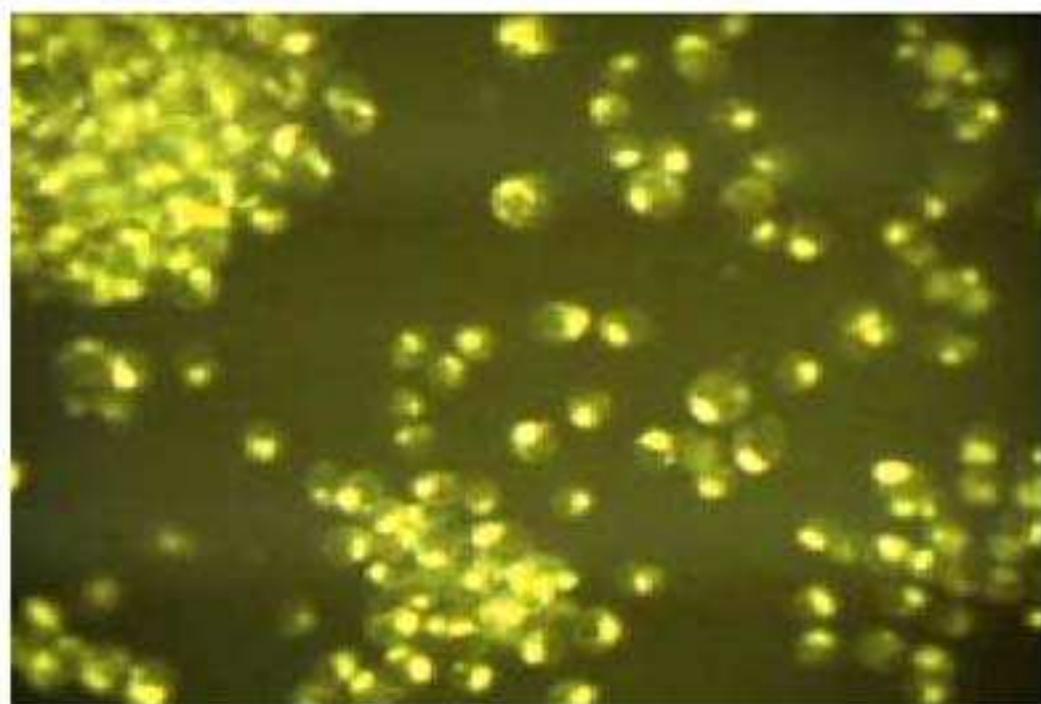
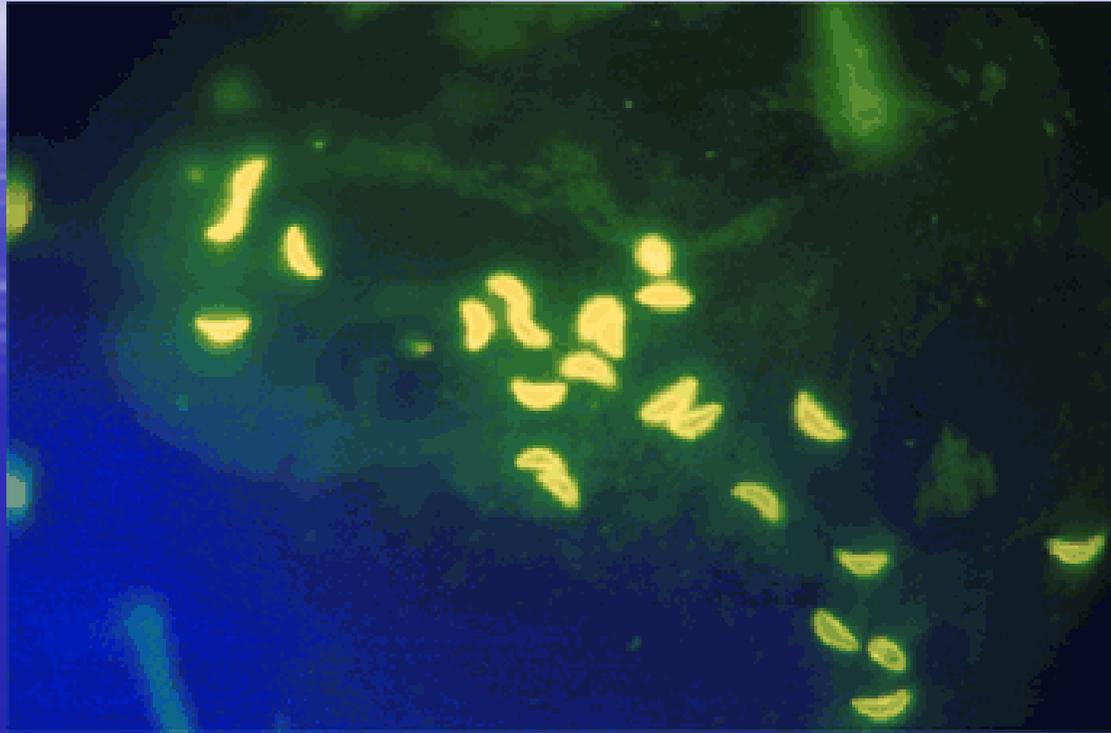
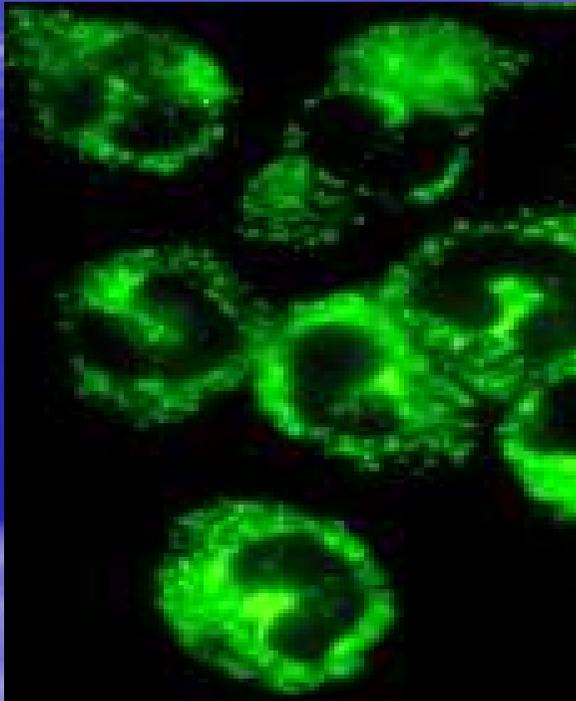


Figura 2. Tipificación del virus dengue por IFI

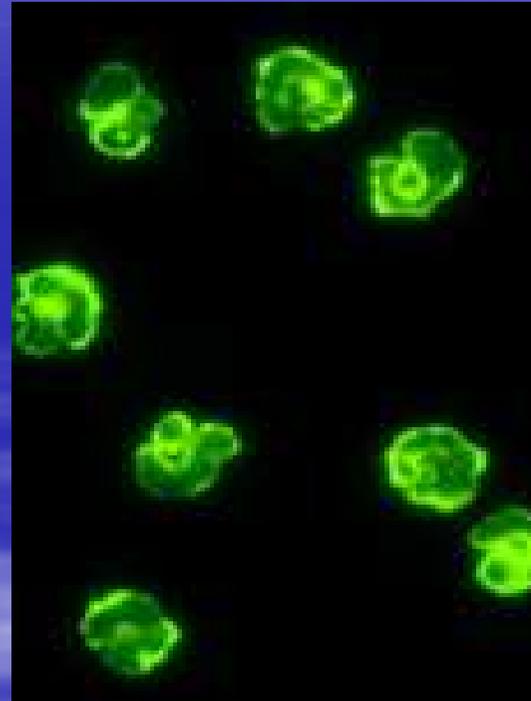


Anticuerpos anti *Toxoplasma gondii*, agente etiológico de la toxoplasmosis. El sustrato antigénico utilizado es una suspensión de *Toxoplasma gondii*. Detecta antígenos de membrana .

ANCA C



ANCA P



Fluorescencia utilizando mas de un fluorocromo

