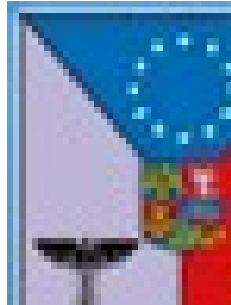


UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE CRAIOVA

---



FACULTATEA DE MEDICINA & FARMACIE

# **DISCIPLINA IMUNOLOGIE**

**Lucrari practice**

Sef lucr. dr Mihail Boldeanu

0724515810

# • SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR AL INFECTIILOR BACTERIENE

## ❖ RECOLTAREA SI PRELUCRAREA PRODUSELOR PATOLOGICE

## ❖ DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC

- **Examen direct** – preparat proaspat  
– frotiu fixat si colorat
- **Izolare** – “in vitro” (medii de cultura) **sau** “in vivo” (animal de laborator)
- **Identificare** – caractere de cultura (pe mediul lichid si pe mediul solid)
  - caractere morfologice (dimensiuni, forma, gruparea, prezenta sporilor, a capsulei)
  - caractere metabolice/biochimice (transformarile suferite de glucide, proteine; actiunea reductoare a bacteriilor-pe mediile politrope MIU, TSI)

**Caractere ANTIGENICE**  
( reactii Atg-Atc)



- caractere de patogenitate (testul coagulazei, fibrinolizinei, fermentarii manitei, pigmentogenezei, etc)
- sensibilitate la bacteriofagi/lizotipia (virusuri bacteriene ce produc liza bacteriilor)
- alte caractere
- **Antibiograma**

## ❖ DIAGNOSTIC IMUNOLOGIC :

- **Teste de imunitate umorala** – “in vitro” **sau** “in vivo”
- **Teste de imunitate celulara** – “in vivo” **sau** “in vitro”

# METODOLOGIA DE INVESTIGARE A STATUSULUI IMUN

---

Reactivitatea imună a gazdei poate fi mediată de anticorpi sau de celule :

**Raspuns imun  
umoral**

**Raspuns imun  
mediat celular**

Mecanismele apararii imune, mediate prin Atc sau celule, se intrica in organism in lupta cu agentul ofensiv, prezentarea lor separata se face doar in scop didactic.

# I. EXPLORAREA IMUNITATII UMORALE

## (RASPUNSUL IMUN UMORAL- RIU)

- Raspunsul imun umoral are loc
  - fie la nivel sistemic/circulator → RIU sistemic
  - fie la nivel cutanat/mucoase → RIU local
- Pentru fiecare raspuns imun umoral exista modalitati de investigare specifice
- RIU este realizat cu participarea Ly B (Ly B sunt activate de Atg prin intermediul R membranari specifici de pe suprafata lor → diferite in celule secretorii de Atc = Plasmocite → Atc specifici pentru Atg stimulant ce vor reactiona in vivo → complexe Atg-Atc)

# RIU Sistemic

---

- Investigarea reactivitatii imune umorale sistemice se realizeaza prin:
    - Teste ce apreciaza numarul de Ly B circulante
    - Teste ce investigheaza functionalitatea Ly B
  - **Teste ce apreciaza numarul de Ly B circulante**
  - testul de transformare blastică limfocitară (poate fi folosit si pentru aprecierea numerica a Ly T si poate fi interpretat si ca un test functional) – investigheaza capacitatea Ly B de a secreta factorul mitogen → activeaza alte Ly cu declansarea proliferarii lor celulare → limfoblasti
  - reacții de imunofluorescență
  - citometrie în flux (flow-citometria) – tehnica noua
  - **RIU Local** – prin evaluarea concentratiei imunoglobulinelor IgA secretorii
-

## ➤ **Teste ce investigheaza functionalitatea Ly B circulante**

---

- **- Dozarea principalelor clase de Ig serice(Atc) : Ig G, Ig M, Ig A, Ig D, Ig E prin :**
  - **Tehnica de imunodifuzie radiala simpla (IDRS), metoda MANCINI-CARBONARA**
  - **Tenhica radiometrica RIST (Radio-Immune Sorbent Test) –**  
ce dozeaza Ig din clasa Ig E ce sunt implicate in starile de hipersensibilitate imediate de tip I (reactiile anafilactice)
- ***Electroforeza proteinelor serice***
- ***Investigarea calitativă a imunoglobulinelor în ser, urină, fluidul cerebrospinal (imunoelectroforeza)***
- **Tehnicile cel mai des utilizate sunt reactiile ce au la baza reactia Atg-Atc, ce ne ajuta sa evaluam/titram diferitele categorii de Atc din umori (sange) sau urina LCR**

# REACTIILE ANTIGEN-ANTICORP

---

- ❖ Pentru identificarea unui Atg ca si pentru stabilirea prezentei si titrului Atc-ilor sintetizati in organism se utilizeaza reactiile Atg-Atc.
- ❖ Din considerente didactice aceste reactii au fost impartite in :
  - **Reactii clasice** – reactii folosite la inceputul investigatiilor imunologice
  - **Reactii moderne** – reactii mai fiabile si care ne ofera mai multe satisfactii cand lucram.

## ❖ **REACTIILE CLASICE**

- **Reactia de aglutinare** – Atg face parte in mod natural din suprafata unor structuri particulare care apartin unor agenti infectiosi, eritrocitelor sau este fixat *artificial* pe hematiisau particule anorganice (polistiren latex);
- **Reactia de precipitare** – Atg este reprezentat de o molecula solubila si induce sinteza de Atc specifici precipitanti;

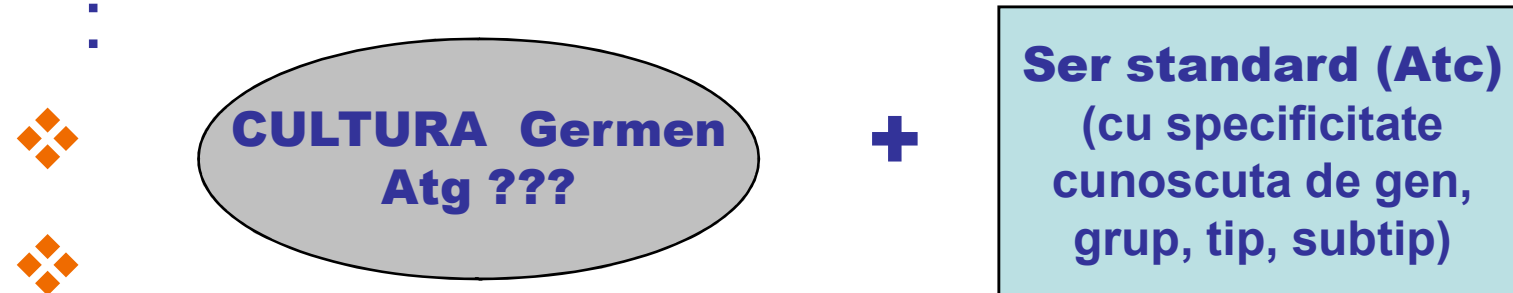
- 
- **Reactia de seroneutralizare** – Atg care prezinta anumite proprietati/ activitate biologica (toxine, enzime, hormoni) induc formarea de Atc sero-neutralizanti care au capacitatea de a le bloca activitatea;
  - **Reactiile cu hematii** – se folosesc de mult timp; se numesc asa pentru ca in cazul reactiilor + prezenta hematiilor cu rol indicator ne ajuta sa stabilim chiar titrul Atc din produsul prelevat de la bolnav.
  - Reactii care utilizeaza hematiile ca indicatori :
    - **HAP, HAI, RFC, ASLO, Testul Coombs**

## **REACTIILE MODERNE**

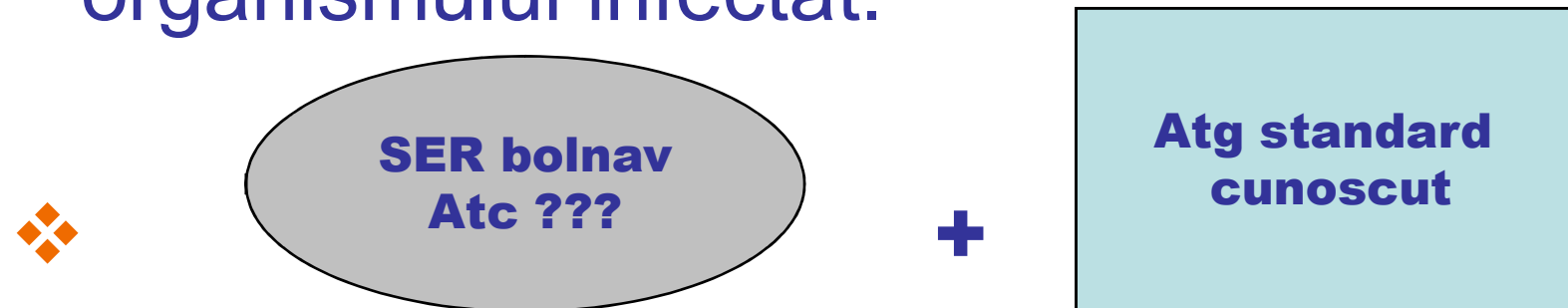
- **Reactiile de imunofluorescenta (IF)**
- **Reactiile RIA ( radioimmunoassay-radio imunotestarea)**
- **Reactia ELISA (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)**

## ❖ **Identificarea serologica** (ex. Identificarea unei specii sau serotip bacterian)

:



## ❖ **Diagnosticul serologic** (metoda indirecta) – investigam reactivitatea organismului infectat.



---

➤ **Exemplu de identificare serologica (antigenica):**

- Incadrarea serologica a enterobacteriilor (Escherichia coli, Salmonella, Shigella), a brucelelor, vibrionilor holerici, gonococilor, etc.

➤ **Exemple de diagnostic serologic :**

- Dg serologic al febrei tifoide si paratifoide A, B – **reactia WIDAL**
- Serodiagnosticul brucelozei – **reactia WRIGHT**
- Dg serologic al tifosului exantematic – **reactia WEIL-FELIX.**

---

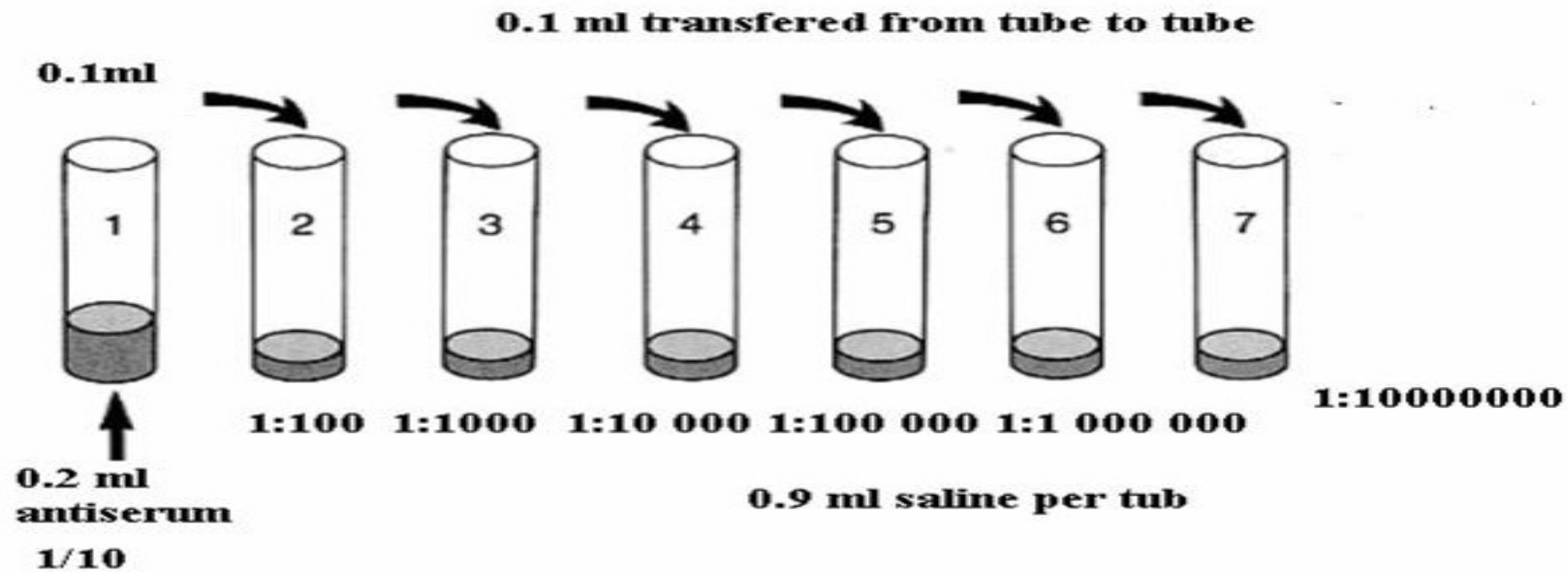
❖ **Diagnosticul serologic** are sens numai in infectiile cu evolutie prelungita sau cronica – Atc depistati in serul bolnavului au semnificatie clinica daca traduc experienta imuna dintr-o infectie actuala; ei sunt fara importanta pentru diagnostic sau prognostic daca au aparut dupa vaccinare.

- In diagnosticul serologic se vor preleva **doua seruri** :
  - **Serul I** de debut
  - **Serul II** de convalescenta (recoltat dupa 10-14 zile de la prima recoltare). Ambele prelevate se vor testa concomitent.
    - ???
  - Trebuie sa observam/urmarim dinamica Atc in timp → sa vedem daca avem diferente intre titrul serului I si cel al serului II → titrul serului II sa creasca cu cel putin 4 dilutii/trepte binare → putem afirma ca avem un raspuns imun

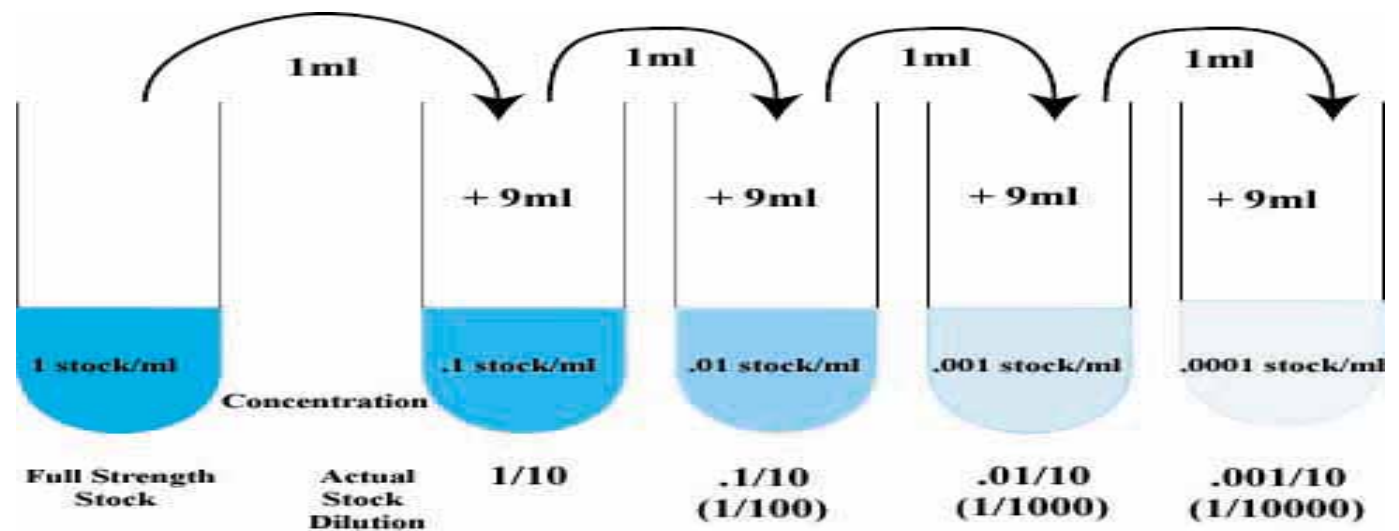
## ***CATEGORII DE DILUTII UTILIZATE IN REACTIILE SEROLOGICE***

### ***Dilutii logaritmice (dilutii cu rata 10) - exemplu***

| <b>Nr.<br/>tub/godeu</b>      | <b>1</b>                                   | <b>2</b>                                    | <b>3</b>                                      | <b>4</b>                                       | <b>5</b>                                             |
|-------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Diluent<br/>(ex.ml)</b>    | <b>1.8</b><br><b>0.2 ml</b>                | <b>1.8</b><br><b>0.2</b>                    | <b>1.8</b><br><b>0.2</b>                      | <b>1.8</b><br><b>0.2</b>                       | <b>1.8</b><br><br><b>se elimina</b><br><b>0.2 ml</b> |
| <b>Produs<br/>patol. (ml)</b> | <b>0.2</b>                                 |                                             |                                               |                                                |                                                      |
| <b>Dilutia<br/>obtinuta</b>   | <b>1/10</b><br><b><math>10^{-1}</math></b> | <b>1/100</b><br><b><math>10^{-2}</math></b> | <b>1/1 000</b><br><b><math>10^{-3}</math></b> | <b>1/10 000</b><br><b><math>10^{-4}</math></b> | <b>1/100000</b><br><b><math>10^{-5}</math></b>       |



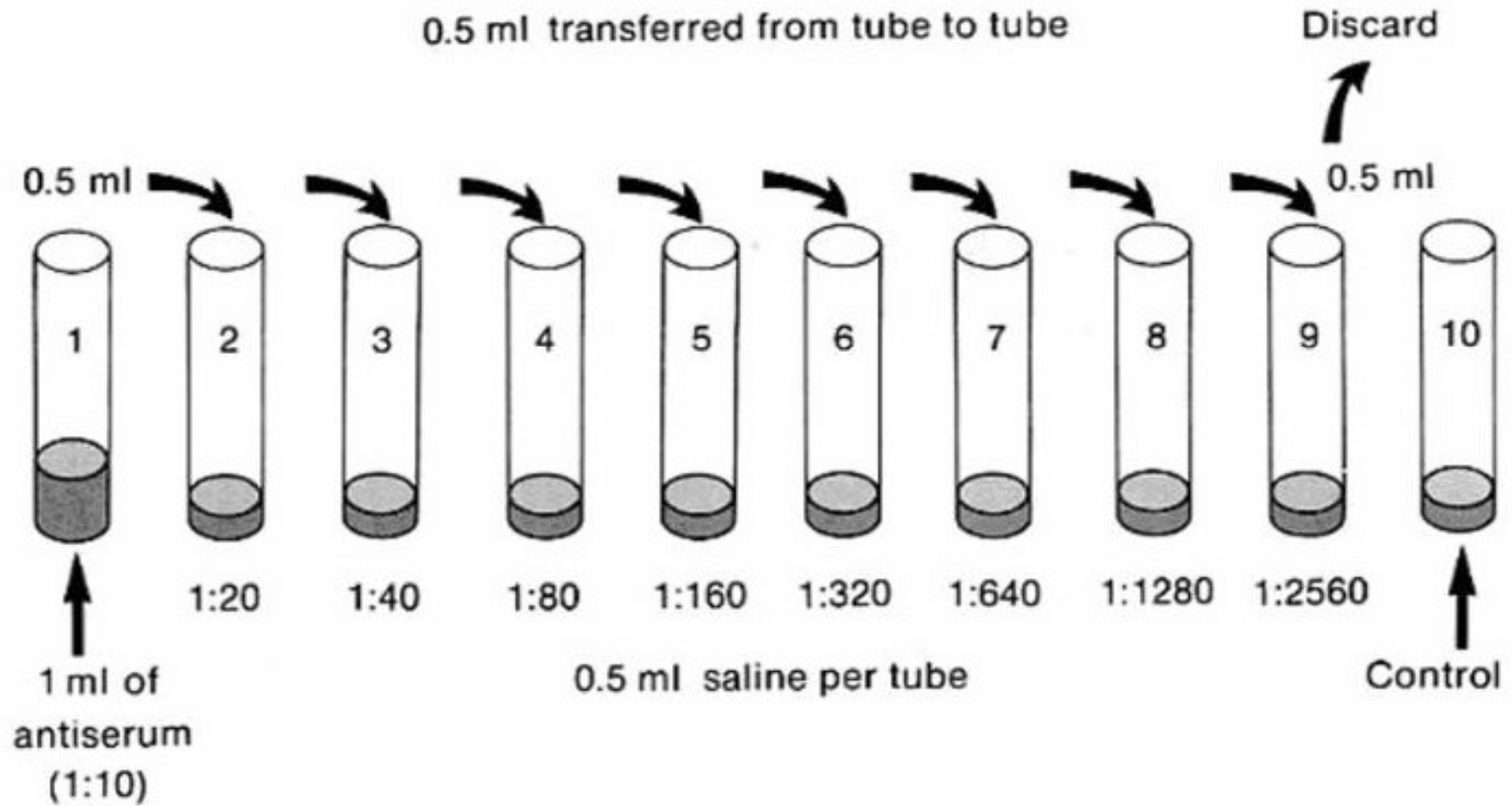
## LOGARITHMIC DILUTIONS



### ***Dilutii binare (cu rata 2) - exemplu***

| <b>Nr.<br/>tub/godeu</b>      | <b>1</b>                | <b>2</b>             | <b>3</b>             | <b>4</b>             | <b>5</b>                              |
|-------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|
| <b>Diluent<br/>(ex.ml)</b>    | <b>1</b><br><b>1 ml</b> | <b>1</b><br><b>1</b> | <b>1</b><br><b>1</b> | <b>1</b><br><b>1</b> | <b>1</b><br><b>se elimina<br/>1ml</b> |
| <b>Produs<br/>patol. (ml)</b> | <b>1</b>                |                      |                      |                      |                                       |
| <b>Dilutia<br/>obtinuta</b>   | <b>1/2</b>              | <b>1/4</b>           | <b>1/8</b>           | <b>1/16</b>          | <b>1/32</b>                           |

# BINARY DILUTIONS



## ***RECOLTAREA SI PREPARAREA SUSPENSIEI DE HEMATII***

- ✓ se recoltează sânge cu o seringă ce conține o mică cantitate de soluție Alsever.
- ✓ se scoate acul de seringă și sângele va fi trecut imediat într-un tub cu soluție Alsever astfel încât să se realizeze diluția 1/4.
- ✓ se amestecă cu grijă și se păstrează la 4°C (14-20 zile)
- ✓ în ziua folosirii se va proceda la o centrifugare de 5 minute la 1000 t/min., iar supernatantul va fi îndepărtat prin absorbție.
- Hematiile vor fi spălate de 3 ori cu TFS (tampon fosfat salin), pH 7,2, prin centrifugare la 1000 t/min.
- Urmează o altă spălare la 1000 t/min. timp de 10 minute, după care supernatantul va fi îndepărtat
- ✓ se prepară apoi suspensia de hematii dorită în TFS. (0,5%, 1%, 1,5%)
- ✓ ***Reacții serologice care utilizează suspensii de hematii de diferite specii, ca indicatori ai reacției antige anticorp :***

HAI

HAP

RFC

ASLO

Testul Coombs

- **//. EXPLORAREA IMUNITATII CU MEDIERE CELULARA  
(Raspunsul imun intermediat de celule - RIC)**

---

- Raspunsul imun mediat celular este directionat in special impotriva unor celule care exprima Atg ( celule straine, tumorale, infectate cu agenti patogeni).
- Raspunsul imun celular este mediat de **Ly T** - specifice, sensibilizate, care actioneaza asupra celulelor tinta direct sau prin intermediul unor mediatori solubili; si de **macrofage**.
- Investigarea imunitatii celulare poate fi realizata *in vivo* si *in vitro*.
- **Teste ce evalueaza numeric populatiile si subpopulatiile de Ly T**
- **Teste ce evalueaza functionalitatea Ly T**
- **Teste ce evalueaza numeric populatiile si subpopulatiile de Ly T** – teste asemanatoare celor de evaluare numerica a Ly B :
  - Teste de rozetare
  - Tehnici de imunofluorescență
  - Citometria în flux

## ➤ Teste ce evalueaza functionalitatea Ly T

### ➤ Teste *in vitro* :

---

- **Testul de transformare blastică Ly T** – investigheaza capacitatea Ly T de a elibera *factori mitogeni* → activeaza alte Ly cu declansarea proliferarii lor celulare → limfoblasti.
- **Testul de inhibiție a migrării macrofagelor** – urmareste daca Ly T ale pacientului elaboreaza factorul solubil de inhibitie al migrarii macrofagelor; in vivo determina blocarea macrofagelor in procesul inflamator = rol important.
- 
- **Testul de citotoxicitate imună** – verifica daca Ly T prelevate de la bolnav sunt capabile sa elaboreze factorul solubil numit limfotoxina (TNF  $\beta$ ), care determina pe culturi celulare efecte de citotoxicitate.
- **Studiul citokinelor** – dozarea citokinelor (interleukinelor) elaborate de Ly T sau macrofage.

## ❖ TESTE DE IMUNITATE CELULARĂ IN VIVO

- - Intradermoreacțiile de tip tuberculinic

### **III. INVESTIGAREA UNOR EFECTORI COMUNI APARARII ÎNNASCUTE SI APARARII DOBÂNDITE**

---

- **Investigarea complementului**
  - Investigații cantitative pentru componente individuale (C3, C4, C1q)
  - Teste funcționale
  
- **Studiul polimorfonuclearele neutrofile și monocitelor**
  - Cuantificare
  - Teste funcționale in vitro
  - Investigarea celulelor NK

# SITUATII ÎN CARE SE IMPUNE INVESTIGAREA RĂSPUNSULUI IMUN

---

- **Situațiile în care se impune investigarea răspunsului imun în scopul stabilirii agentului cauzal al unei boli infecțioase și urmării reactivității imune a gazdei:**
  - agentul etiologic este cantonat în zone inabordabile prelevării produselor patologice (bruceloză, leptospiroză, sifilis latent etc) ;
  - cultivarea agentului infecțios pe medii de cultură este dificilă sau chiar imposibilă (rickettsii, Treponema pallidum, virusuri etc);
  - izolarea agentului infecțios din prelevatul patologic a fost ratată din cauze diferite: investigații tardive, utilizarea unor tehnici cu sensibilitate și specificitate reduse;
  - semnificația clinică a unor prelevate este discutabilă (recoltarea unor probe nerelevante pentru perioada în care se află bolnavul);
  - pentru diagnosticul diferential in cazul unor afectiuni care prezinta variante cu manifestari clinice asemanatoare (Lupusul eritematos sistemic cu formele subacut, cronic sau medicamentos; hepatite cr virale de hepatitele autoimune).

## ***RECOLTAREA SI PREGATIREA PRODUSELOR PATOLOGICE IN VEDEREA EFECTUARII REACTIILOR IMUNOLOGICE***

---

### ***❖ Colectarea, prepararea și conservarea probelor***

- cel mai frecvent se lucrează pe probe de sânge recoltate la debutul afecțiunii și în perioada de convalescență (pentru testările serologice) după care urmează separarea cheagului prin centrifugare în cel mult 4 ore de la recoltare, după procedura standard ;
- nu se impun condiții speciale de pregătire a pacientului pentru prelevarea probelor ;
- tuburile vor fi închise etanș, pentru evitarea contaminării și depozitate la temperaturi între +2° și +8 °C - timp de 3 zile sau prin congelare - timp de 6 săptămâni.
- Se elimină serurile lipemice, hemolizate și icterice.



**dezinfecție**



**puncționarea venei**



**colectare în vas steril închis**

**Etapelor de recoltare corectă a probelor de sânge  
(dezinfecție, puncționarea venei, colectare în vas steril închis)**