

# IMMUN FLORESAN TESTİ

Prof.Dr. Yılmaz Akça

Prof.Dr. Feray Alkan

Prof.Dr. Aykut Özkul

Prof.Dr. Seval Bilge-Dağalp

Prof.Dr. M. Taner Karaoğlu

Prof.Dr. Tuba Çiğdem Oğuzoğlu

- Tanım: Floresan bileşikleri ile işaretli antikorlar kullanılarak , şüpheli materyalde bulunan etken (ya da Ag) ya da bunlara karşı oluşmuş antikor varlığının araştırıldığı, immunositokimyasal bir yöntemdir.

# Kullanım Amaçları

- Marazi madde inokule edilen hücrelerde antijen tesbiti
- Doğal enfekte hücrelerde antijen tesbiti (nasal epitel, sperma )
- Patolojik materyalde antijen tesbiti
- Antikor tesbiti
- Diğer alanlar (virus titrasyonu, histoloji,vb)

# IF testi uygulaması için,

➤ Hücre kültürü

➤ Konjugat

➤ Virus (Bilinen yada şüpheli)

➤ Serum (bilinen veya şüpheli- Direkt IF hariç)

➤ Floresan mikroskop

Konjugat: Floresan bileşikleri ile işaretli antikor.  
( işaretleyici madde + Antikor)

## ➤İşaretleyici madde

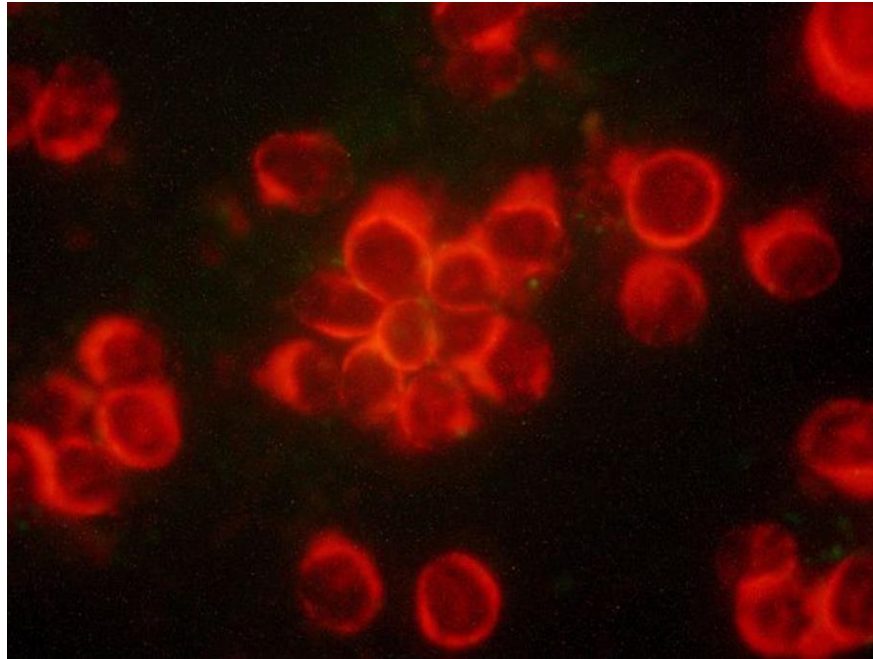
➤ Floresan bileşikleri; floresan ışık altında renkli parıldaama oluşturan maddelerdir.

➤En önemli işaretleyiciler rodamin ve florescein derivelidir.

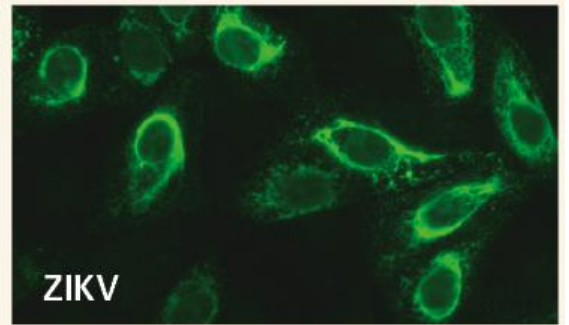
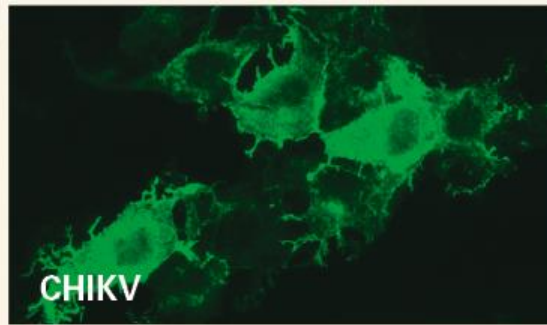
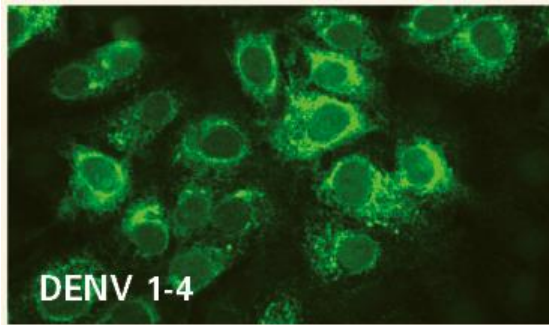
➤ Rhodamin bileşikleri: Kırmızı parıldaama  
TMRTC:tetra methyl rodamin thiocyanat)

➤ Florescein bileşikleri : Sarı-yeşil ışıldaama (FITC:  
florescein isothiosiyanat)

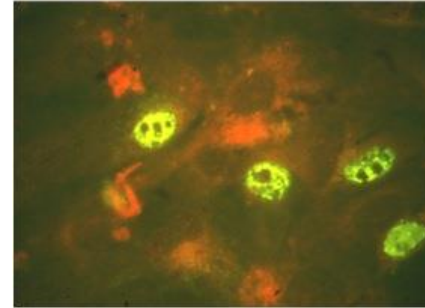
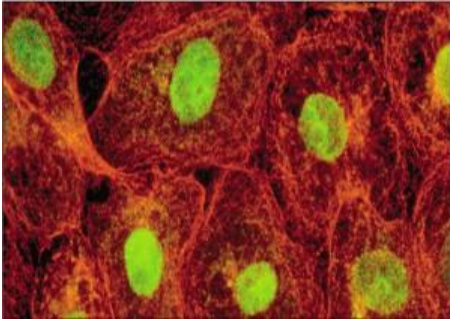
Immunofluorescence assay (IFA):  
SARS-CoV-infected Vero cells  
incubated with negative control  
serum. (Source: Institute for  
Medical Virology, Director: W. Doerr)



[http://www.sarsreference.com/archive/verocells\\_controlserum.jpg](http://www.sarsreference.com/archive/verocells_controlserum.jpg)



<http://www.zika-diagnostics.com/>



<http://www.virology.ws/2010/09/30/detectin> Nuclear immunofluorescence of Crandell feline kidney (CrFK) line cells infected with feline panleukopenia virus; not absence of viral antigen in the cytoplasm. Not every cell is infected - the shadow of a nucleus is visible ©Nicola Decaro





# Konjugatın yapısındaki antikor

➤ **Tesbiti amaçlanan etken için spesifiktir**

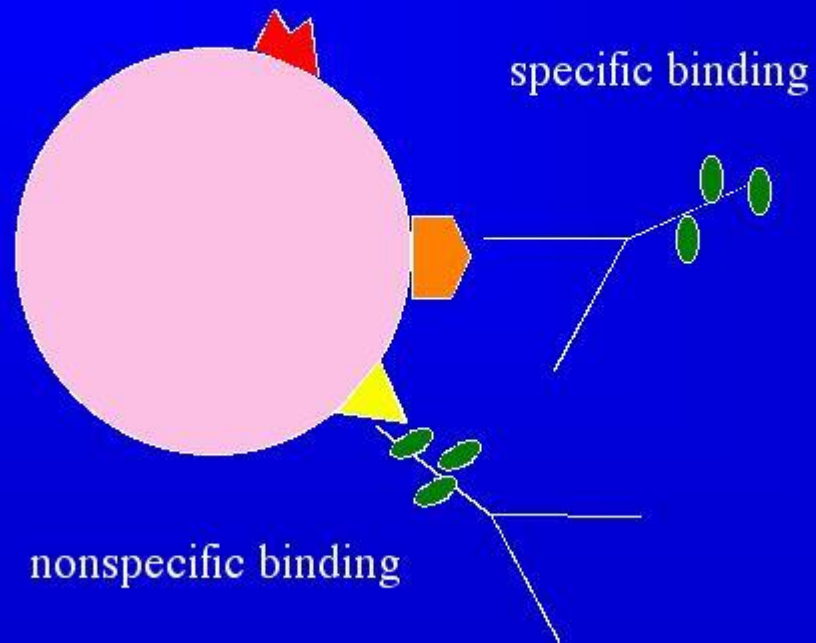
(Örneğin IF testi “A” antijenin varlığını araştırmak için yapılıyor ise antikor “A”antijenine karşı oluşmuştur)

➤ **Primer antikora spesifiktir.**

➤ (Örneğin sığır serumunda bir antikor varlığı arınıyor ise, anti-sığır Ig G’ler konjugatın yapısında bulunur)

➤ Direkt IF ve NIF testinde konjugat antijene karşı, indirekt IF testinde ise primer antikora karşı hazırlanmıştır.

# Immunofluorescence staining



Data from Dr. Carleton Stewart

## Test Yöntemleri

➤ Direkt IF testi (Ag tesbiti için)



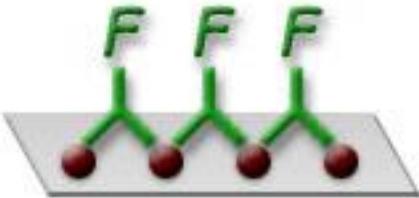
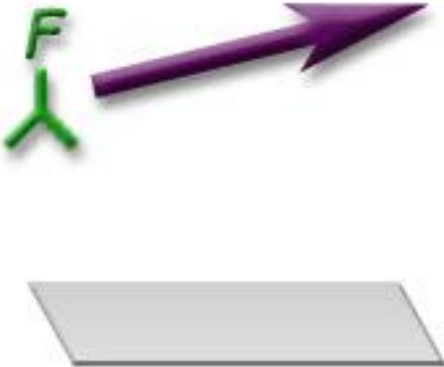

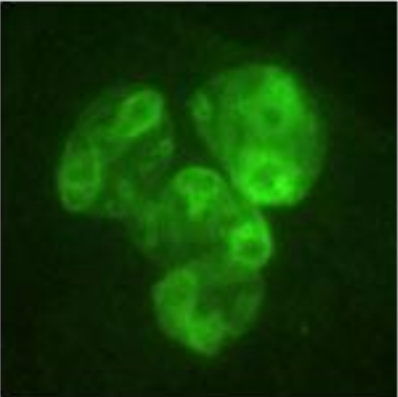
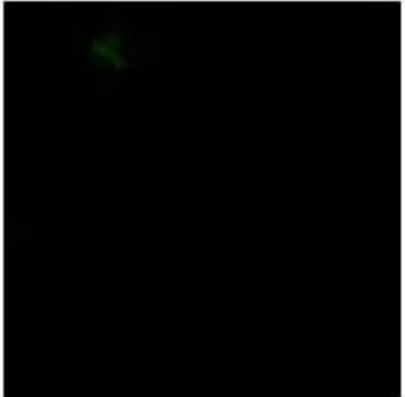
➤ İndirekt IF testi ( Ag ya da Ab tesbiti için)

➤ Nötralizasyon IF testi (Ab tesbiti için)

## Direkt IF testi:

- Monolayer olarak üretilmiş hücre kültürlerine şüpheli materyalden inokulasyon yapılır.
- Uygun inkubasyon süresini (24-72 saat) takiben hücre yüzeyleri yıkanır.
- Ortama konjugat ilave edilir. Inkubasyondan sonra (genellikle 1 saat) hücre yüzeyleri yeniden yıkanır ve hücreler **floresan mikroskopta** kontrol edilir.
- Not: Inkubasyon ortamı: 37°C'de %5CO<sub>2</sub>'li etüv

# Immunofluorescence Assay (IFA) or Fluorescent Antibody (FA) Test

<p><b>REAGENTS:</b> unknown sample fixed to slide (may contain Ag of interest)</p> <p style="text-align: center;">● Ag</p>	<p><b>POSITIVE SAMPLE</b> Ag is present on slide</p> 	<p><b>NEGATIVE SAMPLE</b> Ag is not present on slide</p> 
<p><b>REAGENTS:</b> fluorescein-labeled Ab to Ag of interest</p> <p style="text-align: center;">F Y</p> <p>Allow time to react Wash away unbound Abs</p>		
<p><b>PROCEDURE:</b> observe under a fluorescence microscope</p>  <p><b>POSITIVE:</b> green fluorescence <b>NEGATIVE:</b> no fluorescence</p>		

# Direkt IF testi sonucu

↗ Floresan parıldama (+) ise direkt IF (+)'dir.

**↗ Floresan parıldama (-) ise direkt IF (-)'dir.**

# İndirekt İmmunfloresan Testi

- Test Ag ya da antikor varlığını saptamak için kullanılır. Sıklıkla Ab varlığını araştırmak için uygulanır.
- Testte kullanılan konjugatın yapısındaki antikorlar, primer antikora spesifiktir.



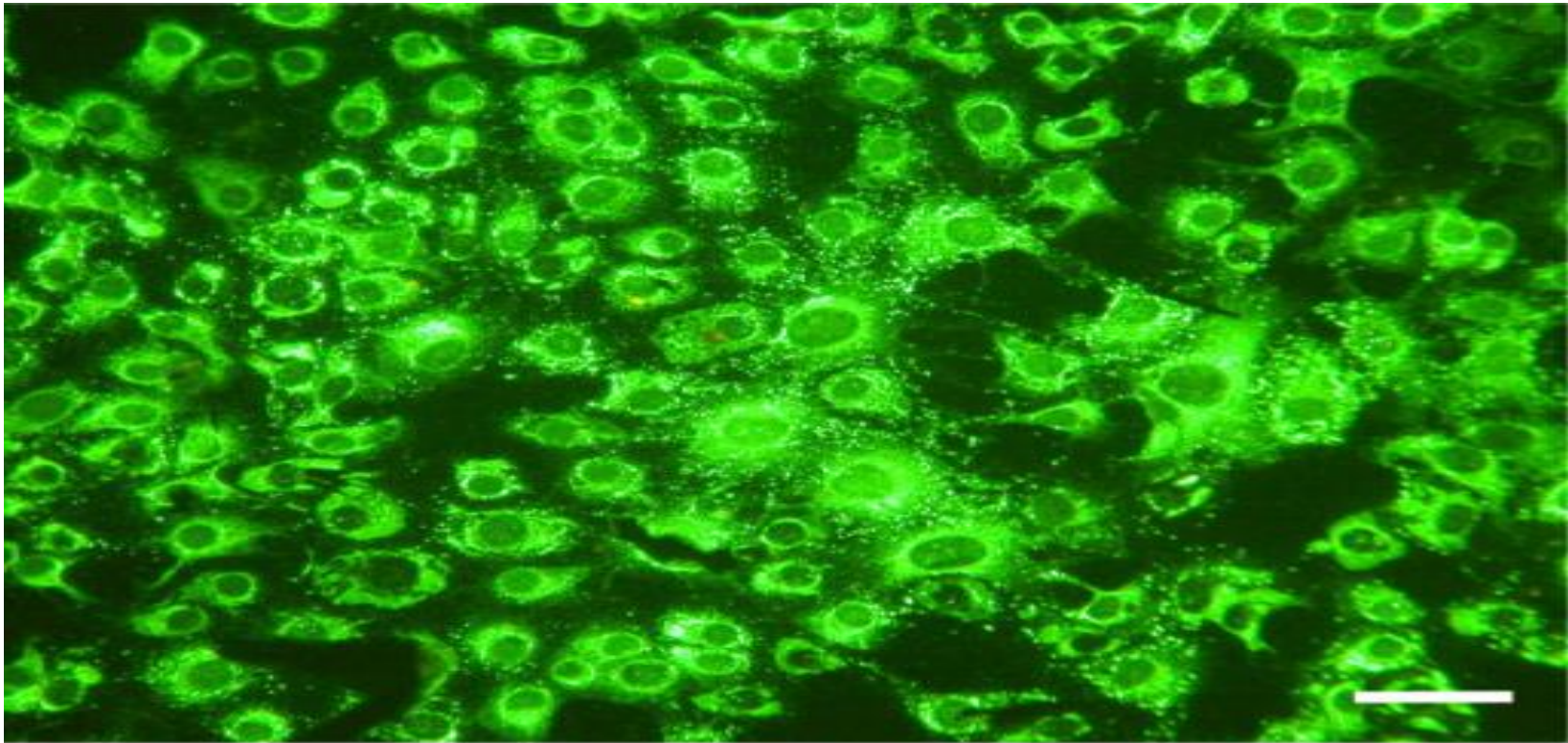
## İndirekt IF testinin uygulanışı

- Monolayer tabakalanmış hücre kültürlerine bilinen virus inokule edilir.
- Uygun inkubasyon süresinden sonra ortama şüpheli serumdan konular ve 1 saat 37°C'de inkube edilir.
- Inkubasyonu takiben, hücre yüzeyleri yıkanır ve konjugat ilave edilerek 37°C'de 1 saat bekletilir.
- Inkubasyon ve yıkamayı takiben hücreler floresan mikroskopta incelenir.

## İndirekt IF testi sonucu

- **Floresan parıldama(+)** ise, **İndirekt IFT(+)**'dir.  
(Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor vardır).
- **Floresan parıldama(-)** ise, **İndirekt IFT (-)**'dir.  
(Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor yoktur)

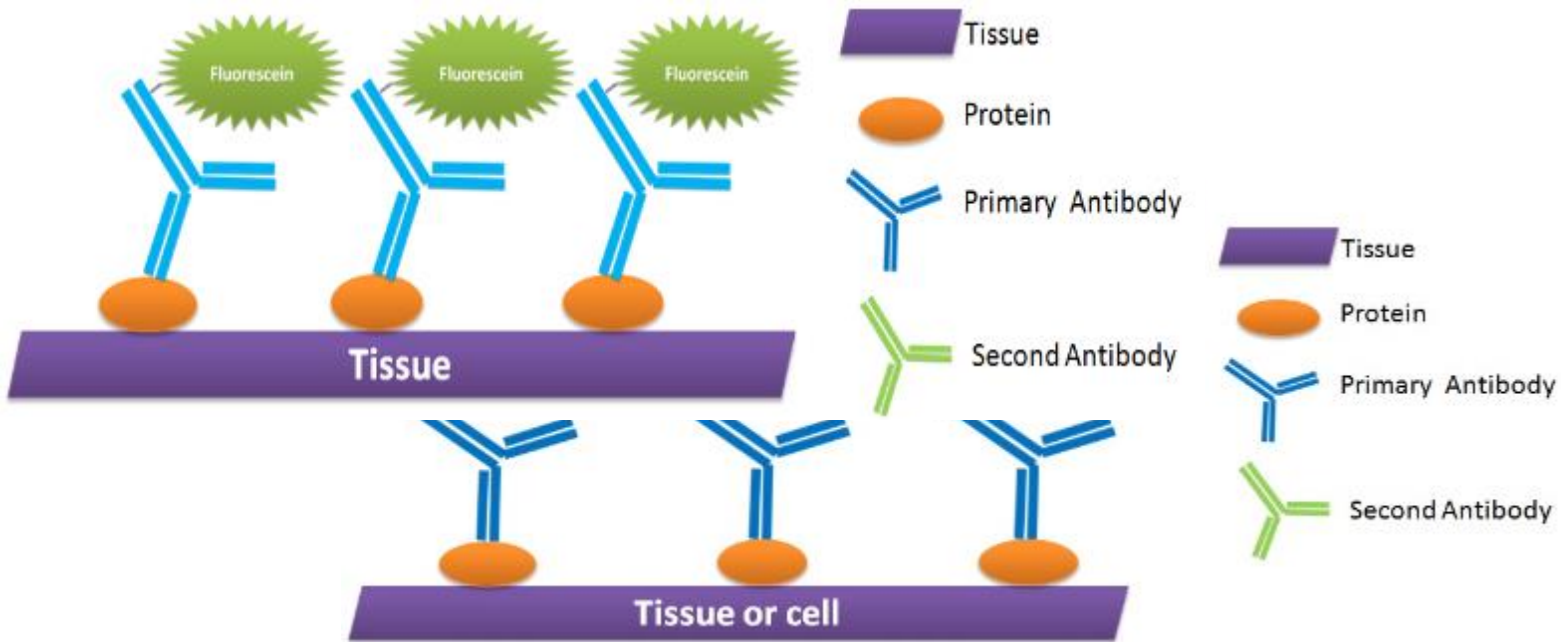
## Indirect immunofluorescence test sonucu



Indirect immunofluorescence microscopy performed on chicken sera with a neutralization titre of 1/80 (diluted 1:1000 in PBS) on West Nile virus infected Vero cells (Bar 50µm).

Buckley A, Dawson A, Gould EA - [Virol. J. \(2006\)](#)

# Direkt ve İndirekt Immunfloresan



# Nötralizasyon IF testi

➤ **Tanım:** Bilinen virus ile şüpheli serum örneğinin nötralizasyon için bekletilmesini takiben, nötralizasyonun olup olmadığının direkt IF yöntemine göre kontrolü esasına dayanır.

➤ **Hatırlatma:**

➤ Test, antikor varlığının araştırılması için uygulanır.

➤ Konjugat, bilinen virusa spesifik Ab içerir.

## NIF testinin uygulanışı

- 100DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılan virus eşit hacimde şüpheli serum ile 1 saat 37°C'de inkubasyona bırakılır.
- Süre sonunda tabletin gözlerine 0.05 ml hücre süspansiyonu damlatılır. 2-3 gün 37°C'de inkubasyona bırakılır.
- İnkubasyondan sonra hücre yüzeyleri yıkanır ve hücrelerin üzerine konjugat (bilinen virusa spesifik) ilave edilir. 1 saat 37°C'de inkubasyonu takiben test değerlendirilir.

# NIF testi sonucunun deęerlendirilmesi

- ↗ Floresan parıldama (+) ise, NIF (-)dir. (Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor yoktur)
- ↗ Floresan parıldama (-) ise, NIF (+)dir. (Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor vardır.)