

IMUNOHISTOCHIMIE

Cursul II

Complexul antigen-anticorp

Punerea în contact a unui antigen cu anticorpul specific determină formarea unui **complex antigen-anticorp**, între cele două molecule existând o analogie structurală la nivelul determinanților antigenici de tip “lacăt-cheie”.

Acest complex este menținut prin:

- **formarea unor punți de hidrogen,**
- **apariția unor forțe electrostatice**
- **formarea de legături Van der Waals.**

Combinarea unui anticorp cu antigenul său este o reacție imună prin care se urmărește (fiziologic) neutralizarea toxicității sau patogenității antigenului.

Complexele antigen-anticorp pot fi **vizualizate numai prin marcarea anticorpului specific cu fluorocromi sau cu enzyme cuplate cu un cromogen.**

1. Marcarea fluorescentă

1.1. Metoda directă constă în punerea în contact a antigenului cu anticorpul specific, marcat fluorescent.

Cei mai frecvenți reactivi utilizați pentru marcarea anticorpilor sunt **izotiocianatul de fluoresceina** (FITC) și **izotiocianatul tetrametilrodamina** (TRITC). Aceste substanțe, în soluție alcalină (pH 9-10) se combină covalent cu proteinele, reacționând în principal cu grupul **amino** al lizinei. Materialul marcat cu fluorocromul este **anticorpul primar**.

Anticorpul primar marcat cu fluorocrom se va conjuga cu toate tipurile de proteine prezente în ser, nu numai cu antigenul de interes. Materialul fluorescent nelegat va fi de asemenea prezent din cauza unor hidrolize ale agenților de marcaj care survin în mediu alcalin necesar dezvoltării reacției cu aminele.

Materialul fluorescent neconjugat trebuie să fie eliminat din cauză că ar colora nespecific țesuturile. Serul marcat este dializat pentru a îndepărta moleculele mici ($gm < 5000$ daltoni) și pentru a înlocui solventul alcalin cu o soluție salină cu un pH fiziologic. Apoi serul imun este trecut printr-o coloană filtru de gel, care reține moleculele mici sau poate fi tratat cu cărbune activat. Rezultatul final duce la obținerea unui ser ce conține în cea mai mare parte anticorpul specific marcat cu un fluorocrom.

Acest ser este pus în contact cu țesutul care conține antigenul într-o atmosferă umedă, timp de aproximativ o oră. Apoi se înlătură excesul cu o soluție salină și se montează între lamă și lamelă utilizând un amestec de glicerol și tampon alcalin.

Aceste tehnici prezintă mai multe dezavantaje:

- prezența unui microscop cu lampă de ultraviolete, filtre speciale și obiective microscopice speciale;
- preparatul histologic trebuie examinat și fotografiat cât mai repede deoarece emisia de lumină se reduce progresiv cu trecerea timpului;
- montare nu se poate face în balsam de Canada și de aici imposibilitatea de a fi păstrat mult timp (nu poate fi păstrat ca preparat permanent).

Procedura de imunocolorare.

Materialul biologic care conține antigene pe care vrem să le studiem sunt **secționate la microtom** și montate pe lame histologice (**poli-L-lisina**). Secțiunile sunt clătite cu soluție de **ser fiziologic** după care se **adaugă o picătură de anticorp primar marcat cu fluorocrom**, pe fiecare lamă, acoperind toată secțiunea. Pentru o reacție bună se vor efectua mai multe diluții ale anticorpului, în soluție salină. (Diluții mai slabe de 1:8 ale anticorprului primar nu sunt utilizate pentru metodele directe cu anticorpi fluorescenți). Serul este lăsat în contact cu secțiunile, în atmosferă umedă, aproximativ o oră. Apoi este **îndepărtat surplusul de ser primar** cu soluție salină după care se aplică o lamelă (se realizează montarea preparatului histologic). Preparatele imunofluorescente sunt de obicei montate în amestec de glicerol diluat în tampon alcalin. Secțiunile astfel colorate și montate sunt examinate la microscopul cu fluorescență, cu excitație și filtrare adecvate pentru marcaj.

Deficiențele metodei directe.

Cu metoda directă cu anticorpi fluorescenți **nu este posibil totdeauna să localizăm antigenele prezente** în țesutului, unele antigene fiind în cantitate foarte mică, deci **sensibilitatea metodei este foarte redusă**, cel puțin pentru unele antigene. Dacă concentrația antigenului este scăzută, densitatea moleculei de fluorocrom legată nu poate fi suficient de mare pentru a permite detectarea lor la microscop. În plus, **procesul de marcare al anticorpului primar poate fi deficil**, reducând capacitatea acestuia de a pune în evidență complexul antigen-anticorp. Un ser ideal marcat are aproximativ 10 molecule fluorocromice atașate la fiecare moleculă de IgG.

Alte deficiențe al acestei tehnici este faptul că **antiserurile primare sunt greu de preparat sau scumpe** și adesea sunt disponibile în cantități mici.

1.2. Metoda indirectă constă în cuplarea antigenului cu un anticorp primar, cuplat la rândul său cu un **anticorp secundar marcat fluorescent**. Cu aceasta tehnică (indirectă) este posibil să se identifice orice antigen sau anticorp în țesut. Anticorpul secundar reprezintă un anti-anticorp.

Procedeele de obținere al anticorpului secundar sunt extrem de variate. În principiu, un antigen este injectat unei specii de animale (ex. iepure). Prezența unei structuri imunogene va duce la producerea de către plasmocitele de iepure a unui anticorp specific numit anticorp primar =gama globulină (ser primar). După recoltare și purificare o parte din acest anticorp este injectat la altă specie de animale (capră). Aceasta va reacționa și plasmocitele sale vor produce imunoglobuline împotriva anticorpului primar. Aceste imunoglobuline noi poartă numele de **anticorp secundar** sau **ser anti-iumunoglobulinic**. Anticorpul secundar va fi marcat cu un fluorocrom.

Procedura de imunocolorare. O secțiune conținând antigenul este mai întâi incubată pentru 30-60 minute cu o concentrație adecvată (de obicei 1:20 sau 1:50) anticorpul primar. Moleculele de anticorpi care se atașează la situsurile antigenice (se leagă de epitopi) din țesut, sunt imunoglobuline. Ele se cuplează cu antigenele prin intermediul fragmentelor Fab. Segmentele Fc ale moleculelor de imunoglobuline din anticorpul primar pot însele servi ca antigene. În stadiul următor al metodei de colorare, secțiunea este tratată cu antiserul secundar marcat fluorescent. Moleculele anti-IgG (anticorpul secundar) se vor lega de fregmentele Fc ale moleculelor de imunoglobuline deja atașate derivate din antiserul primar. Această metodă este o metodă de amplificare a cantității de fluorocrom si deci, de amplificare a semnalului luminos emis de fluorocrom.

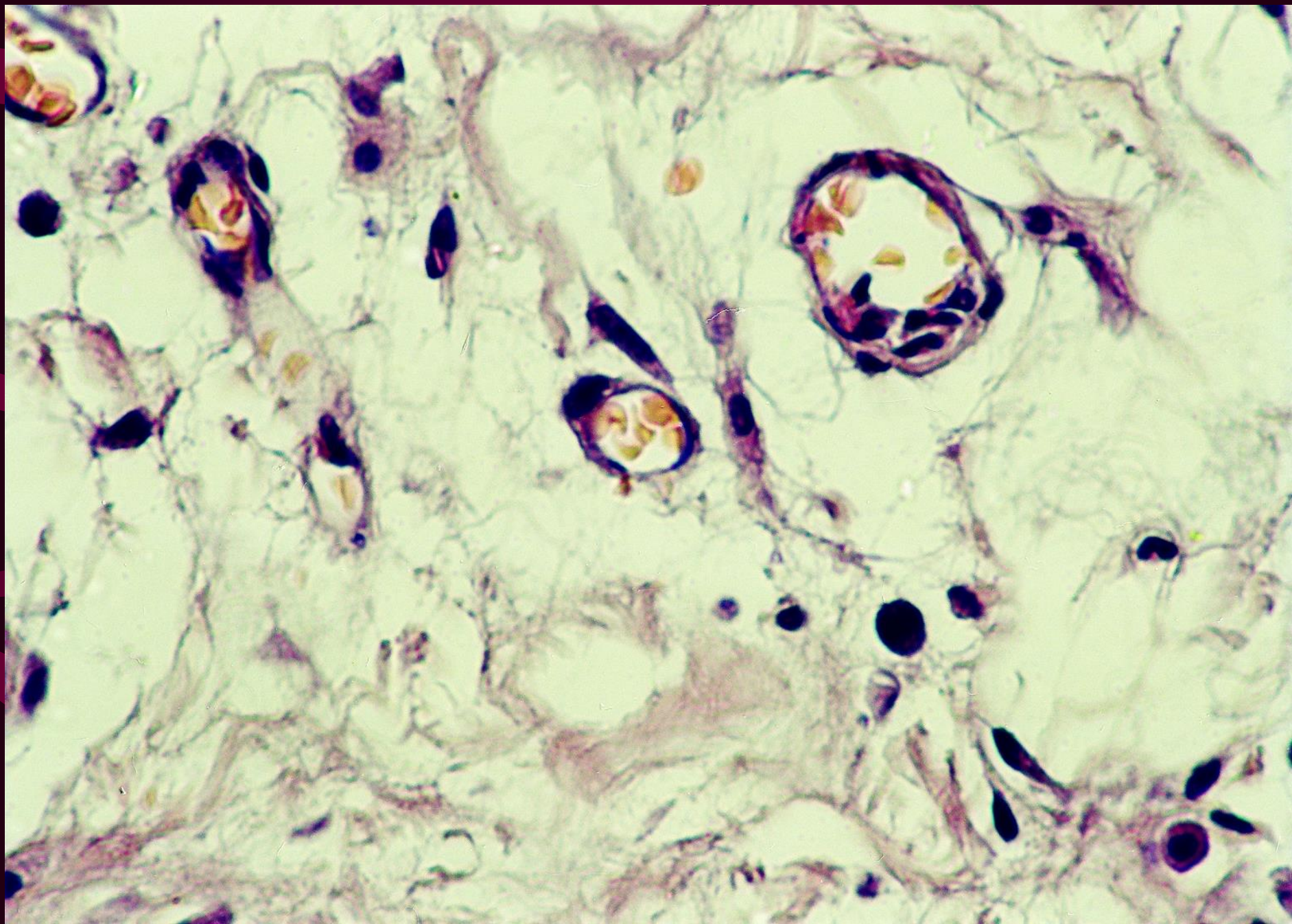
Această metodă este superioară metodei directe pentru 2 motive:

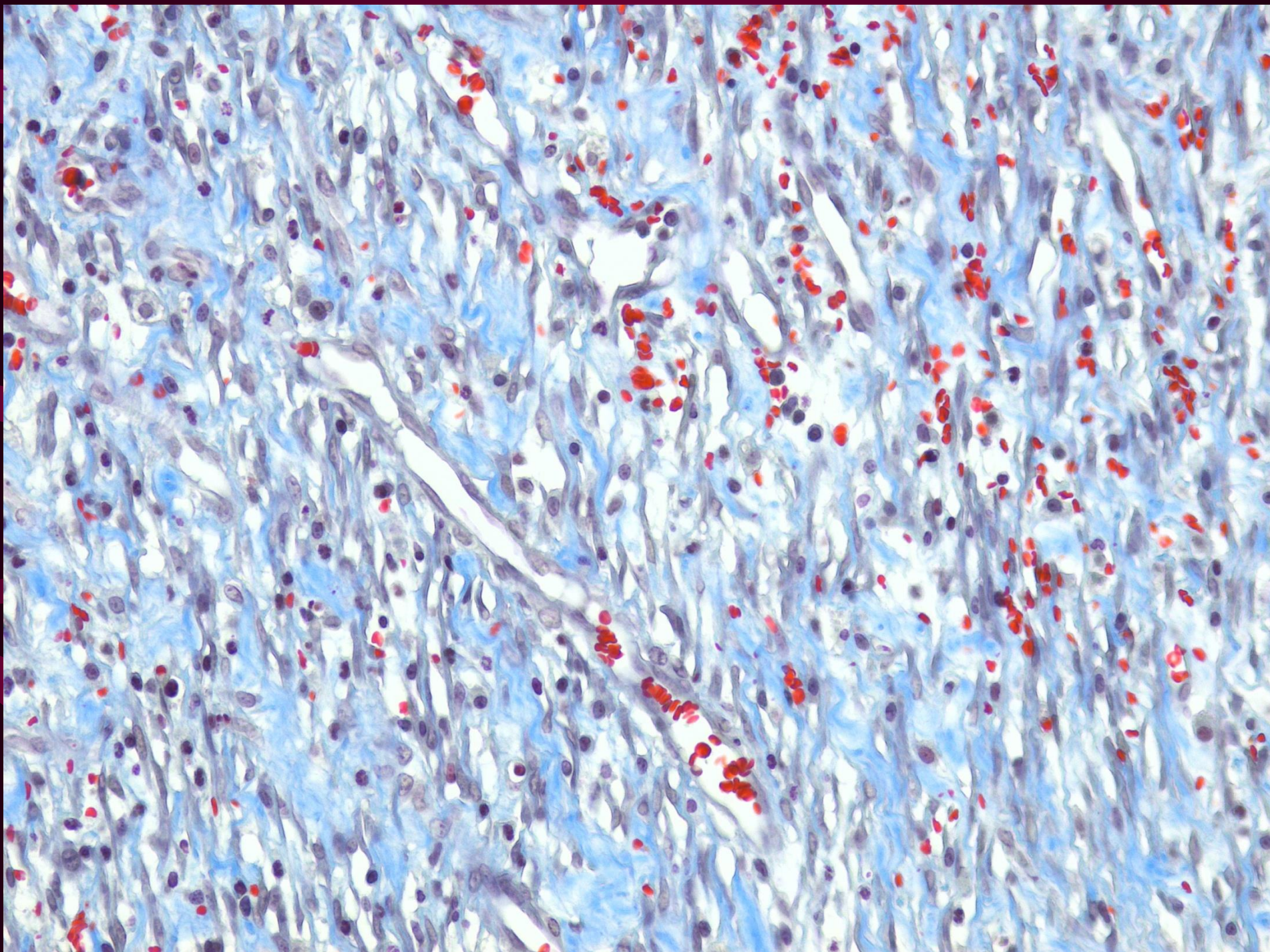
- nu este necesară marcarea anticorpului primar. Obținerea antiserurilor secundare și marcarea lor este mai ieftină;

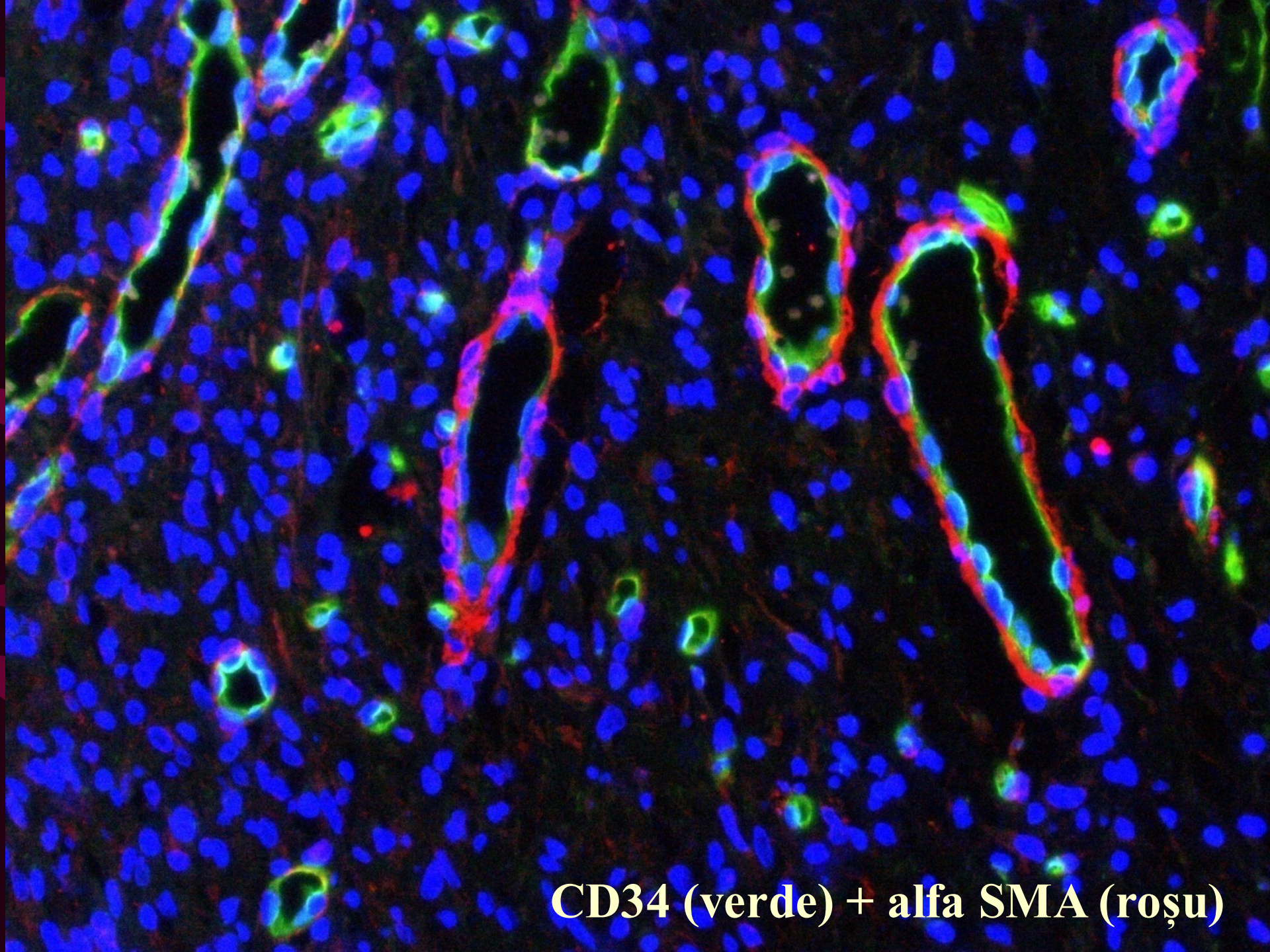
- mai mult de o moleculă de anticorp fluorescent din antiserul secundar va putea să se atașeze de fiecare moleculă a anticorpului primar. **Fiecare moleculă de antigen a legat de două ori mai multe molecule fluorescente decât ar fi legat dacă s-ar fi folosit metoda directă de imunofluorescență.** În realitate factorul de amplificare poate fi mult mai mare (nu numai de 2 ori), deci **tehnicile imunohistochimice indirecte sunt întotdeauna mai sensibile decât cele directe.**

Metoda imunofluorescenței indirecte este foarte sensibilă, mai rapidă și mai eficientă.

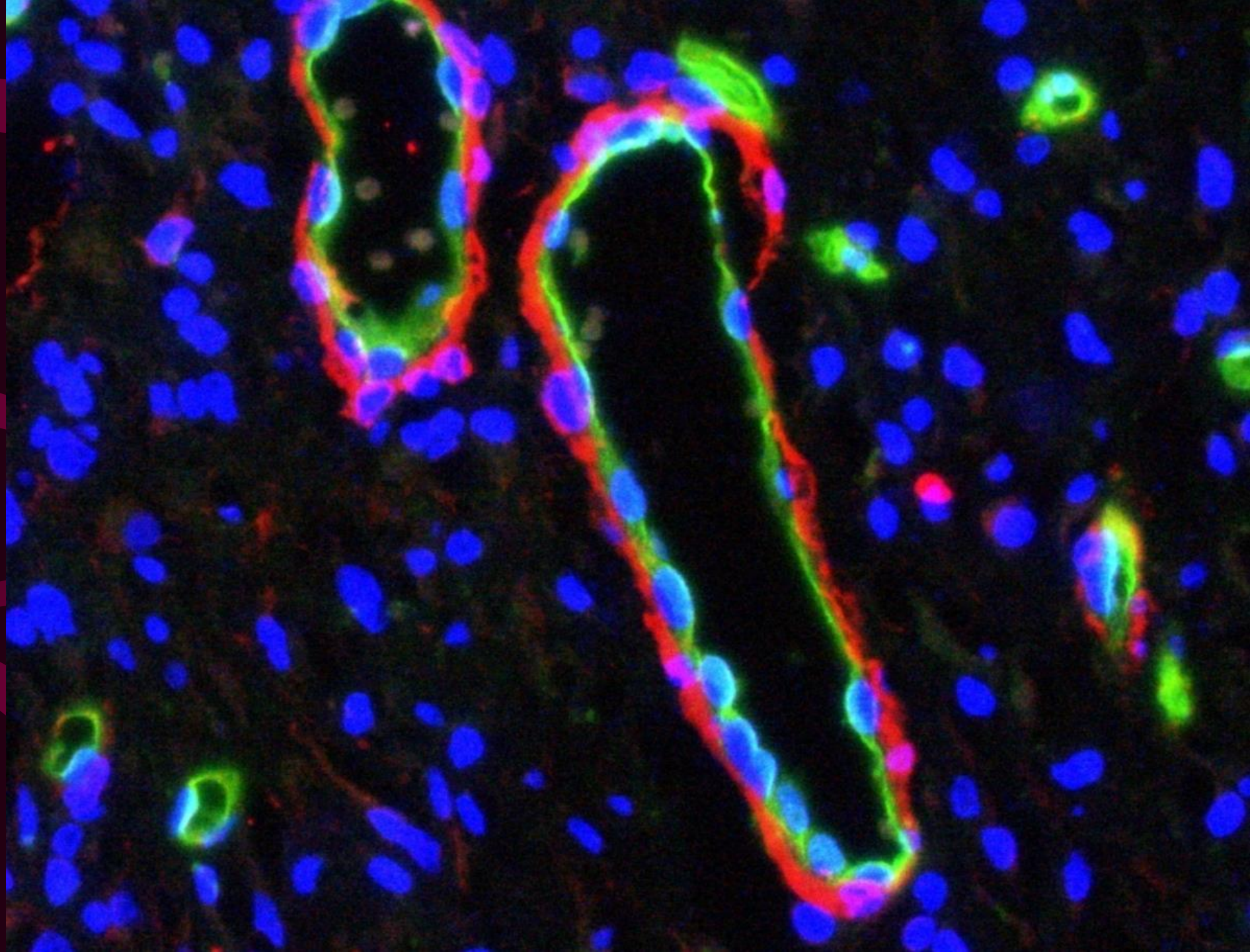
Folosind antiserurile primare dezvoltate la specii diferite, este posibilă localizarea a cel puțin trei antigene diferite în aceeași secțiune, prin conjugarea antiserurilor secundare cu fluorocromi diferiți. Procedurile de marcaj multiplu sunt constituite din mai multe etape și sunt folosite în principal în cercetare. Microscopia confocală asigură o rezoluție înaltă și posibilitatea colectării și manipulării electronice a imaginilor obținute de la specimene care conțin fluorocromi diferiți.

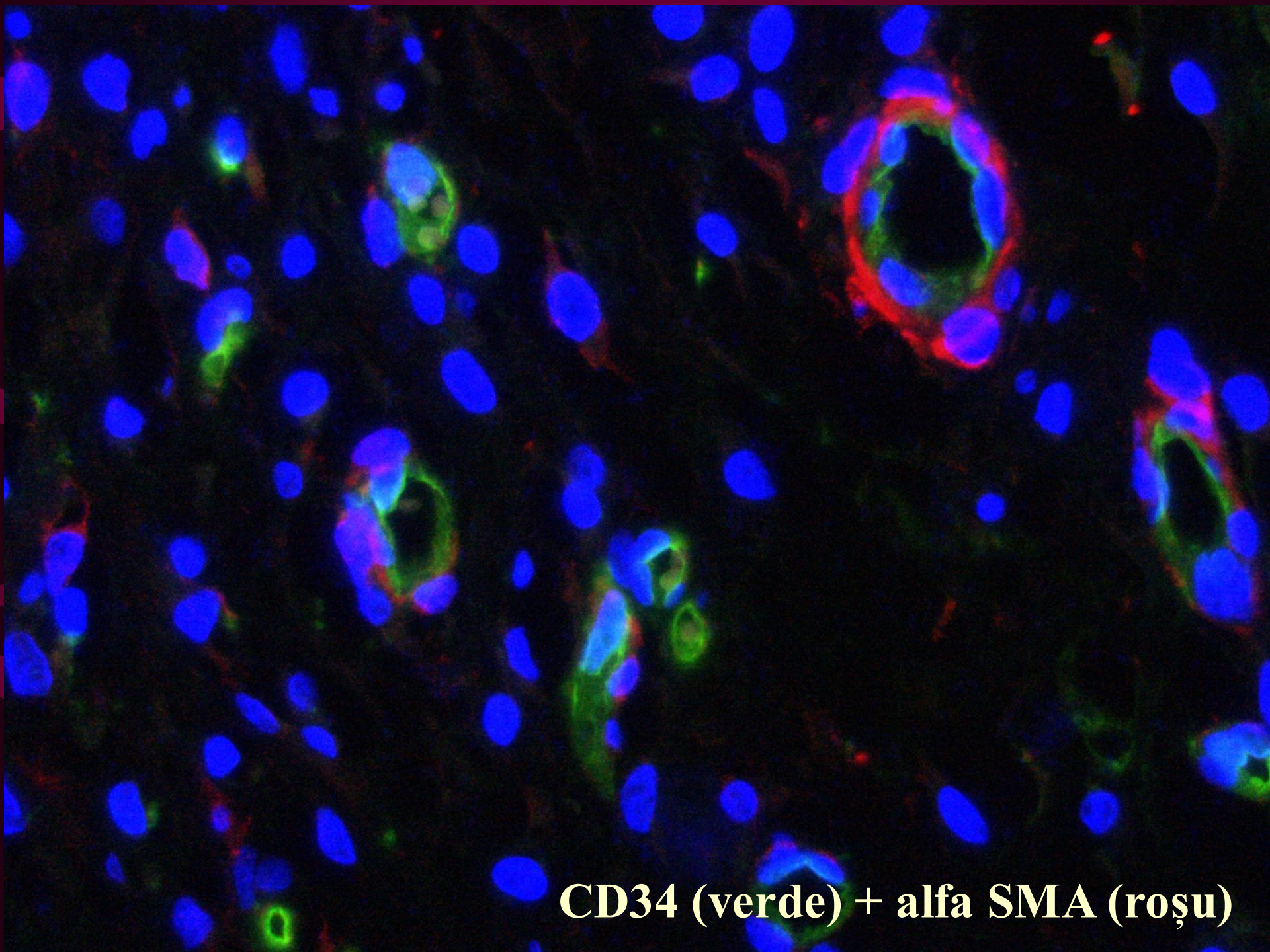




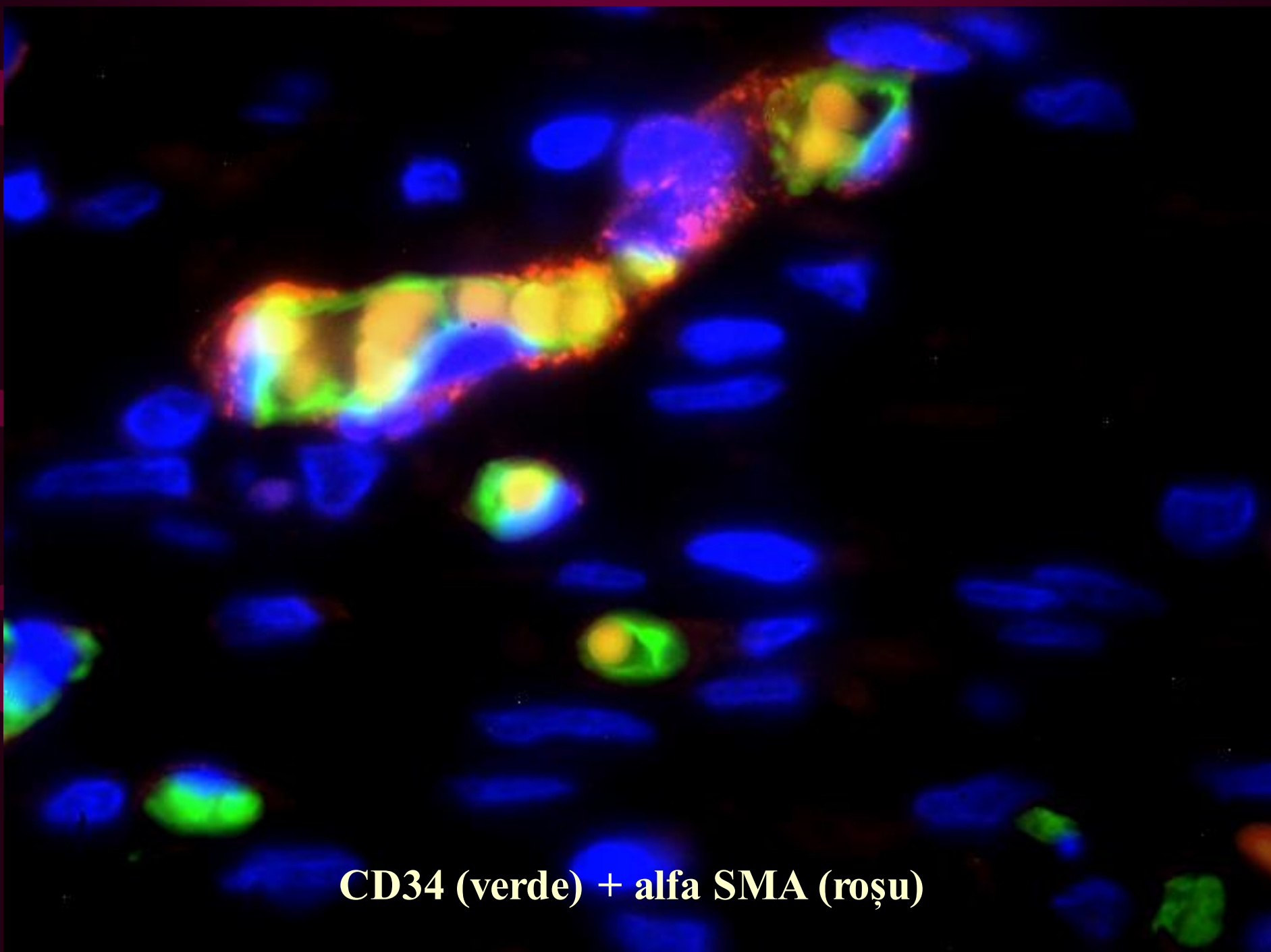


CD34 (verde) + alfa SMA (roșu)

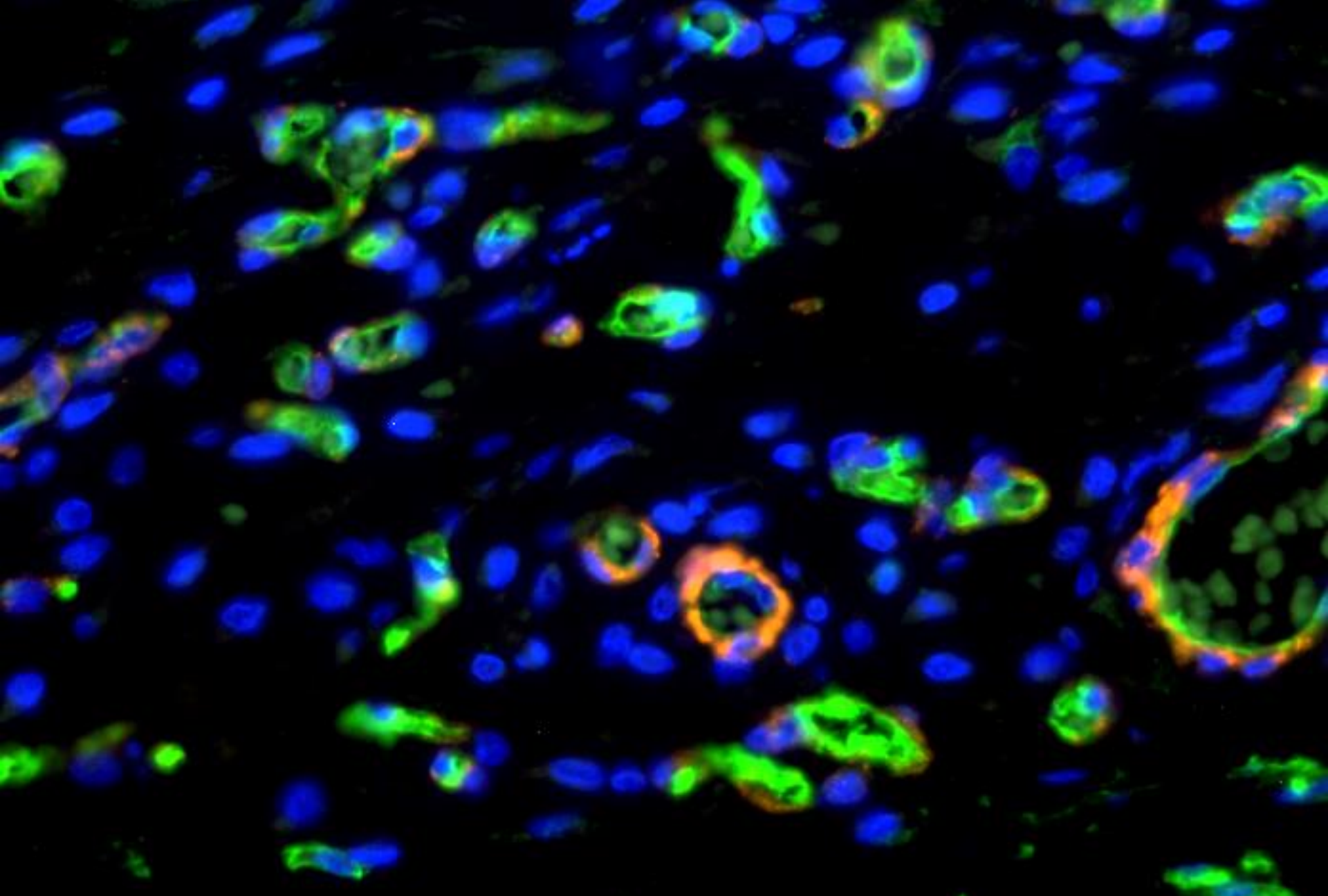




CD34 (verde) + alfa SMA (roșu)



CD34 (verde) + alfa SMA (roșu)



CD34 (verde) + alfa SMA (roșu)

II. Marcarea enzimatică

Enzimele sunt cei mai folosiți markeri în imunocitochimie. Prin aceste tehnici anticorpii sunt marcați prin conjugare cu enzime. Incubația complexului **antigen-anticorp-enzimă** cu un **cromogen** folosind o metodă histochimică standard, generează un produs final de reacție, **colorat, stabil, ușor de examinat la microscopul optic obișnuit**. În plus, varietatea enzimelor și cromogenilor disponibili, permit utilizatorului alegerea culorii produsului final de reacție.

Peroxidaza din hrean este cea mai folosită enzimă, și în combinație cu un cromogen favorabil **diaminobenzidina** (3,3'-diaminobenzydin-tetraclorid)(**DAB**), conduce la formarea unui produs de reacție **maro închis**, stabil, insolubil și permanent. Cu toate că DAB a fost considerat potențial carcinogenic, s-a demonstrat ca riscul este relativ mic. În afară de DAB, peroxidaza poate fi combinată și cu alți cromogeni: **4 clor-1-naftol** (rezultând o colorație albastră), **alfa naftol pironina** (rezultând o colorație roșie purpurie), etc.

Amplificarea semnalului constă în faptul că la o singură moleculă de imunoglobulină (**anticorp**) pot fi atașate mai multe molecule de enzimă marcate cu un cromogen.

Procedura de imunocolorare. Pot fi folosiți anticorpii primari marcați cu enzimă într-o **reacție directă**. Această metodă nu se mai folosește curent, ci se folosesc **metode indirecte**, în care antiserurile secundare sunt marcate enzimatic.

La ora actuală sunt foarte mulți producători de reactivi de imunohistochimie și fiecare producător recomandă metodologia de utilizare, inclusiv diluția anticorpului primar.

Soluția ce conține un anticorp marcat peroxidază din hrean (HRP) este folosită la fel ca antiserul secundar marcat fluorocromic. Locurile de atașament al HRP la țesut sunt detectate histochimic, de obicei cu ajutorul reacției **DAB-peroxid de hidrogen**. Legarea HRP e capabilă să catalizeze oxidarea multor molecule de DAB prin peroxid de hidrogen cu acumulare consecutivă de cantități substanțiale ale unui produs maro insolubil. De aceea mărimea aparentă a fiecărui loc antigenic în țesut este mărită până când enzima este inhibată de acumularea produșilor activității sale. “**Factorul de amplificare**” este **mai mare decât poate fi obținut în tehnicile cu anticorpi fluorescenți**.

În forma sa ea mai simplă metoda următorii timpi:

- clătirea secțiunilor în soluție salină (PBS);
- demascarea antigenului prin fierbere în soluție de citrat de sodiu (pH= 6), 21 de min.

- blocarea peroxidazei endogene cu apă oxigenată 1-3%, 30 min;

- aplicarea anticorpului primar diluat după indicațiile producătorului; se folosesc diluții seriate de la 1:20 la 1:320. Se lasă în contact cu secțiunile 30-60 min la temperatura camerei și atmosferă umedă; (sau peste nopate la 4°C);

- se clătesc secțiunile de trei ori în soluție salină;

- se aplică anticorpul secundar marcat enzimatic la recomandările producătorului; (se utilizează diluții 1:20 și 1:80), 30-60 min

- se clătesc secțiunile de trei ori în soluție salină;

- deshidratarea cu soluții de alcool etilic în concentrații crescânde; clarificare în xilen (benzen); montare în balsam de Canada.

Complexele antigen anticorp sunt puse în evidență printr-o colorație maronie.

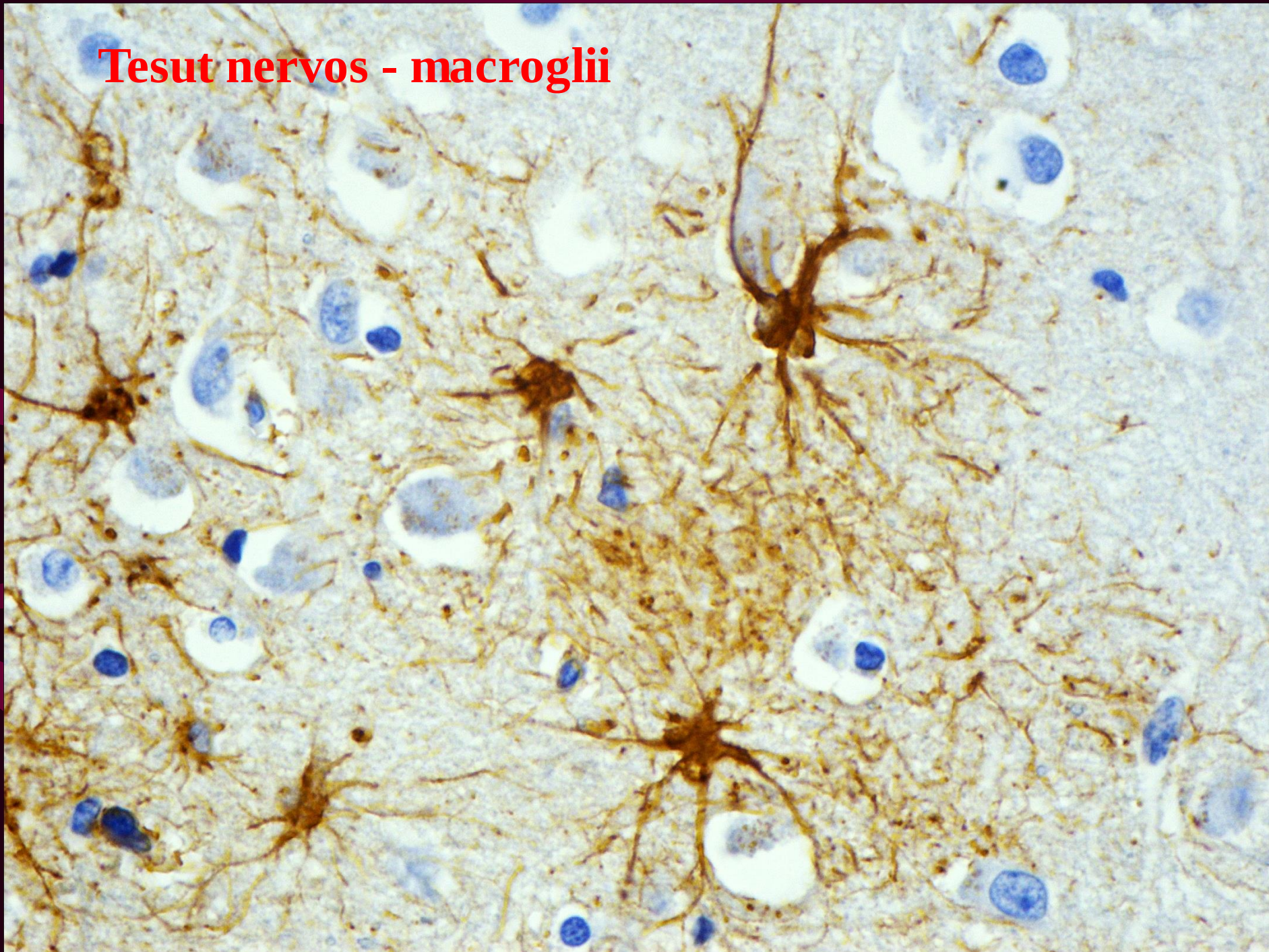
Marcaje enzimatic, altele decât HRP

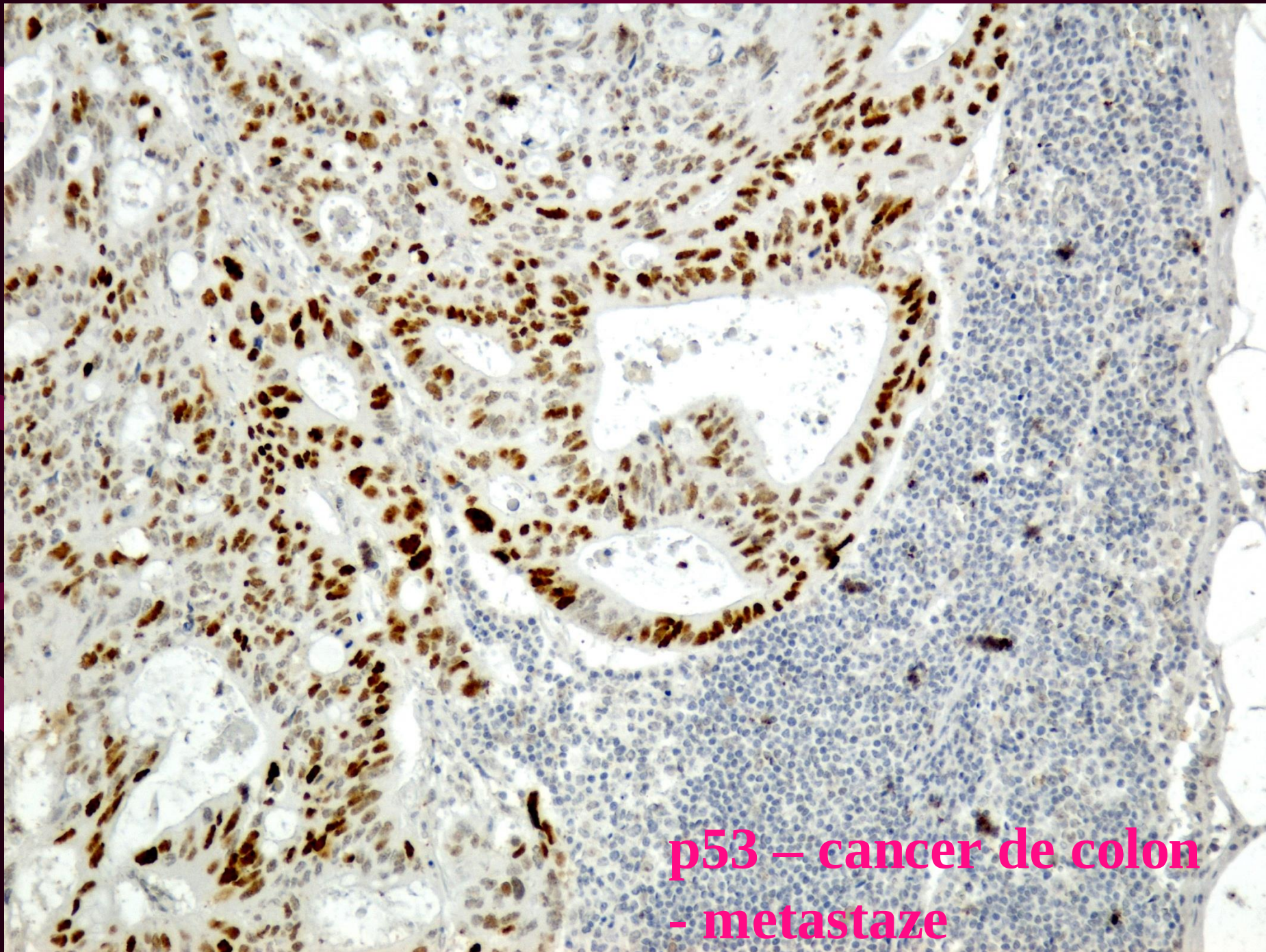
Peroxidaza din hrean este cea mai utilizată marcare enzimatică pentru anticorpi, dar nu este unica folosită. Alte enzime utilizate: **fosfataza alcalină, γ -galactozidaza și glucoxidaza**. Aceste enzime pot fi de asemenea folosite ca metodele enzimatică cu anticorpi nemarcați și cu metoda avidin-biotin, folosindu-se marcaje duble sau triple, care pun în evidență mai mulți antigeni în același timp, în culori diferite.

Când situsurile antigenice sunt puține și depărtate între ele, o tehnică indirectă cu anticorpi fluorescenți este preferată, pentru că este mai ușor de observat pete fluorescente izolate pe un fundal întunecat decât să găsești acumulări mici ocazionale de produși de reacție enzimatică pe un fundal luminos.

Anticorpilor marcați enzimatic sunt utilizați și pentru **imunohistochimia ultrastructurală**, pentru că produșii finali ai multor reacții histochemice, inclusiv metoda DAB-H₂O₂ pentru peroxidază, pot fi detectate de **microscopia electronică**.

Tesut nervos - macroglii





p53 – cancer de colon
- metastaze

Metoda peroxidază - antiperoxidază

Principiul metodei. Peroxidaza din hrean poate servi drept **antigen** când este injectată la un animal (de exemplu la iepure). Se obțin imunoglobuline (anticorpi) antiperoxidază. Prin amestecarea atentă a acestor anticorpi cu peroxidaza din hrean se obține un complex antigen-anticorp solubil cunoscut sub numele de **peroxidază-antiperoxidază (PAP)**. Două molecule de IgG specifice sunt asociate cu 3 de peroxidază. Acest complex este disponibil comercial.

Fiecare moleculă complexă de PAP are 2 segmente **Fc**, care sunt apte pentru atașamentul la moleculele anti-IgG adecvate. De exemplu, segmentele Fc de PAP la iepure se vor lega de segmentele Fab ale IgG specifice la anti-(γ -globulina de iepure) la capră. Complexul PAP este de aceea un reactiv imunohistochimic valoros pentru detectarea locurilor de legare ale anti-anticorpilor.

Procedura de imunocolorare:

- se aplicarea anticorpul primar de iepure (antiserul primar) pe secțiuni, 1 oră la temperatura camerei. Dacă acesta nu a mai fost folosit, se încearcă câteva diluții (în soluție salină tamponată cu fosfat) de la 1:50 la 1:20000. O expunere mai mare (12-24 ore la 4°C) este avantajoasă când este necesar un antiser primar foarte diluat sau dacă investigația necesită folosirea unor secțiuni groase (50-150μm);
- se clătește de 3 ori în soluție salină fosfat tamponată (PBS);
- se aplică anticorpul secundar, anti-(imunoglobulină de iepure) de la capră, 30 minute la temperatura camerei. Se folosește o diluție a serului de 1:10 și 1:40. Concentrația nu este critică, dar ea trebuie să fie mult mai mare decât cea a antiserului primar sau PAP;
- se clătește de 3 sau 4 ori în soluție salină tamponată cu fosfat;

- se aplică **complexul peroxidază-antiperoxidază** de la iepure (PAP de la iepure) 30 min. la temperatura camerei. Acest reactiv este pus la dispoziție ca o soluție ce conține 1 mg proteine/ml. Este diluată 1:50 cu soluție salină tamponată cu fosfat;

- se clătește de 3 sau 4 ori în soluție salină tamponată cu fosfat;

- se **incubează** pentru demonstrarea activității peroxidazei. Metoda DAB-H₂O₂ este de obicei folosită cu mediul de incubare tamponat la pH 7,6.

- se spală în apă.

- se deshidratează,

- se clarifică și se montează folosind un mediu rășinos.

Intensitatea colorării produsului final este influențată de diluția antiserului primar.

Aprecierea metodei

Principalul avantaj al metodei **PAP** este **marea ei sensibilitate**. Rezultate pozitive pot adesea fi obținute cu secțiuni de țesut fixat și prelucrat prin **metode ce denaturează majoritatea antigenelor prezente**. Este posibil chiar să se folosească lame vechi colorate HE de la care lamelele, mediul de montare și coloranții au fost îndepărtați. Marea sensibilitate de datorează atașării celor 3 molecule de DAB la fiecare loc de legare al complexului PAP.

Deși procedurile de control sunt necesare pentru a exclude colorarea nespecifică, aceasta este o metodă mai **„curată”** decât altele, probabil pentru că reactivul PAP este un complex antigen-anticorp pur, incapabil să se asocieze cu alte proteine decât anticorpii săi specifici.

Folosirea metodei PAP ne permite să apreciem destul de bine cantitatea de antigen dintr-un țesut, celulă, etc și să facem comparații importante între regiunile colorate mai puternic și mai slab în cadrul unei singure secțiuni.

Metoda avidină-biotină

Biotina, un metabolit al multor tipuri de microorganisme, este o vitamină ce formează coenzimă sau grup prostetic al câtorva enzime, ce transferă **grupul carboxil**.

Avidina este o glicoproteină din ou. Fiecare moleculă este formată din 4 subunități identice, fiecare capabilă să lege o moleculă de biotină. **Afinitatea între biotină și avidină este foarte mare**, deși nu sunt formate legături covalente, astfel încât legarea apare repede și este reversibilă numai în condiții extreme, precum aciditate puternică.

Streptavidina este o proteină microbiană care nu conține carbohidrați. **Proprietățile sale sunt similare cu cele ale avidinei**. Cele 2 proteine sunt folosite în aceleași scopuri, dar streptavidina este de aproximativ 5 ori mai scumpă decât avidina.

Este posibil ca și alte molecule mari proteice să se conjuge cu biotina. Această reacție este cunoscută ca **biotinilație**. Molecula de biotină este suficient de mică pentru a nu interfera cu activitatea biologică a macromoleculelor pe care le marchează, iar reactivitatea sa cu avidina este neschimbată. La ora actuală există în comerț multe seruri biotinilate.

Procedura de marcare avidină-biotină:

- secțiune deparafinată, hidratată, spălată în apă distilată
 - aplicarea antiserului primar;
 - spălare în 3 băi de PBS;
 - aplicarea antiserului secundar biotinizat;
 - aplicarea soluției de avidină ce a fost conjugată covalent cu fluorocrom sau o enzimă demonstrabilă histochimic, precum peroxidaza din hrean. Enzima este apoi localizată histochimic în modul obișnuit.

Metoda ABC

Sensibilitatea metodei avidină-biotină a putut fi crescută prin folosirea ca agent de imunomarcare a **complexului avidină-biotină (ABC)** proaspăt preparat, realizat prin amestecarea soluției de avidină cu **peroxidază din hrean (HRP) biotinilată**. Reacția este asemănătoare cu procedura anterioară, dar diferă de acesta prin faptul că acest complex **peroxidază din hrean (HRP)-avidină-biotină** preformat **este o moleculă enormă**, legată încrucișat, ce conține mai mult de **3 molecule HRP** per loc liber pe biotină.

Procedura de detectare a antigenului

Fixarea materialului biologic (țesutului) și procesarea sunt similare altor metode imunohistochimice. Secțiunile histologice sunt deparafinate, hidratate și echilibrate cu PBS. (PBS = soluție salină de tampon fosfat).

Soluțiile necesare

1. Un anticorp primar ce se va combina cu antigenul căutat.
2. Un anticorp biotinitat secundar ce se va combina cu imunoglobulinele speciilor din antiserul primar.
3. O soluție avidină. Aceasta conține tipic 10 μ g de avidină/ml în PBS.
4. O soluție peroxidază biotinizată horseradish în PBS.
5. ABC realizat prin combinarea soluțiilor 3 și 4. Se amestecă 15-20 min. înainte de întrebuințare.
6. Reactivii pentru demonstrarea activității peroxidazei la pH neutru.
7. Orice soluție colorantă (DAB).

Tehnica de lucru

- deparafinare;
- hidratare;
- spălare 5 minute în PBS;
- se inhibă peroxidaza endogenă prin tratarea secțiunilor pentru 30 minute cu peroxid de hidrogen 0,3% în PBS;
- spălare în 2 băi de PBS;
- se incubează în antiser primar diluat adecvat (gradul diluției poate varia între 1:200 și 1:6400) . Incubările lungi (12-48 ore) la 4°C sunt preferate pentru secțiunile subțiri (50-150μm). Incubările mai scurte (ca 1 oră) la temperatura camerei sunt satisfăcătoare pentru secțiunile montate la parafină.
- clătire în 3 bai de PBS;
- se incubează în antiserul secundar biotinitat 30-60 minute la temperatura camerei în diluție de 1:10 la 1:40;
- clătire de 3 ori în PBS;
- se incubează secțiunile în soluție ABC timp de o ora la temperatura camerei;
- se clătesc de 3 ori în PBS;
- se activează peroxidaza;
- se pune soluția marcatoare (DAB);
- se spală în apă,
- se colorează de contrast cu Hematoxilină Mayer cât se dorește
- se deshidratează și se montează.

Aprecierea metodei

Metodele ABC și PAP sunt probabil de intensitate aproximativ egală. În ambele proceduri sunt folosite molecule mari, complexe, pentru a introduce enzima detectoare la locurile unde sunt legați anticorpii. Totuși, tehnica ABC este preferată pentru obținerea unor preparate „curate”. Unii utilizatori pretind că rezultatele sunt mai exacte cu streptavidină decât cu avidină.

Alte metode imunohistochimice

Tehnicile descrise până acum sunt cele mai larg utilizate pentru demonstrarea antigenelor în țesuturi. Dar la ora actuală există și alte tehnici ingenioase pentru localizarea antigenelor și anticorpilor.

Tehnica sandwich pentru anticorpi în țesut

Anticorpii dintr-un țesut sunt demonstrați prin aplicarea antigenului purificat, urmat de antiserul marcat fluorescent al antigenului. Metoda este adesea folosită pentru studiul nodulilor limfatici. Anticorpii, în general, sunt detectați prin combinare lor cu antigenele specifice. De exemplu o imunoglobulină G umană, poate fi localizată pe secțiunile histologice cu ajutorul antiserului de iepure împotriva imunoglobulinei G umane, urmată de combinarea acestui complex cu un **anticorp secundar marcat** provenind de la o altă specie de animal (capră) împotriva imunoglobulinei de iepure.

Detectarea anticorpului în ser

În bolile autoimune, sângele conține anticorpi circulanți împotriva anumitor componente ale țesuturilor pacientului sau animalului. Existența și specificitatea unor asemenea anticorpi poate fi detectată imunohistochimic prin aplicarea serului suspect pe secțiunile criostatice nefixate de țesut cunoscut ce conține auto-antigene adecvate. Locurile de legare ale anticorpilor la secțiuni sunt făcute vizibile prin aplicarea antiserului fluorescent sau marcat enzimatic împotriva imunoglobulinelor speciilor de la care a fost obținut serul sub testare.

Metode ce folosesc proteina A stafilococică

Peretele celular al *Stafilococcus aureus*, conține o componentă numită **proteina A** ce este capabilă să se lege de **segmentele Fc** ale multor tipuri de molecule IgG la mamifere. **Legarea este nonimună** rezultă dintr-o afinitate similară celei existente între antigene și anticorpi. Molecula de proteină A este bivalentă și poate servi drept punte între porțiunile Fc ale moleculelor de IgG de tipuri diferite. Este de asemenea posibil să marcheze proteina A cu fluorocromi sau cu HRP. De aceea proteina A poate fi folosită pentru aceleași scopuri ca un antiser la IgG.

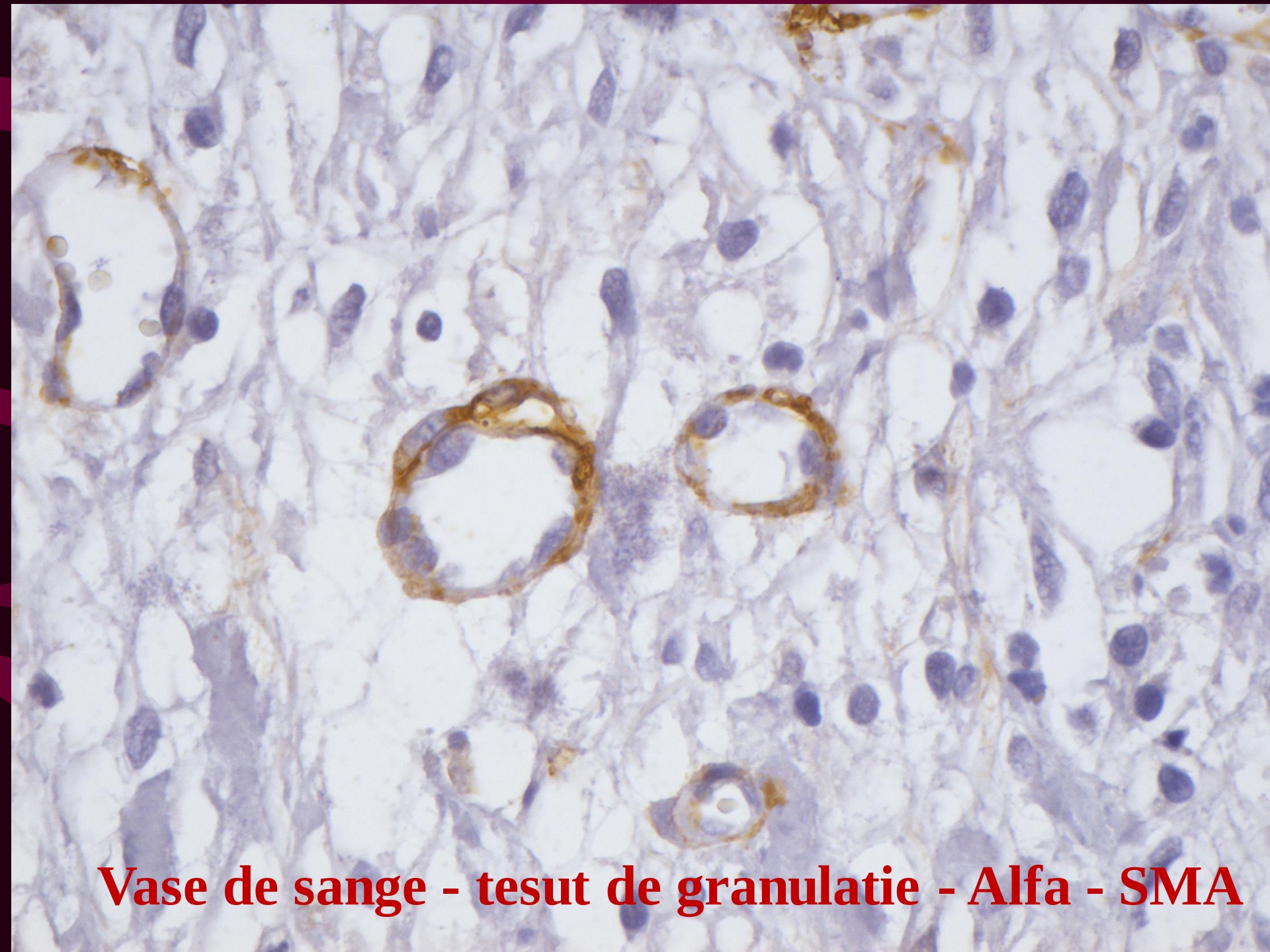
Un conjugat al **proteinei A cu HRP** este implicat într-o tehnică asemănătoare unei metode cu anticorpi marcați enzimatic. Antiserul primar specific este aplicat pe o secțiune de țesut, urmat de conjugatul HRP-proteina A. Locurile de legare HRP sunt demonstrate **histochimic** în modul obișnuit. **Această metodă pune la dispoziție uneori o colorare „mai curată”**, cu mai puțină colorare de fond non-imunologică, decât tehnica cu anticorpi marcați enzimatic echivalentă.

Avantajul principal al proteinei A este că aceasta este capabilă să se combine cu IgG de la toate mamiferele, așa încât ea are un număr mai mare de potențiale întrebuințări decât un antiser la imunoglobulina unei singure specii.

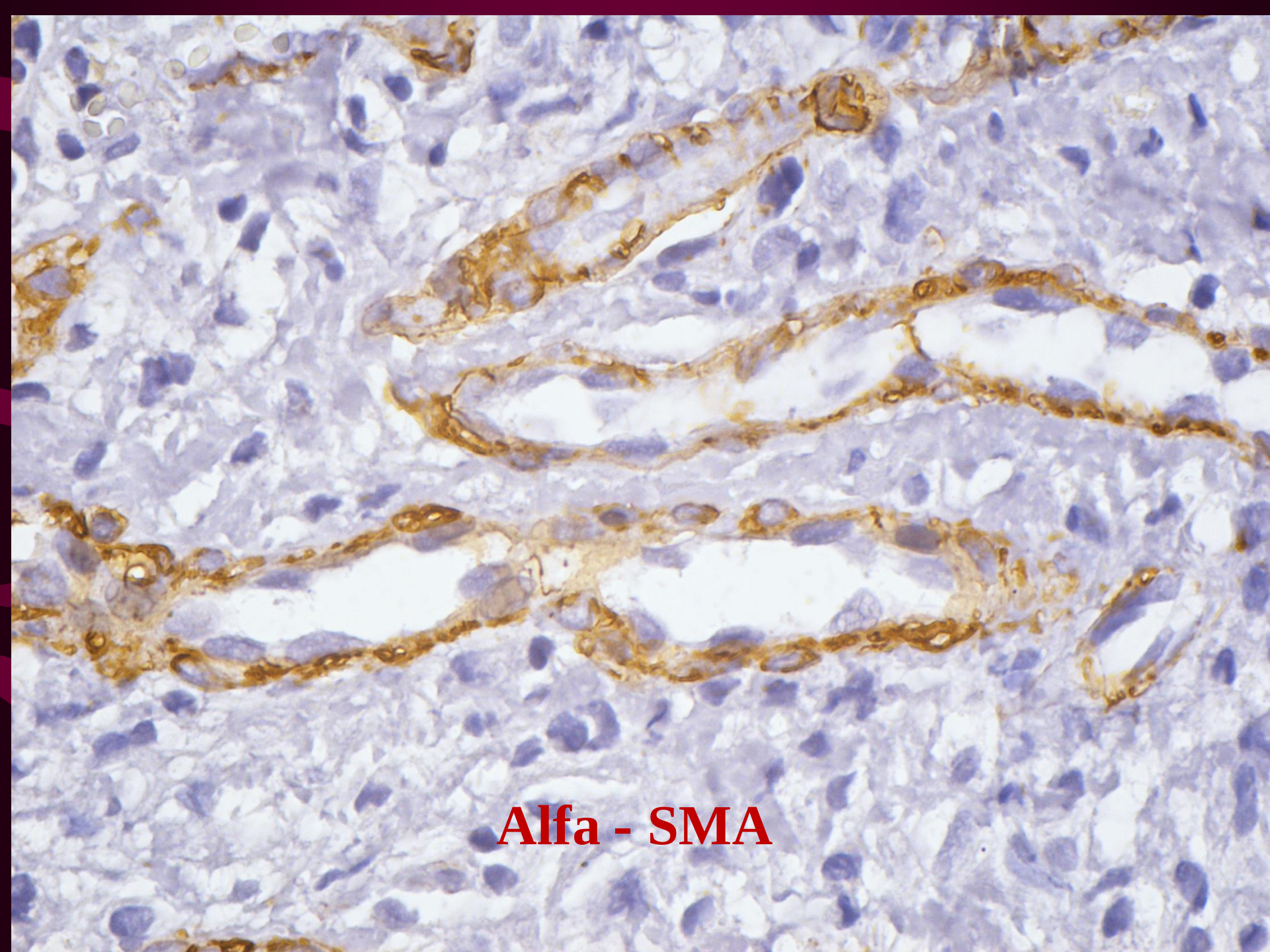
Marcarea cu aur coloidal

Este ușor de realizat deoarece este o suspensie coloidală (numită „sol”) de aur, conținând particule cu diametrul cunoscut, în medie de 20-150 nm. Pentru a preveni ca particulele suspendate să se grupeze sau să se scufunde, suspensia conține un agent stabilizator macromolecular care acoperă suprafețele particulelor. Dacă acest agent stabilizator este inclus într-o proteină sau include o proteină cu afinitate specifică precum o **lecitină** sau o **imunoglobulină**, **metalul va servi drept marcator ca și un colorant fluorescent sau o enzimă demonstrabilă histochimic**. În mod obișnuit, un ser anti-IgG, fie o proteină A stafilococică este legată de particulele de aur. În acest fel aurul este folosit pentru a identifica locurile de atașament ale anticorpului primar. Avidina poate fi de asemenea folosită pentru a acoperi particulele de aur coloidale.

Metodele cu aur coloidal au fost introduse pentru a se folosi în **microscopia electronică**.



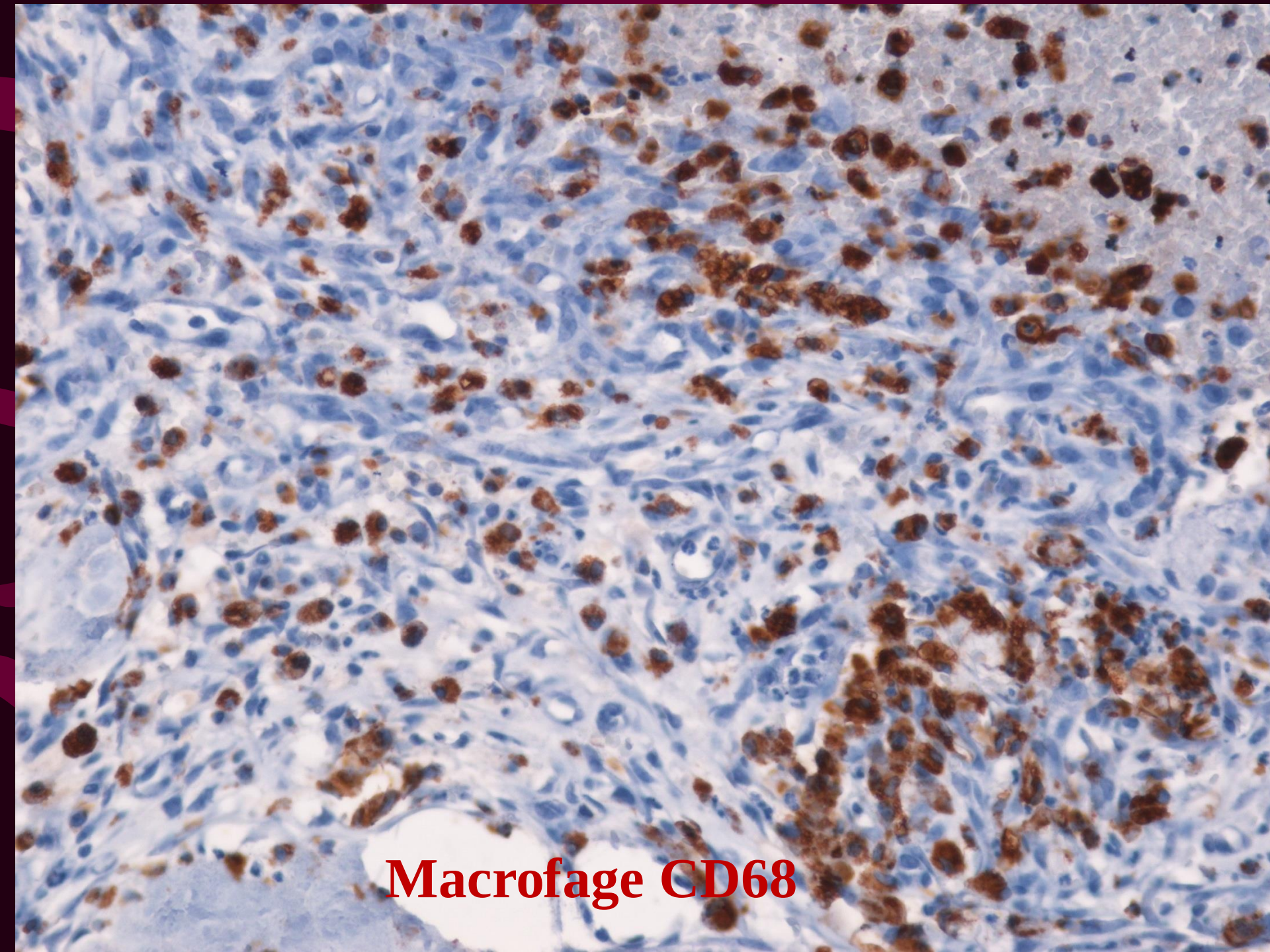
Vase de sange - tesut de granulatie - Alfa - SMA



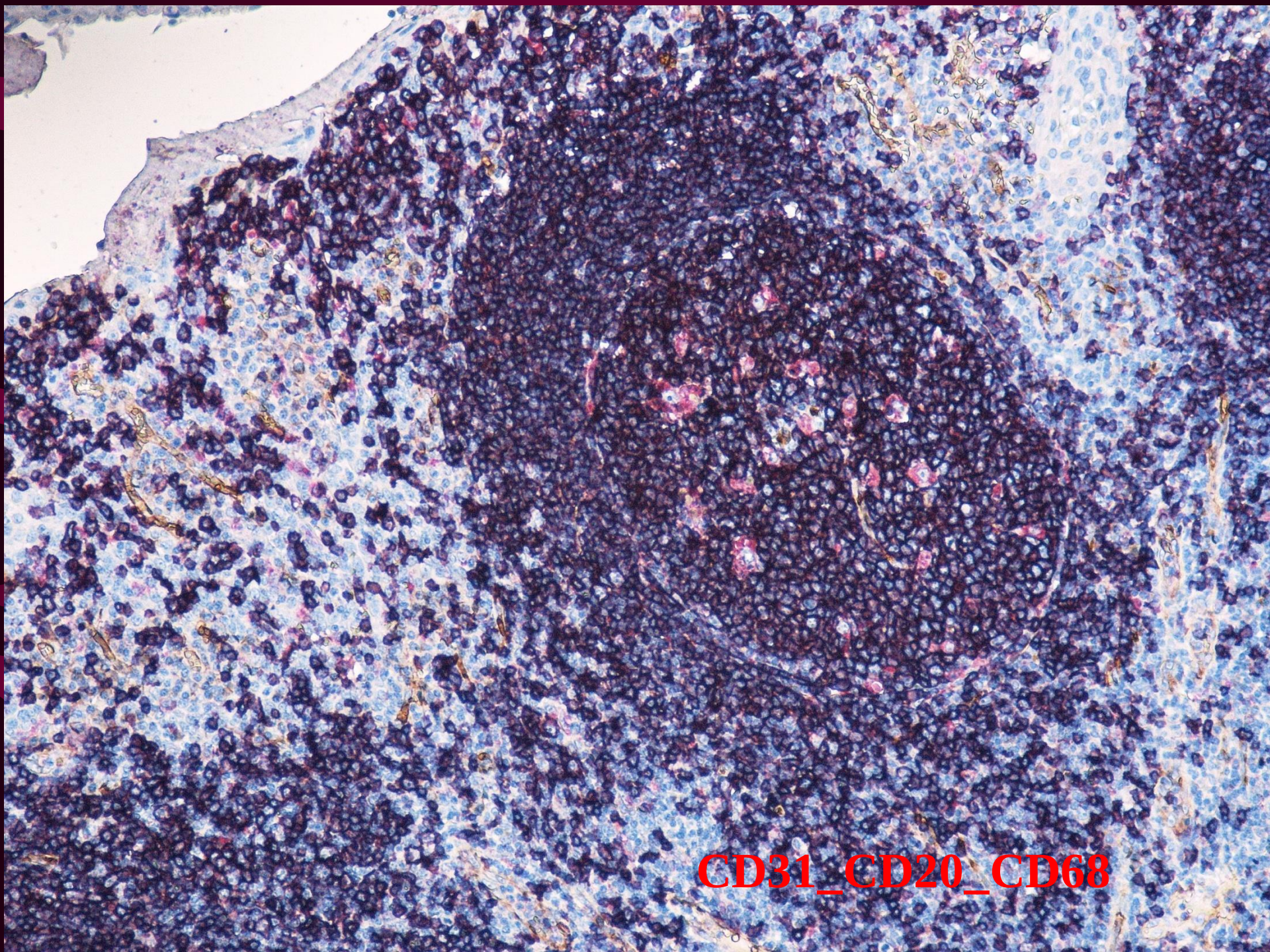
Alfa - SMA



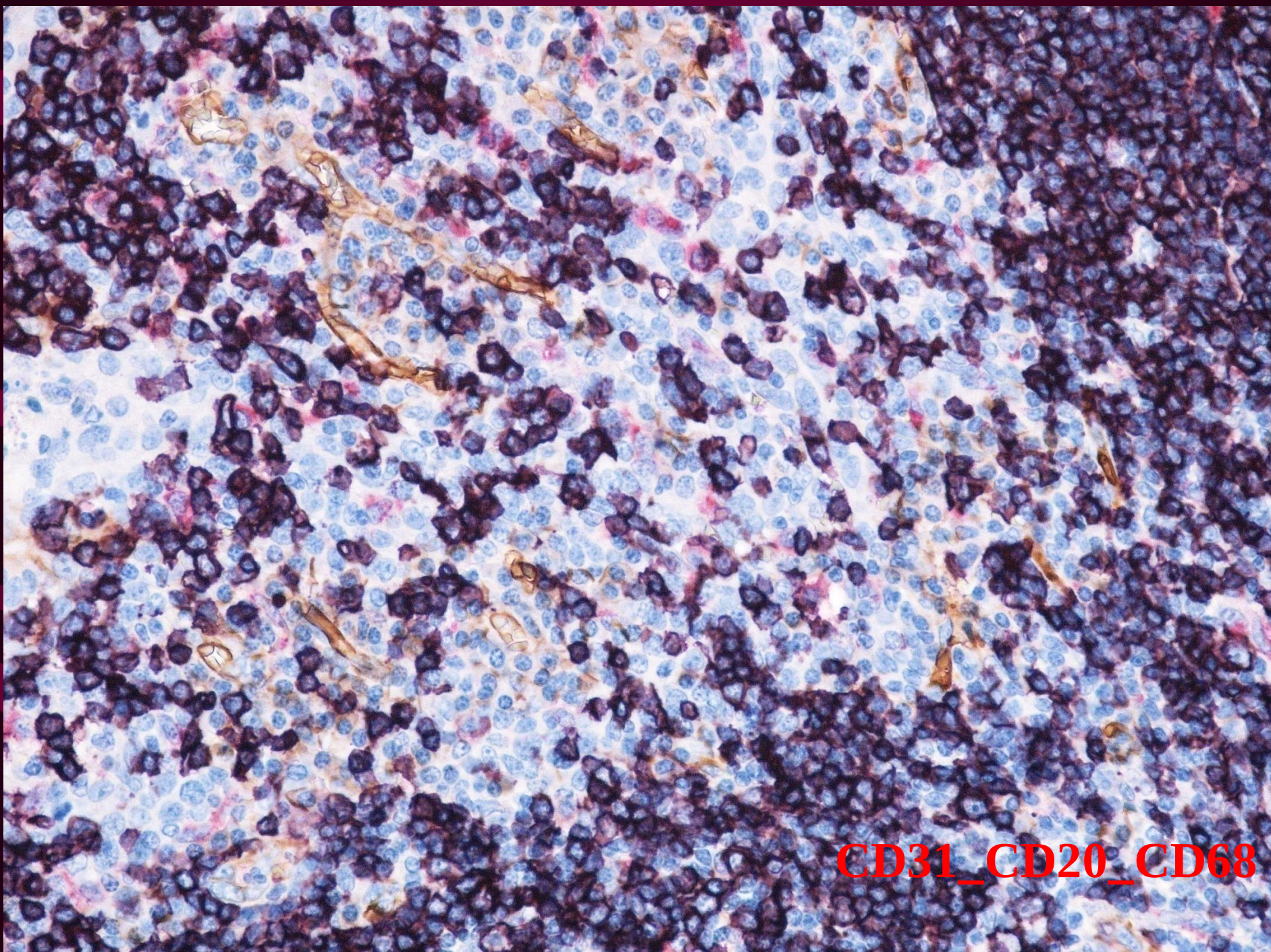
Vase de sange tesut nervos Alfa- naftol



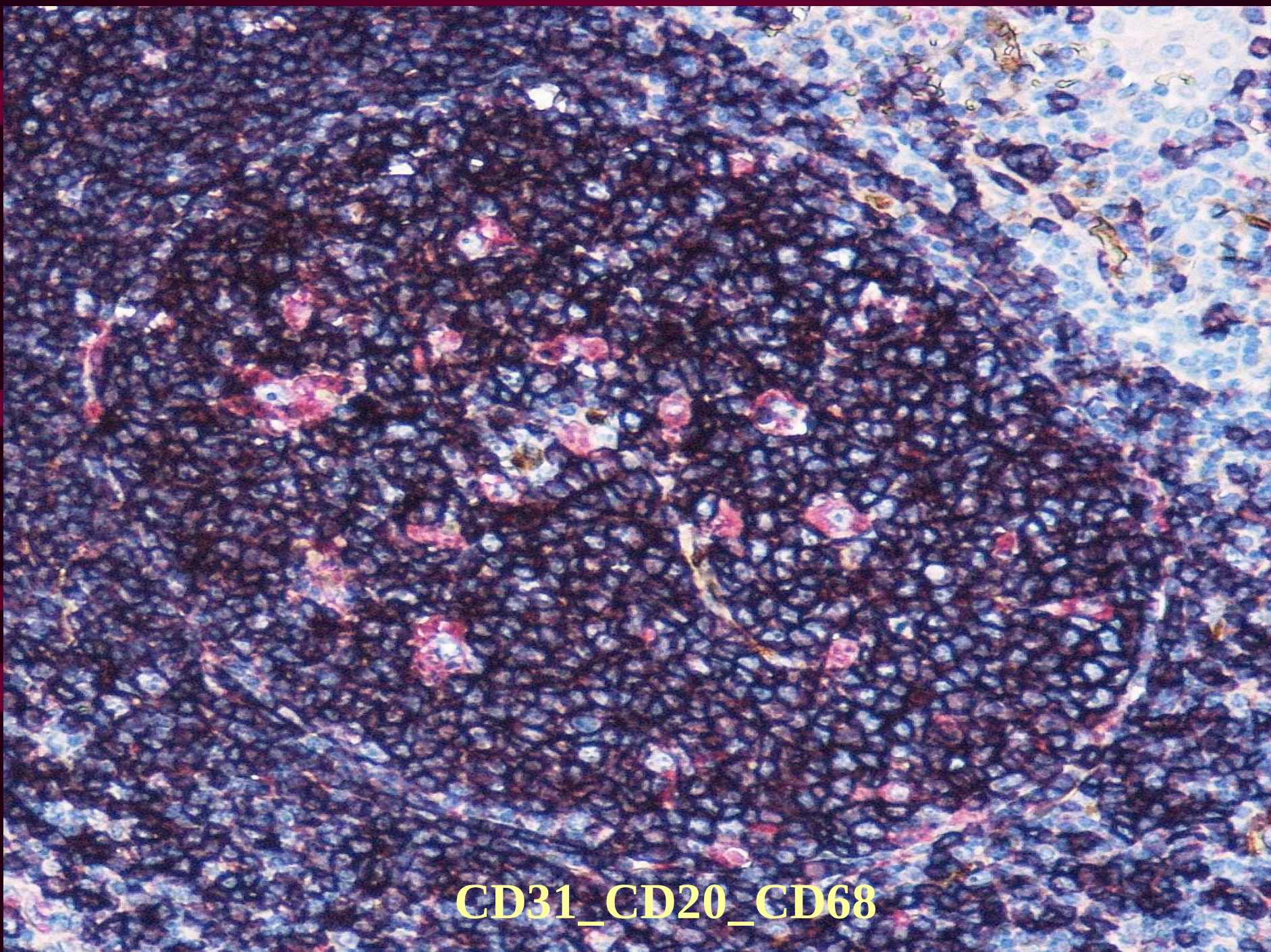
Macrophage CD68



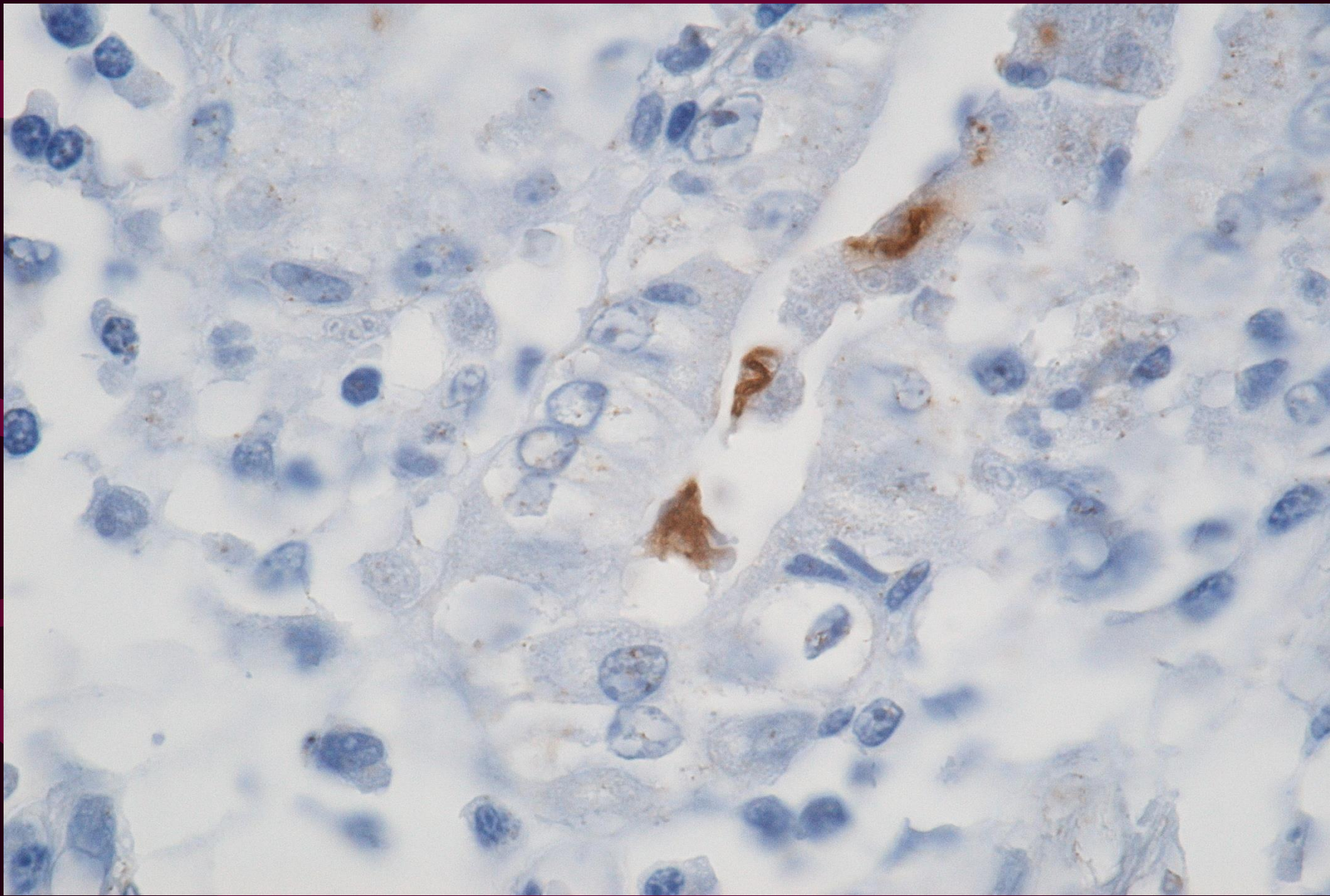
CD31_CD20_CD68



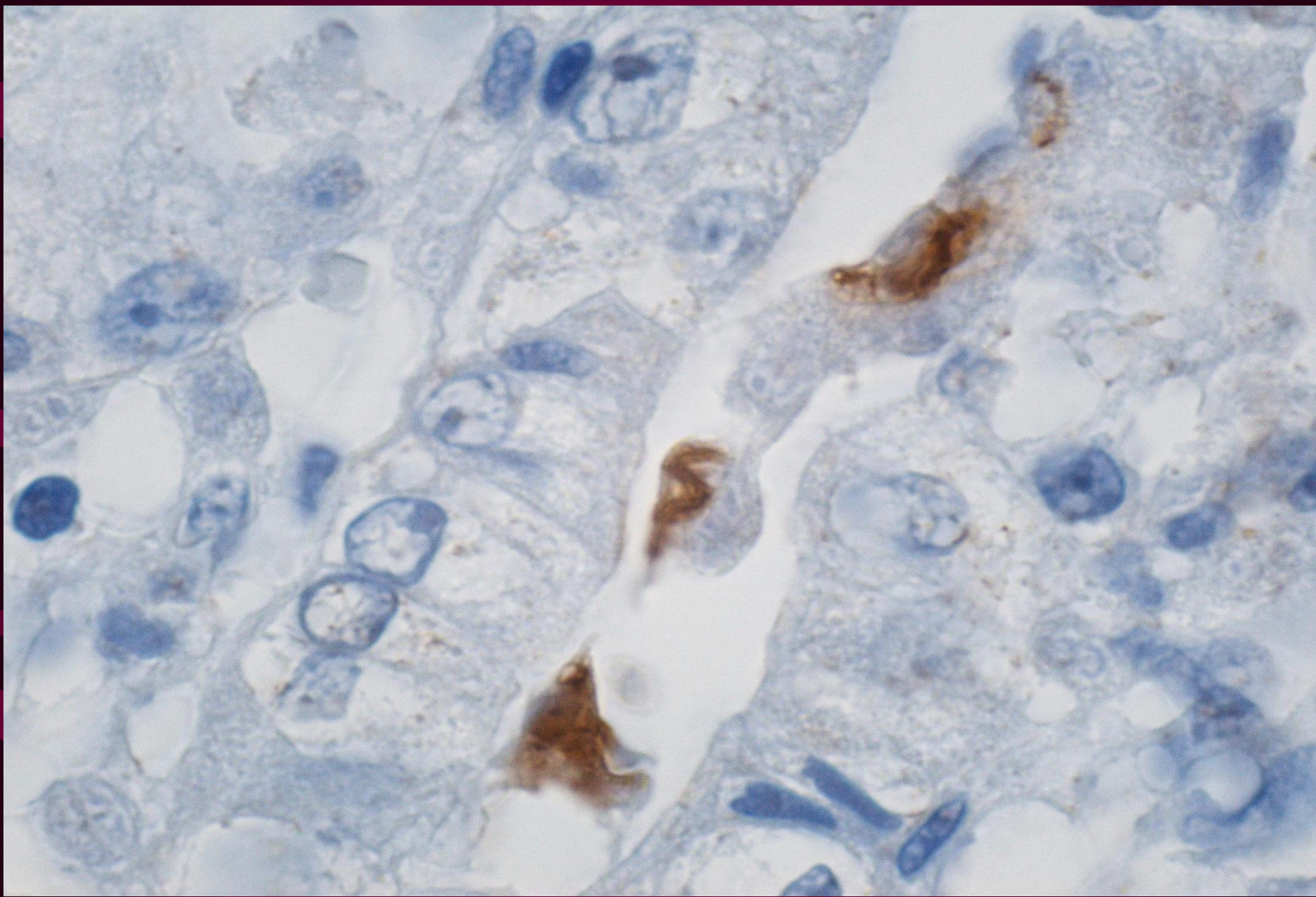
CD31_CD20_CD68



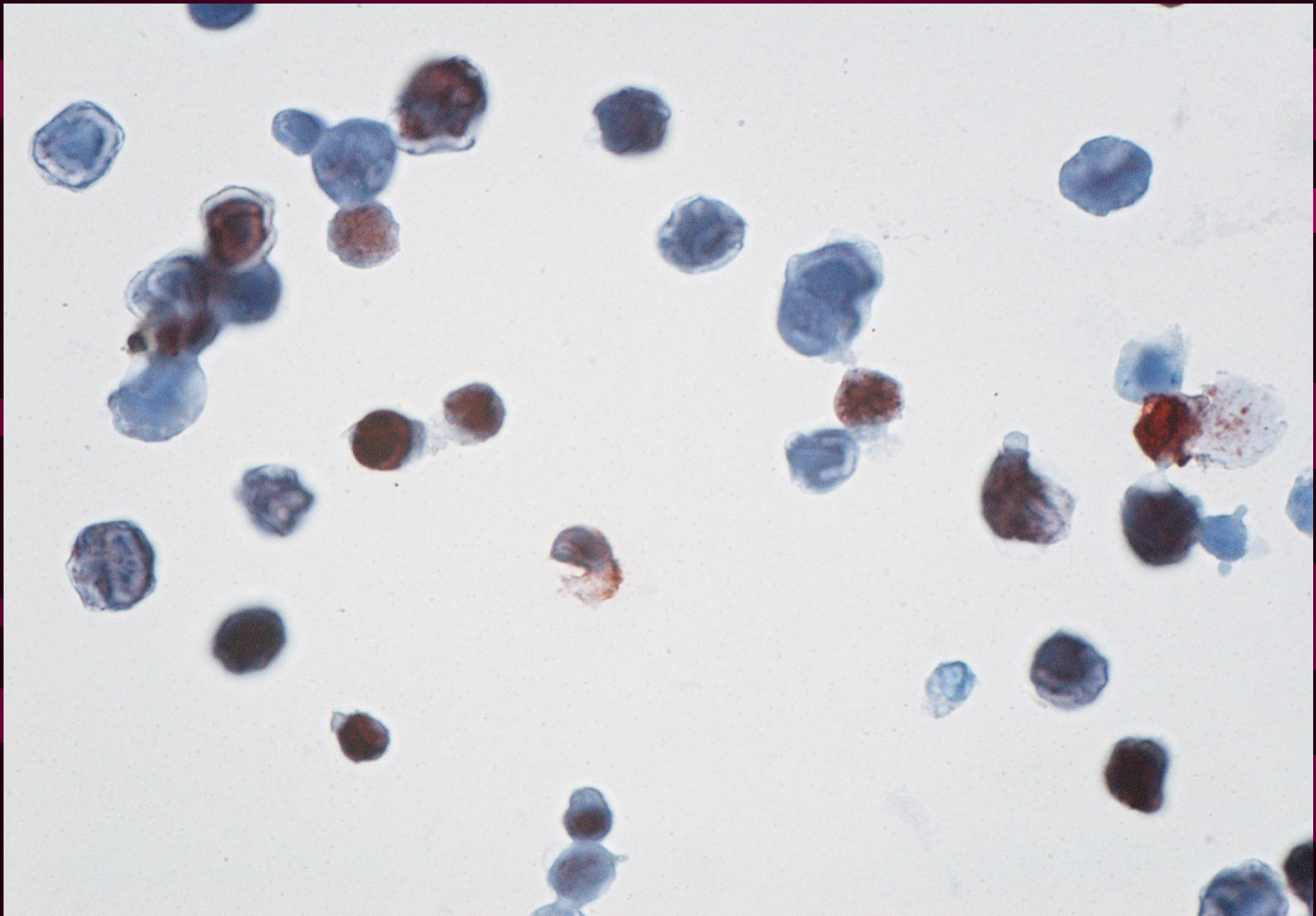
CD31_CD20_CD68



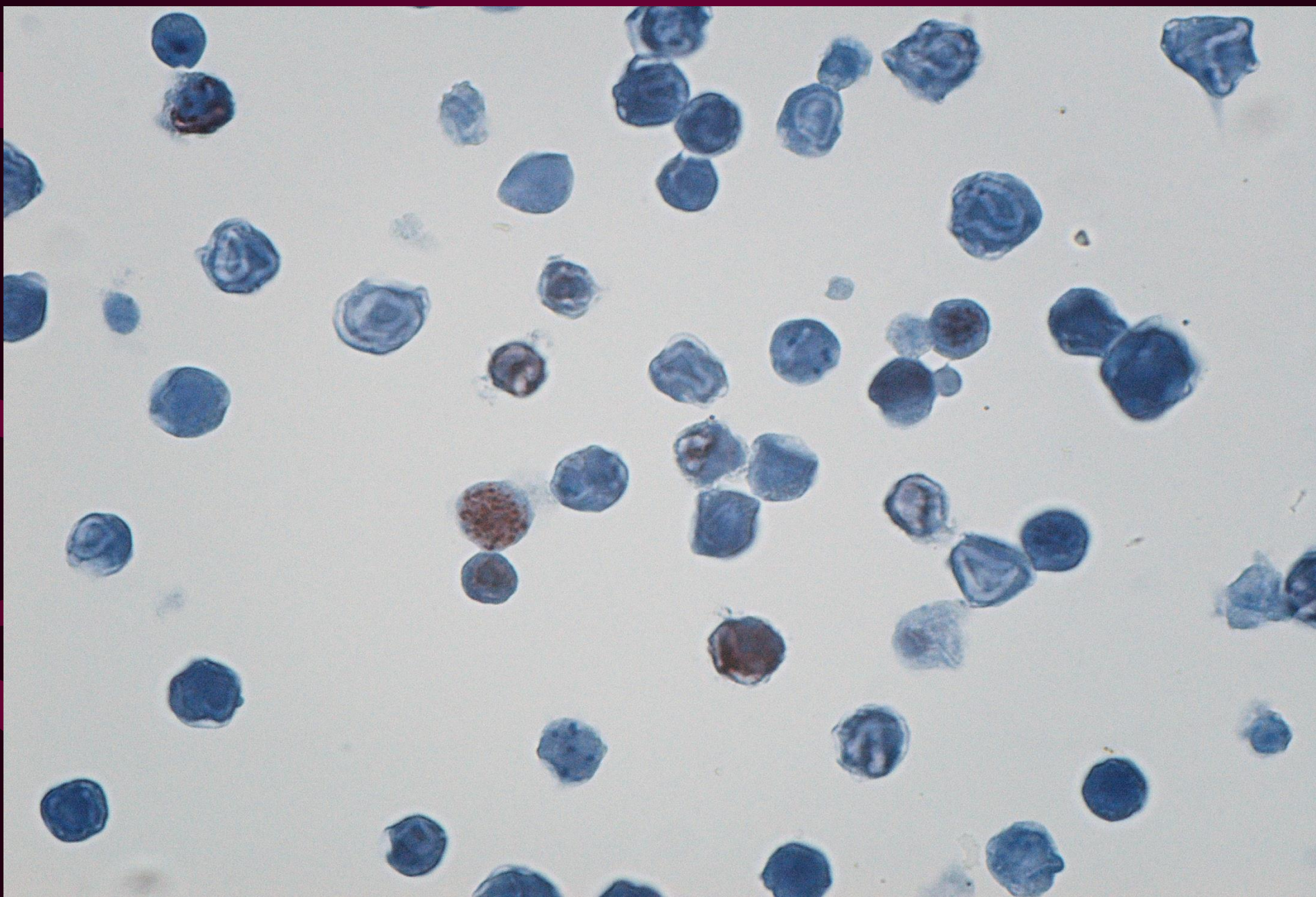
Helicobacter pylori (1)



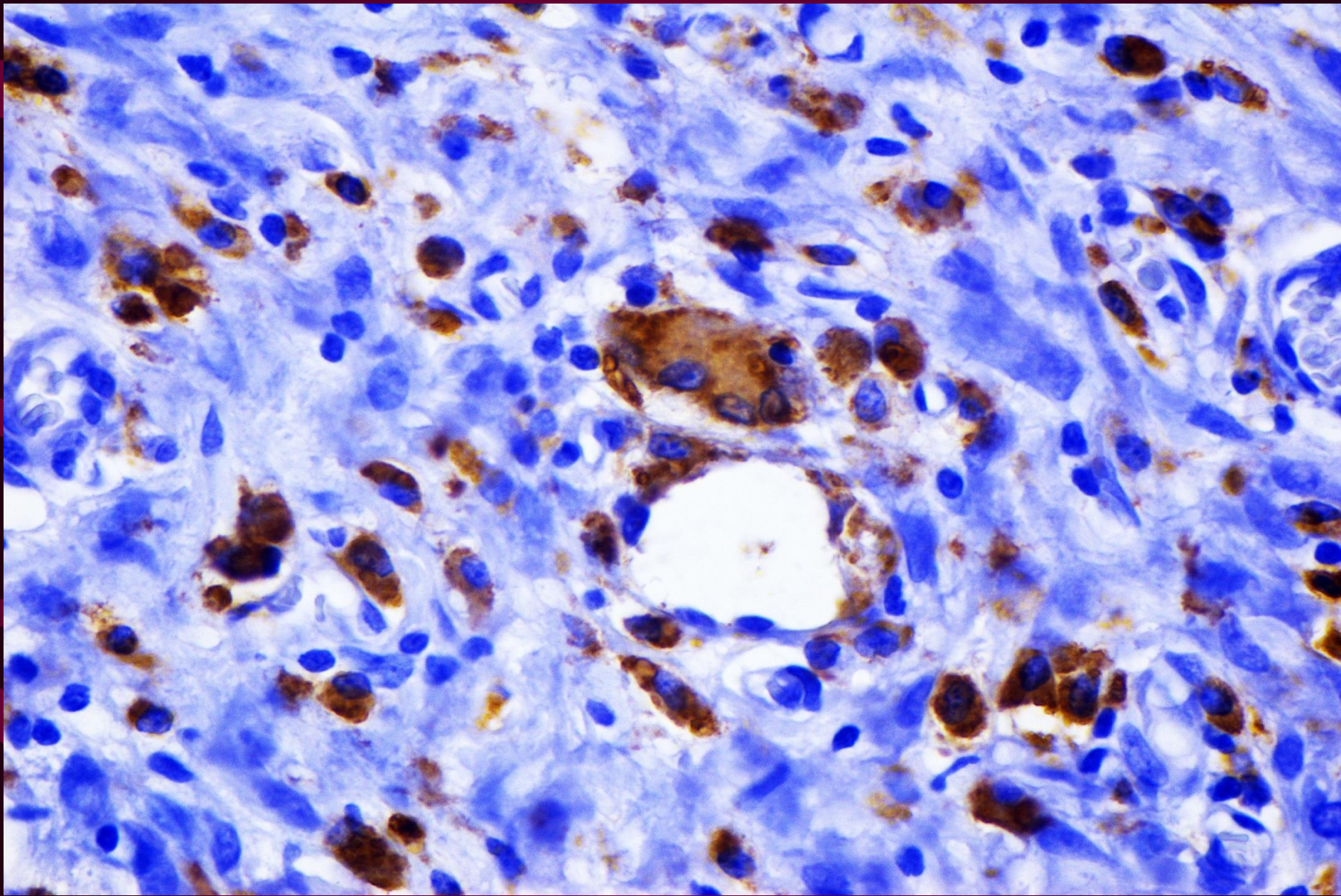
Helicobacter pylori



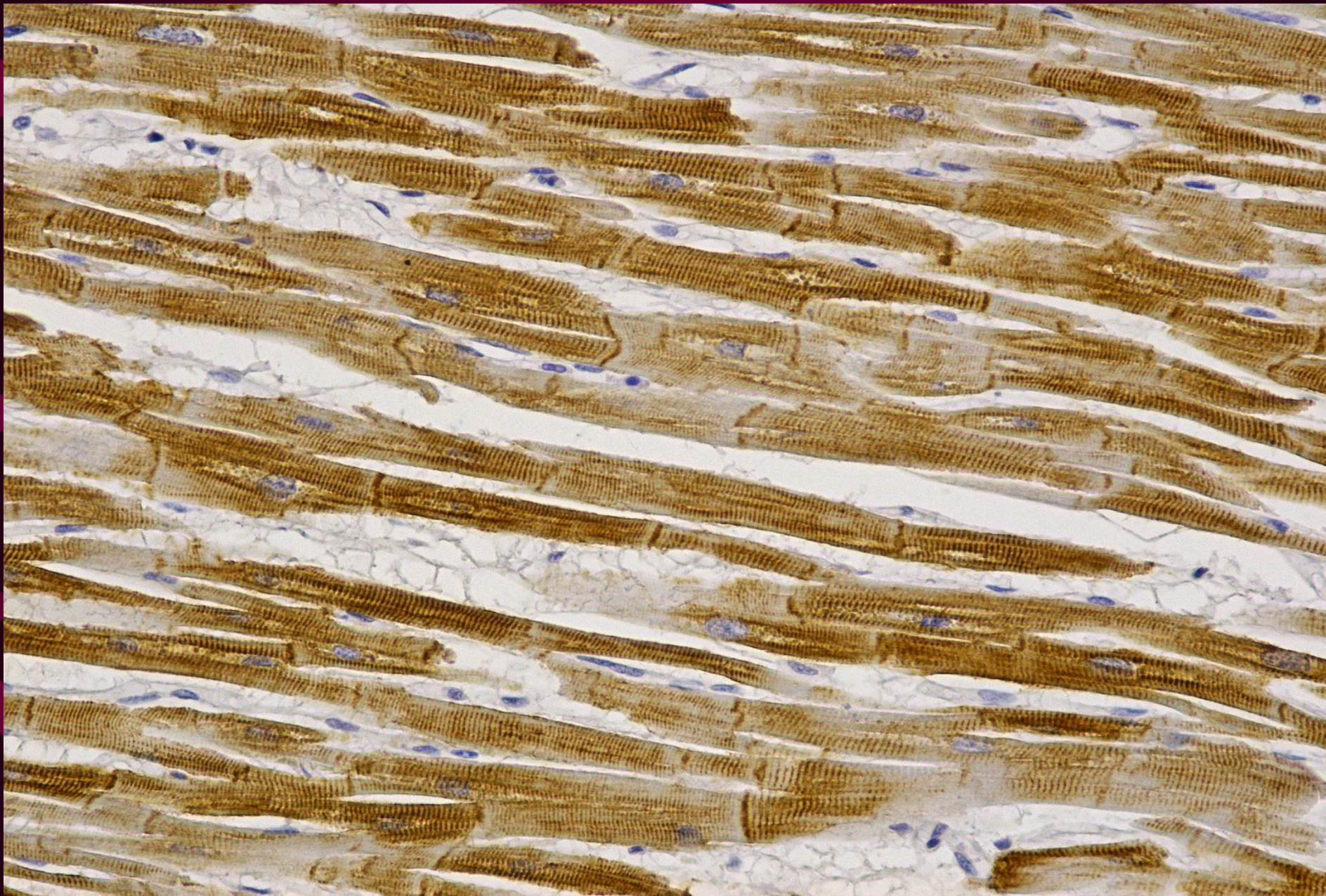
Frotiu vaginal - Human Papiloma Virus (HPV)



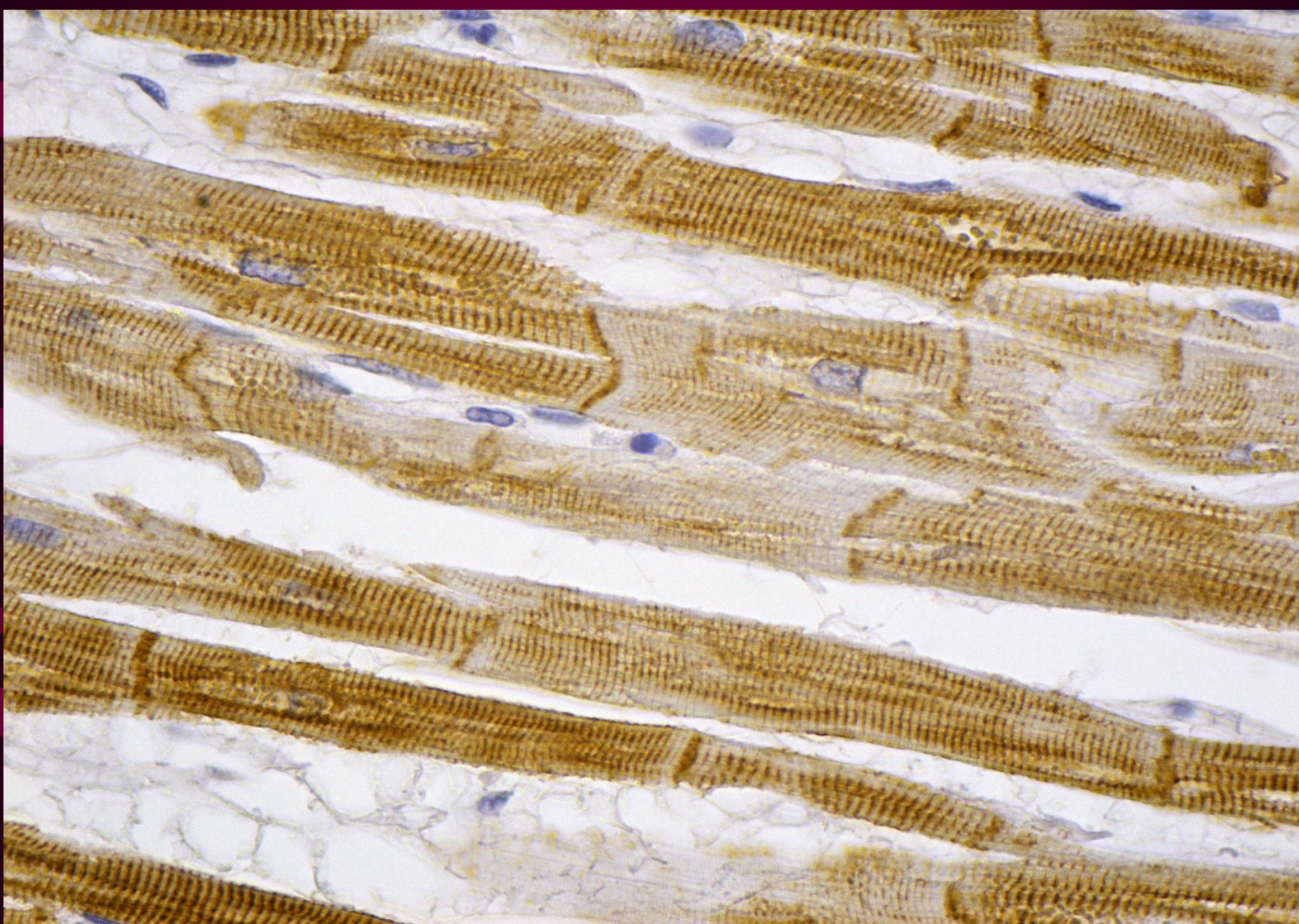
HPV



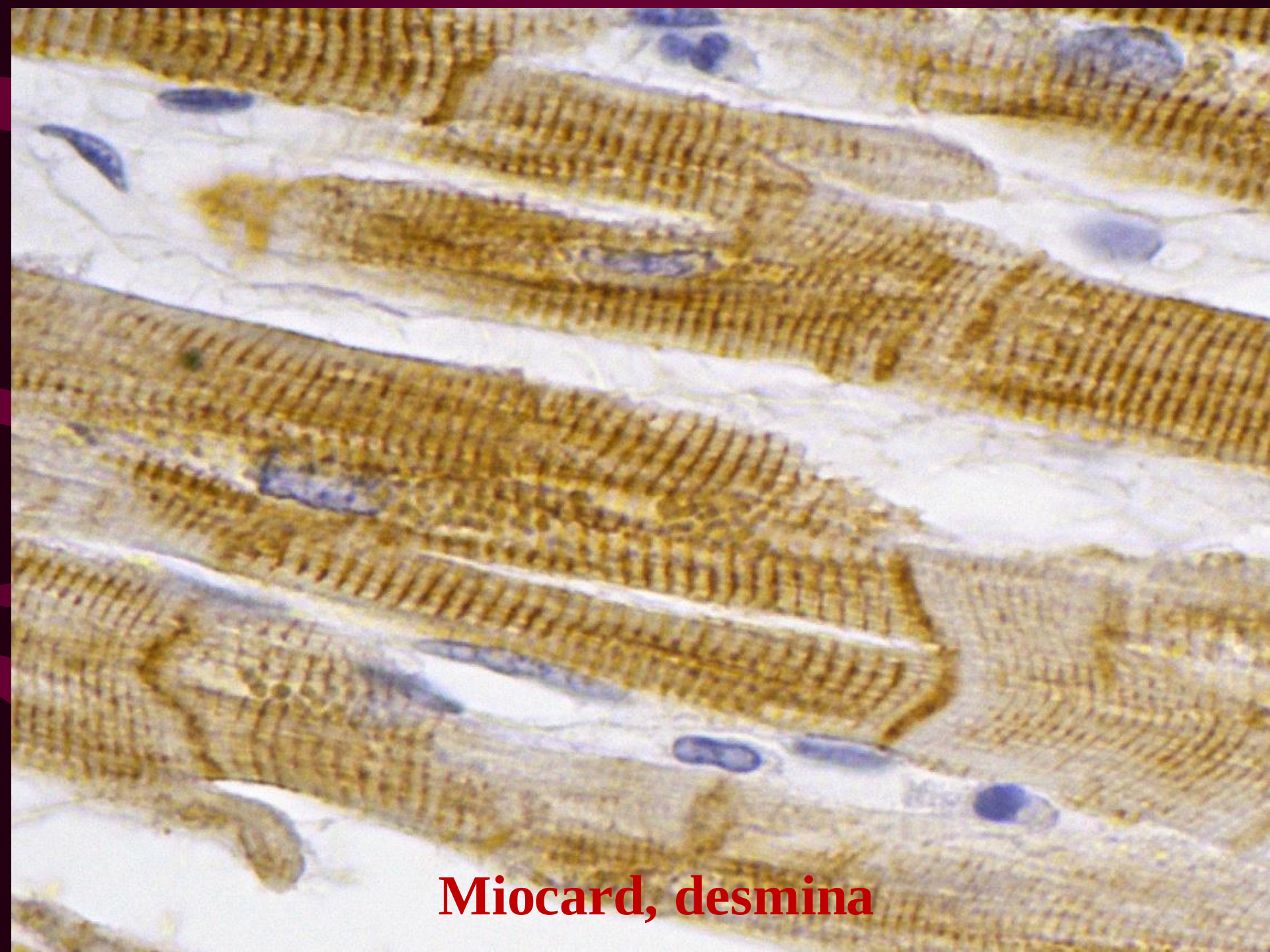
Macrofage CD 68, țesut de granulație



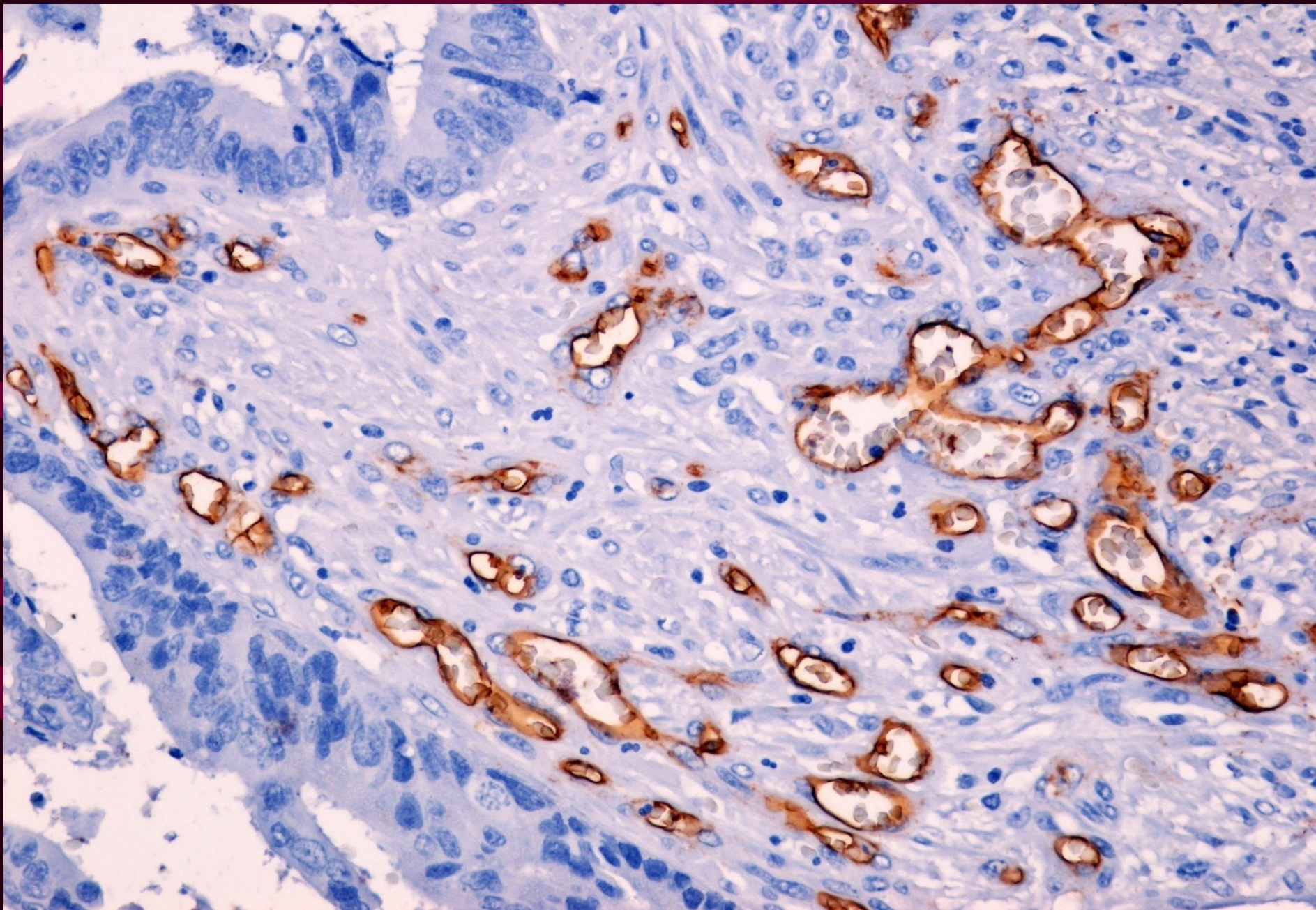
Miocard, desmina



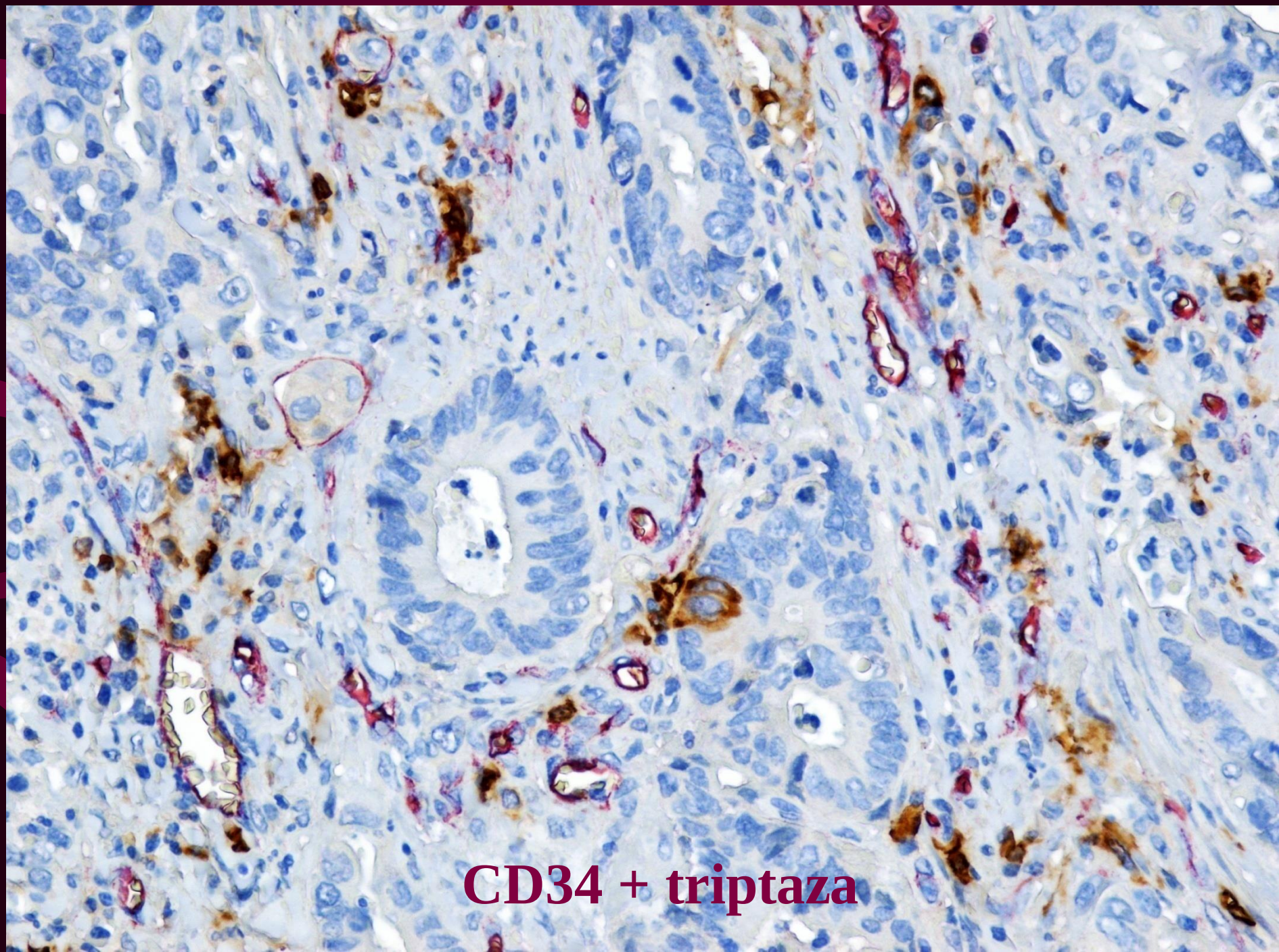
Miocard, desmina



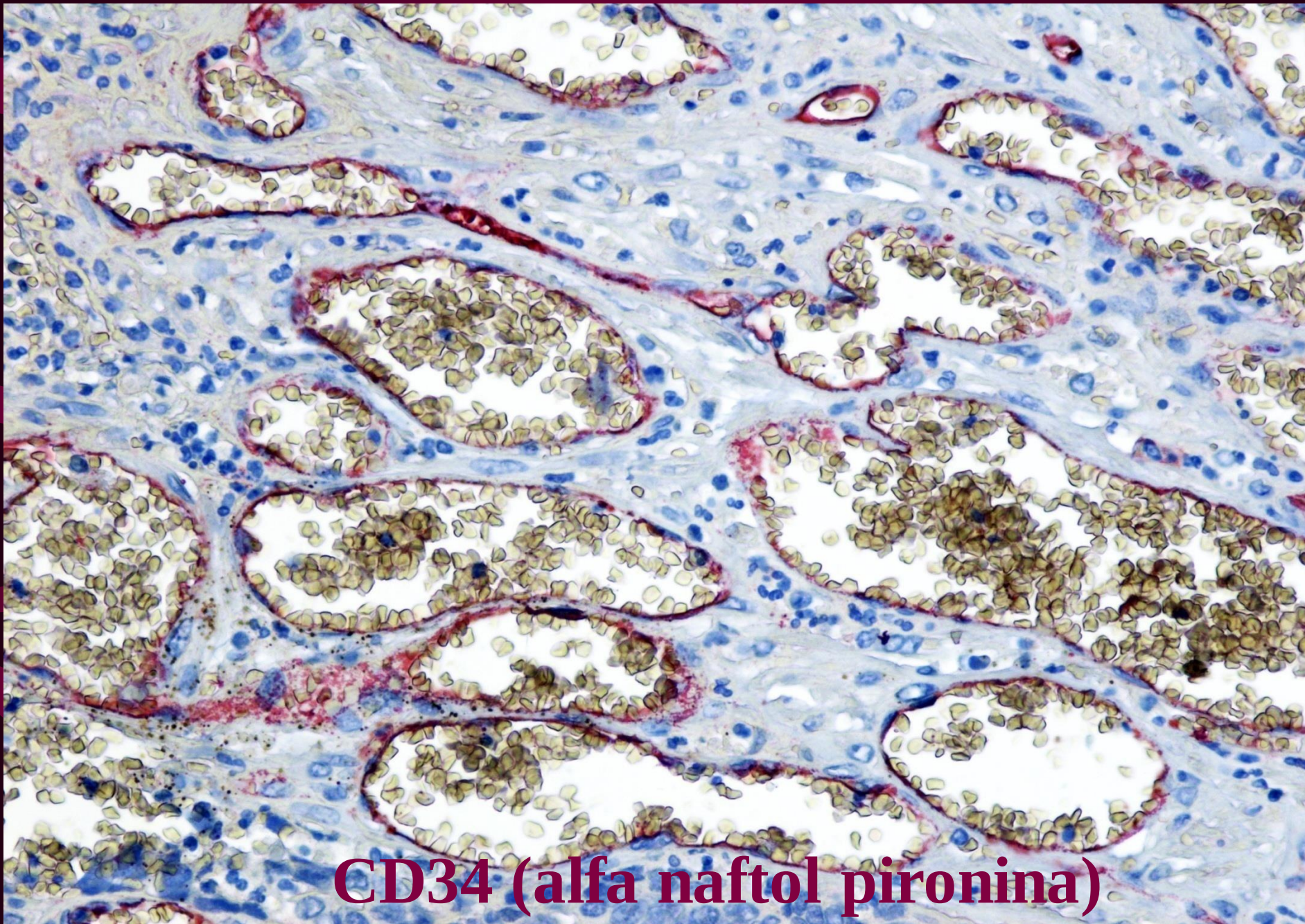
Miocard, desmina



Neoplasm de colon CD34



CD34 + triptaza



CD34 (alfa naftol pironina)