

• SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR AL INFECTIILOR BACTERIENE

❖ RECOLTAREA SI PRELUCRAREA PRODUSELOR PATOLOGICE

❖ DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC

- **Examen direct** – preparat proaspăt
– frotiu fixat și colorat
- **Izolare** – “in vitro” (medii de cultura) sau “in vivo” (animal de laborator)
- **Identificare** – caractere de cultura (pe mediul lichid și pe mediul solid)
 - caractere morfologice (dimensiuni, forma, gruparea, prezenta sporilor, a capsulei)
 - caractere metabolice/biochimice (transformările suferite de glucide, proteine; acțiunea 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”

Identificarea serologica (ex. Identificarea unei specii sau serotip bacterian) :

CULTURA Germen
Atg ???

+

Ser standard (Atc)
(cu specificitate cunoscuta de gen, grup, tip, subtip)

Diagnosticul serologic (metoda indirecta)

– investigam reactivitatea organismului infectat.

SER bolnav
Atc ???

+

Atg standard
cunoscut

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

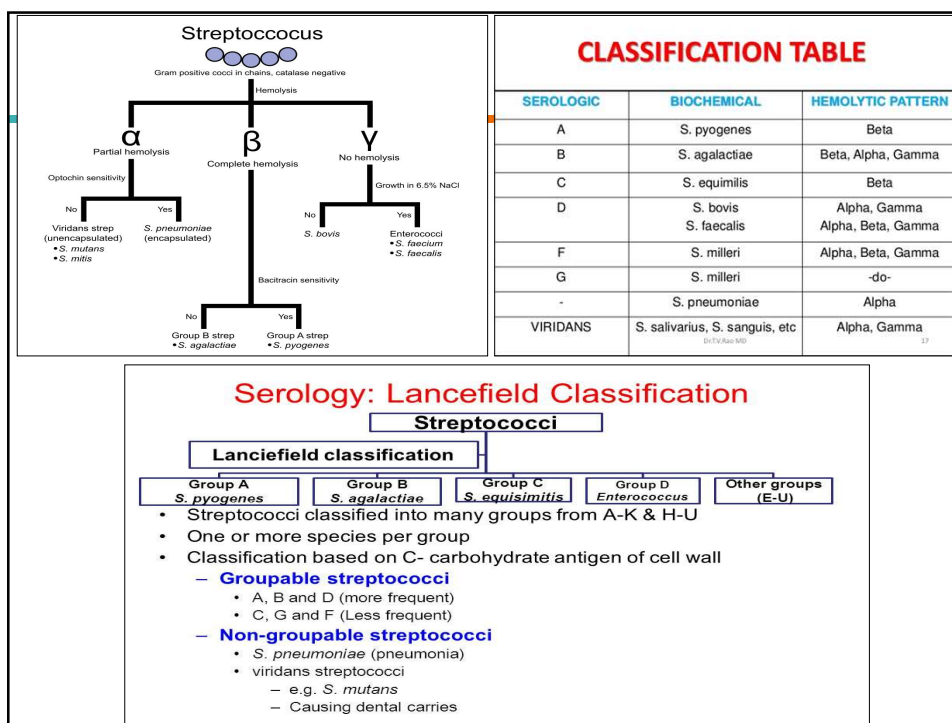
- Incadrarea serologica a enterobacteriilor (Escherichia coli, Salmonella, Shigella), a brucelelor, vibriunilor holerici, gonococilor, etc.

➤ **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.**

CLASSIFICATION TABLE

SEROLOGIC	BIOCHEMICAL	HEMOLYTIC PATTERN
A	S. pyogenes	Beta
B	S. agalactiae	Beta, Alpha, Gamma
C	S. equimilis	Beta
D	S. bovis S. faecalis	Alpha, Gamma Alpha, Beta, Gamma
F	S. milleri	Alpha, Beta, Gamma
G	S. milleri	-do-
-	S. pneumoniae	Alpha
VIRIDANS	S. salivarius, S. sanguis, etc Dr.T.V.Rao MD	Alpha, Gamma 17



❖ **Diagnostic 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

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

Dilutii binare (cu rata 2) - exemplu

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

REACTIA DE AGLUTINARE

- Reactia de aglutinare a fost propusa ca tehnica in 1896 de Widal si este una dintre reactiile Atg-Atc cea mai adesea folosita in practica.
- Aglutinarea reprezintă fenomenul de agregare a unor particule prin intermediul anticorpilor.
- In reacția de aglutinare antigenul face parte
 - **in mod natural** din suprafața unor structuri particulare care aparțin unor agenți infecțioși, eritrocitelor sau
 - **fixat artificial** pe hematii sau particule anorganice (polistiren latex).
- Anticorpilor specifici adăugați la suspensia alcătuită din astfel de particule se combină cu antigenele de suprafață pe care le leagă împreună constituind agregate vizibile numite **AGLUTINATE**.
- In anumite situatii particulele pot fi acoperite natural de Atg de testat avand loc o **AGLUTINARE DIRECTA**
- In alte cazuri anumite particule inerte (bentonita, latexul) sau hematiile constituie suportul pentru fixarea artificiala a unor Atg solubile realizand o **AGLUTINARE INDIRECTA**.
- Fenomenul de aglutinare depinde de valenta Atc (Atc din clasa Ig M sunt mult mai aglutinanti decat cei Ig G).

➤ AGLUTINAREA DIRECTA

- **PRINCIPIU** - Aglutinarea directa se realizeaza in principal prin reactia dintre antigenele naturale ale unor particule si anticorpilor specifici.

➤ APLICATII - in bacteriologie si imunologie

Identificarea Atg bacteriene (identificarea serologica)
cu ajutorul *serurilor standard* obtinute pe animale imunizate cu antigenele respective

Evidentierea Atc specifici (diagnosticul serologic)
din serul pacientilor, in prezenta unor *suspensii microbiene cunoscute (standard)*

- **TEHNICA REACTIEI** – Aglutinarea se poate obtine prin 2 proceduri

AGLUTINAREA PE LAMA

- o picătură din **serul aglutinant standard**, în care se emulsionează o porțiune din cultura **germenului de identificat** → suspensie omogenă
→ se imprimă lamei o mișcare de înclinare
→ se lasă în repaus 1-2 minute
- **CORRESPONDENȚĂ IMUNĂ** între Atg de identificat și Atc standard → **grunji**
→ R +
- când suspensia rămâne **omogen-tulbure** → R –
- **MARTORUL** – o picatura ser fiziologic + se suspensioneaza o ansa din cultura de identificat → **trebuie sa prezinte un aspect tulbure, fara grunji**

AGLUTINAREA IN TUBURI

- utilizată fie pentru confirmarea aglutinării pozitive pe lamă (identificarea serologică),
- fie pentru stabilirea titrului de anticorpi din serul bolnavului, în cadrul serodiagnosticului.

AGLUTINAREA PE LAMA



- În **identificarea serologică** se efectuează diluții succesive din serul aglutinant cunoscut (de la diluția 1/10 până la titrul indicat pe fiolă) + în contact cu cantități constante de Atg necunoscut (reprezentat de cultura germenului în suspensie) → incubarea → stabilirea titrului anticorpilor aglutinanți (ultima diluție a serului standard care a mai aglutinat antigenul). Dacă acest titru corespunde cu cel de pe fiolă sau este cel puțin jumătate din acesta, se concluzionează asupra corespondenței Atg-Atc.
- Pentru stabilirea titrului de anticorpi din serul bolnavului (**diagnosticul serologic**) se parcurg următoarele etape: într-o serie de tuburi se introduc volume constante din diluții crescânde ale serului de testat + un volum constant din suspensia de antigen standard → incubare → se citește reacția: diluția cea mai înaltă a serului de bolnav la care se mai notează prezența grunjiilor stabilește titrul anticorpilor aglutinanți.
- Reacția de aglutinare este folosită pentru diagnosticul serologic al unor afecțiuni cum sunt: **febrele tifoide și paratifoide (reacția Widal)**.

REACTIA WIDAL

PRINCIPIU - evidențierea aglutininelor O și H în serul bolnavilor afectați de febra tifoidă și paratifoidă.

Aglutinare de tip H (hauch=val) : produsa de o suspensie de celule bacteriene flagelate in cursul careia se formeaza flocoane bacteriene mari;

Aglutinarea de tip O sau somatica (ohne hauch=fara val) : produsa de bacteriile imobile; se formeaza conglomerate celulare dense, compacte, in care celulele bacteriene reactioneaza prin intermediul Atg somatice reprezentate de LPS (lipopolizaharide= componente majore ale suprafetei celulelor Gram-).

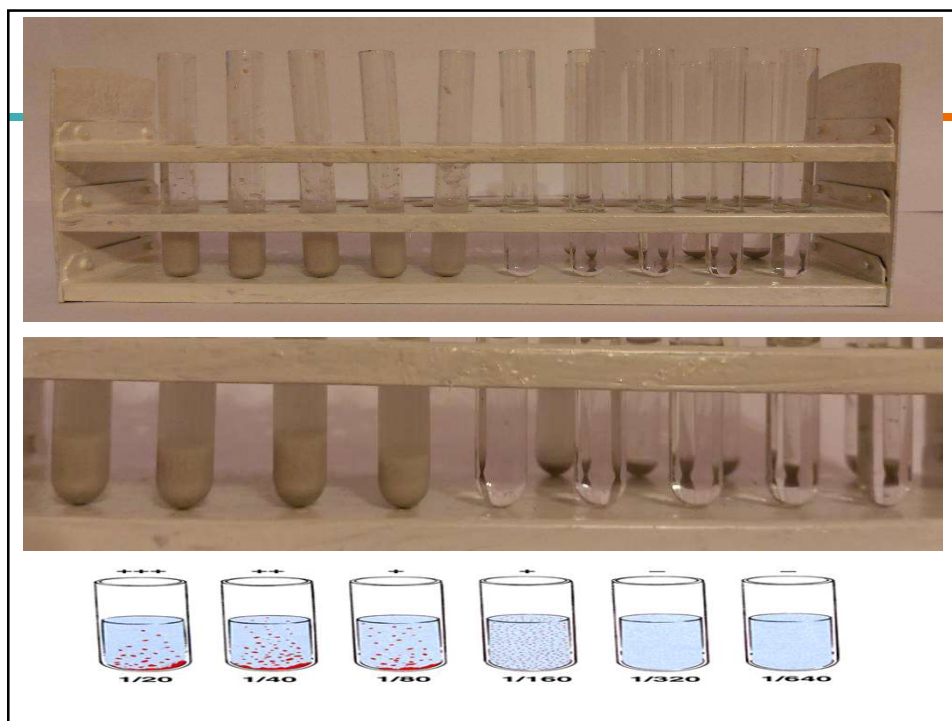
ELEMENTE / MATERIALE necesare:

- Serurile de la pacienți – în care se determina titrul de **Atc ???** , prin diluții seriate
- Atg standardizate O, H - cunoscute
 - suspensie celulara alcoolata O (500 mil cel/ml) si
 - suspensie celulara formolata pentru H (500 mil/ml))

Reactia Wright							
Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7
Ser fiziologic	0.92	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ser de cercetat	0.08	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antigen Wright	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dilutia finala	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	Maritor

Reactia Weil - Felix										
Nr. tub	1	2	3	4	5	6	7	8	9	M
*Ser fiziologic	-	0.2	0.3	-	0.2	0.3	-	0.2	0.3	0.4
Ser de testat 1/10	0.4	0.2	0.1	-	-	-	-	-	-	-
Ser de testat 1/100	-	-	-	0.4	0.2	0.1	-	-	-	-
Ser de testat 1/1000	-	-	-	-	-	-	0.4	0.2	0.1	-
Antigen standard Proteus OX-19	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Dilutia finala	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	0

Reactia Widal							
Nr. tub	1	2	3	4	5	6	7
Ser fiziologic (ml)	-	0.2	0.3	-	0.2	0.3	0.4
Ser cercetat dil. 1/10 ml	0.4	0.2	0.1	-	-	-	-
Ser cercetat 1/100 ml	-	-	-	0.4	0.2	0.1	-
Antigenul "O" sau "H" (ml)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Dilutii finale	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1000	Maritor



INTERPRETAREA REACTIEI - TITRUL aglutinant al serului = inversul celei mai mari dilutii care produce o aglutinare acceptabila.

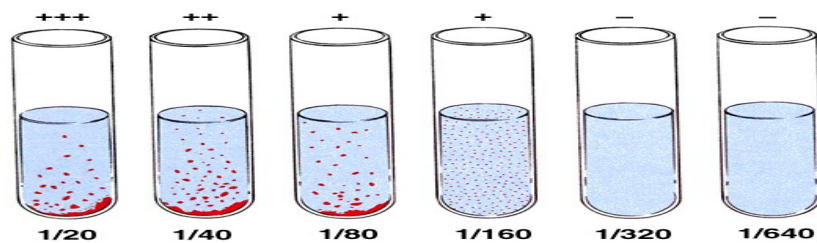
Ex : daca dilutia de 1/512 a serului produce o aglutinare evidenta

→ la dilutia imediat urmatoare (1/1024) aglutinarea = absenta

→ titrul aglutinant este de 512U ⇒ serul imun contine 512 unitati aglutinante de Atc/unitata de volum.

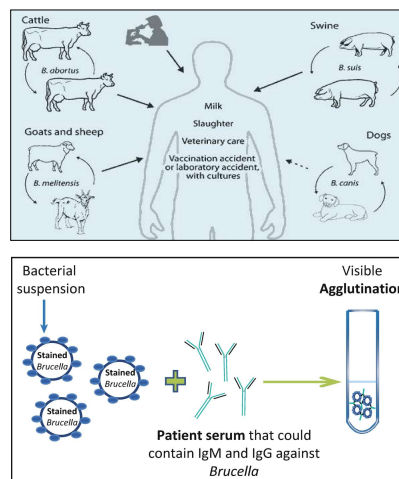
- Se apreciaza ca numai **o crestere progresiva a titrului acestor Atc** pledeaza pentru febra tifoida ; o determinare unica chiar cu titru ridicat, nu ofera nici o siguranta pentru diagnostic, din cauza prezentei unor Atc la persoanele vaccinate sau la cele care au avut anterior o infectie oculta.
- Valoare diagnostica prezinta **aglutininele O**, in timp ce aglutininele H persista dupa vaccinare si au semnificatie redusa.

APLICATIILE REACTIEI WIDAL - Investigarea sugarilor, copiilor de varsta mica, Investigarea persoanelor sigur nevaccinate



REAȚIA WRIGHT

- **PRINCIPIU** – Reacție utilizată în DS al pacienților care prezintă infecții cu **BRUCELLA (BRUCELLOZE)**.
- **ELEMENTELE REACȚIEI**
 - **Serul pacienților** – căutăm titrul de **Atc??** prin efectuarea diluțiilor succesive;
 - **Atg** standard cunoscut de Brucella.
- **TEHNICA DE LUCRU** – ca la reacția Widal.
- **INTERPRETARE** – inversul celei mai mari diluții unde se mai observă prezenta grunjiilor de aglutinare (această eprubetă ne va da titrul Atc).
- **APLICATII**



REAȚIA WEIL-FELIX

PRINCIPIU – Reacție utilizată în DS al pacienților care prezintă tifos exantematic determinat de **RICKETTSIA PROWAZEKI (Weil-Felix 1916)**.

Tifosul exantematic, numit și **tifosul epidemic**, **tifosul istoric**, **tifosul lumii vechi**, **tifosul european**, **tifosul clasic**, **tifosul de păduchi**, **tifosul peteșial**, **febra peteșială**, **tifosul de foamete**, **tifosul de război**, **tifosul de lagăr**, este o boală infecțioasă acută contagioasă și epidemică, determinată de Rickettsia prowazekii (după numele medicilor americani Ricketts și von Prowazek, victime ale tifosului exantematic), **transmisă de la om la om prin intermediul păduchelui**.

REAȚIA WEIL-FELIX

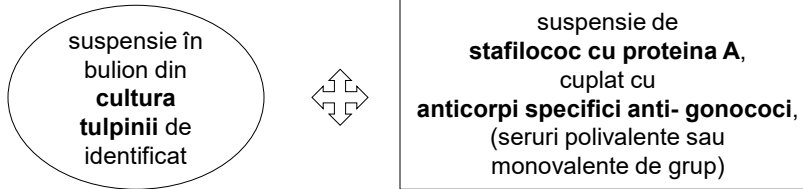
- **ELEMENTELE REACTIEI**
 - **Serul pacienților** – cautăm titrul de **Atc??** prin efectuarea diluțiilor succesive;
 - **Atg** standard cunoscut de *Proteus vulgaris*(OX-2, OX-19) sau *Proteus mirabilis* (OX-K)
- **TEHNICA DE LUCRU** – ca la reacția Widal.
- **INTERPRETARE** – inversul celei mai mari diluții unde se mai observă prezenta grunțiilor de aglutinare (acea eprubeta ne va da titrul Atc).
- **APLICATII**

AGLUTINAREA INDIRECTA SAU PASIVA

- **PRINCIPIUL REACTIEI** - Reacție ce folosește particule naturale sau artificiale (hematii, proteină stafilococică, latex) încărcate în vitro cu antigene sau anticorpi
- (ca elemente standard) care vor fi aglutinate de către anticorpii, respectiv antigenele corespunzătoare din probă.
- **APLICATIILE TEHNICI**
 - Identificarea serologică a surselor de bacterii utilizând un ser cunoscut (ex în identificarea grupei de streptococ, gonococ prin reacția de coaglutinare, folosind un ser cu Atc anti-streptococ, anti0gonococ fixați pe **proteina A stafilococică**)
 - Cercetarea Atc anti-bacterieni folosind un Atg standard – susele germenilor de referință + serul bolnavului → determinăm fata de care suse este imunizat bolnavul
- **REACTIA DE COAGLUTINARE**
 - folosită pentru identificarea serologică a streptococilor, gonococilor
 - se efectuează pe lamă : o suspensie în bulion din cultura tulpinii de identificat + o suspensie de stafilococ cu proteina A, cuplat cu anticorpi specifici anti- gonococi, (seruri polivalente sau monovalente de grup)

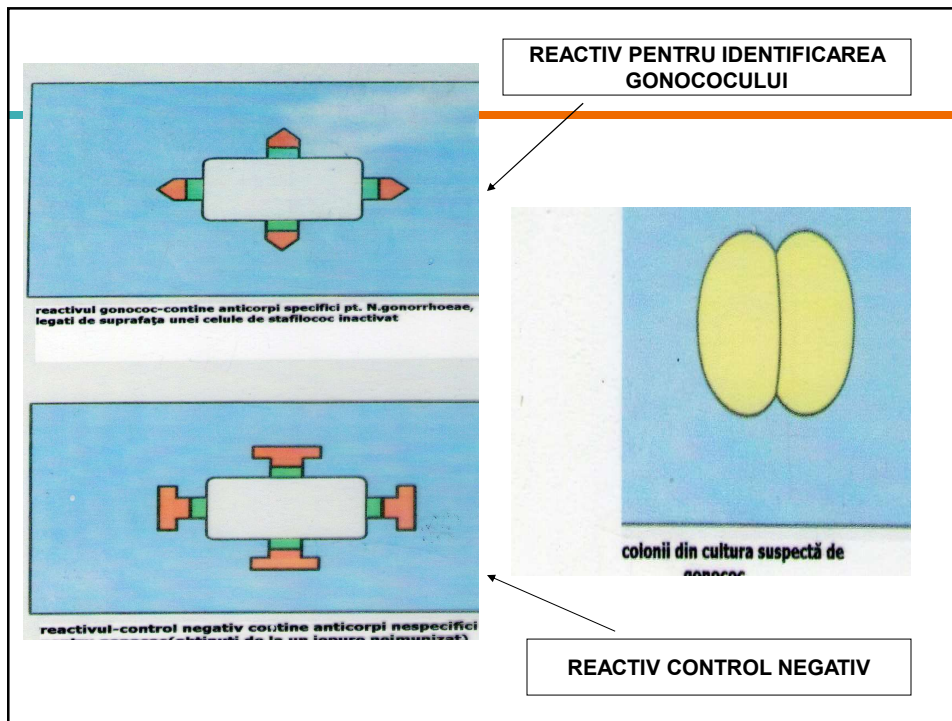
➤ REACTIA DE COAGLUTINARE

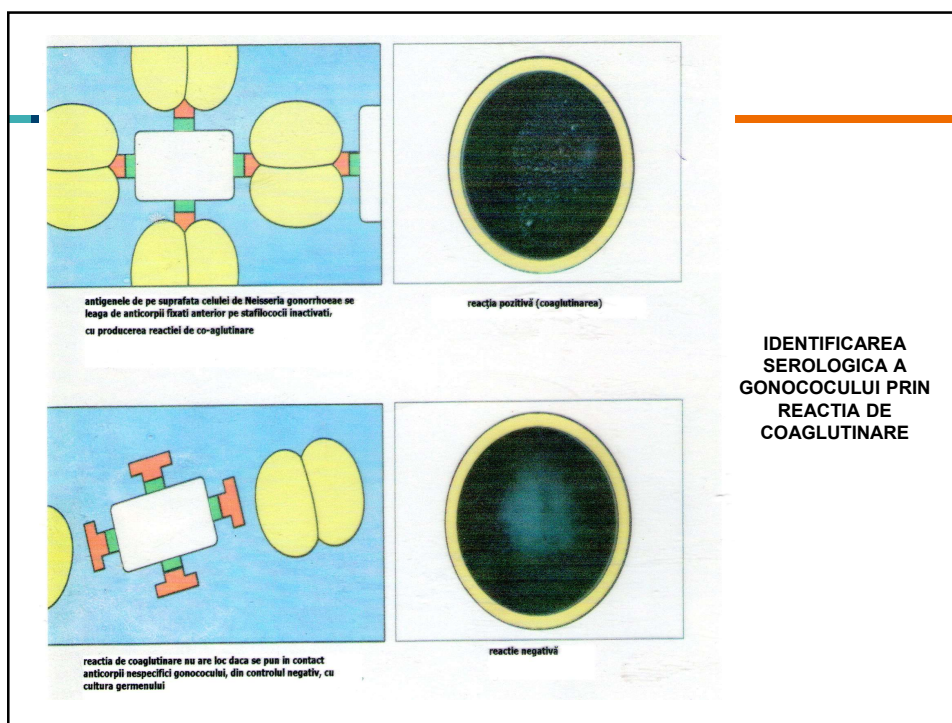
- folosită pentru identificarea serologică a **streptococilor, gonococilor**
- se efectuează pe lamă



- **PRINCIPIUL METODEI** constă în faptul că fragmentul Fc al Atc din serul imun standard anti-gonococ este fixat anterior pe proteina stafilococică, iar fragmentul Fab rămas liber reacționează cu determinantul antigenic specific gonococului producând o reacție de aglutinare vizibilă.

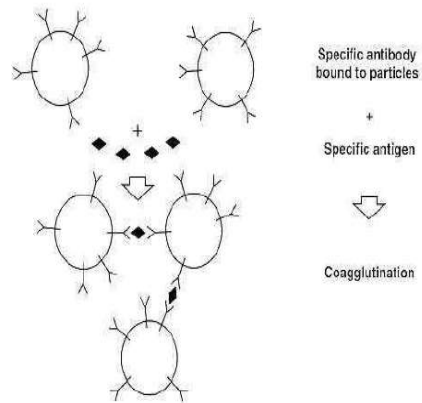
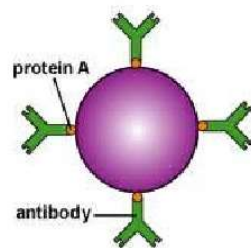
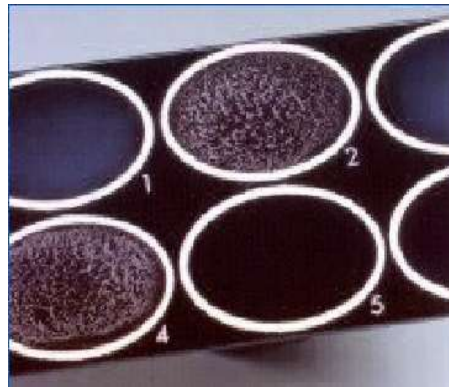
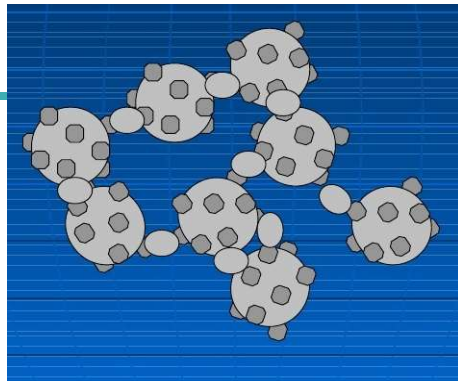
- **APLICATIILE METODEI**
 - Evidențierea factorului reumatoid - FR
 - proteinei C reactive
 - ASLO
 - Atg HBs (cu latex – HBs)





DETERMINAREA FACTORULUI REUMATOID (FR) PRIN REACȚIA LATEX-AGLUTINARE

- **PRINCIPIUL TEHNICII** - Particulele de polistiren-latex, învelite cu IgG denaturate sunt aglutinate de serurile de bolnav care conțin factor reumatoid. Reacția poate fi efectuată pe lamă sau în tuburi
- **MATERIALE NECESARE**
 - **ser de cercetat** - se folosesc uzual seruri proaspete; plasma; serul lipemic sau contaminarea microbiană pot cauza rezultate eronate.
 - Dacă nu este posibilă efectuarea imediată a testului se va stoca serul maximum pentru 72 ore la + 2 până la + 8° C. Pentru o depozitare prelungită, se stochează prin congelare.
 - **reactiv latex-IgG** - este constituit dintr-o suspensie apoasă de particule de latex-polistiren sensibilizate (încărcate) cu imunoglobuline IgG umane denaturate;
 - **control pozitiv** - ser uman care prezintă FR;
 - **control negativ** - ser uman fără FR.
- **TEHNICA DE LUCRU**
 - se pipetează pe rând în câmpurile aflate pe plăcuța de reacție câte o picătură (50 microlitri) din următorii reactanți: **control pozitiv, control negativ, proba de ser de bolnav**;
 - se adaugă în fiecare câmp câte o picătură din reactivul latex;
 - se amestecă reactanții, ușor, în fiecare câmp cu ajutorul unei baghete;
 - se rotește plăcuța 2 minute și se citește imediat reacția.
 - **Reacția -** = aspect lăptos al omogenatului, fără aglutinare ; același aspect la controlul negativ.
 - **Reacția +** = apariția **grunjiilor (aglutinare prezentă)** la periferia și în mijlocul omogenatului, care devine clar ; aspect identic la controlul pozitiv.



Other than in rheumatoid arthritis, rheumatoid factor may also be elevated in :

- Systemic lupus erythematosus (SLE)
- Sjögren's syndrome
- Interstitial pulmonary fibrosis
- Hepatitis B, Chronic liver disease and chronic hepatitis
- Primary biliary cirrhosis
- Infectious mononucleosis and any chronic viral infection
- Bacterial endocarditis
- Leprosy
- Sarcoidosis
- Tuberculosis
- Syphilis
- Visceral leishmaniasis
- Malaria
- Leukemia
- Dermatomyositis
- Systemic sclerosis
- After vaccination/transfusion in normal individuals

LOGO
Your site here

Diagnostic

Diagnosticul pozitiv al PR se face pe baza criteriilor ACR (American College of Rheumatology) din 1987(4) (tabelul 1). Criteriile ACR au fost stabilite pentru diagnosticul pacienților cu PR constituită și ele sunt mai puțin sensibile și specifice pentru PR precoce(5). Este de menționat că, atunci când aceste criterii s-au aplicat pacienților cu durată a bolii mai mică de un an, sensibilitatea și specificitatea au fost foarte variate (tabelul 2).

Tabelul 1. Criteriile ACR de diagnostic al PR (1987)

1.	Redoare matinală cu durată de o oră sau mai mult, înainte de îmbunătățirea maximală
2.	Artrită a 3 sau mai multe arii articulare, cu durată de 6 săptămâni
3.	Artrită a articulațiilor IFP, MCF cu durată de 6 săptămâni
4.	Artrită simetrică
5.	Noduli subcutanați
6.	Test pozitiv pentru FR
7.	Eroziuni radiografice și/sau osteopenie articulară la mâini și/sau articulațiile pumnului
PR certă: 4 criterii, PR posibilă: 3 criterii, PR probabilă: 2 criterii	

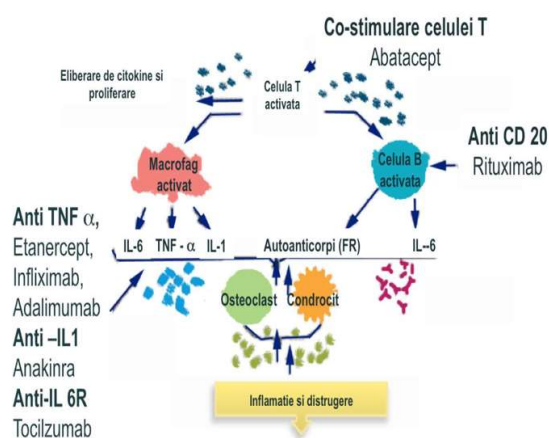
Tabelul 2. Sensibilitatea și specificitatea criteriilor ACR pentru PR precoce

precum și a diferenței de sensibilitate și specificitate ale criteriilor clasice, în cazul poliartritei precece și constituite, apare necesitatea folosirii unor noi criterii, adaptate, care să permită un diagnostic mai precoce al acestei afecțiuni invalidante. Recent, ACR propune noi criterii de clasificare a PR pentru pacienții cu cel puțin o articulație inflamată, diagnosticul sigur de PR stabilindu-se prin însumarea a 6 puncte din maximum de 10 puncte(6) (tabelul 3).

Tabel 3. Criterii ACR/EULAR 2010 de clasificare a PR

Domenii	Criterii	Punctaj
Afectare articulară	0 articulație medie-mare	0
	2-10 articulații medii-mari	1
	1-3 articulații mici	2
	4-10 articulații mici	3
	>10 articulații mici	5
Serologie	FR, Ac-anti-CCP negativi	0
	FR SAU Ac-anti CCP pozitivi, cu titru mai mare decât valoarea normală și mai mică de 3 ori limita superioară a normalului	2
Durata sinovitei	FR SAU Ac-anti CCP pozitivi, cu titru mai mare de 3 ori limita superioară a normalului	3
	<6 săptămâni	0
Reacții de fază acută	≥6 săptămâni	1
	VSH, CRP normale	0
	VSH, CRP crescute	1

ANTICORPI MONOCLONALI



			Rh-hr							KELL					DUFFY		KIDD		Sex L ₁ H ₂ D	LEWIS		MNS				P	LUTHERAN			
Cell#	Rh ⁺ hr	Donor Number	D	C	c	e	f	C ^w	V	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Xg ^a	Le ^a	Le ^b	S	s	M	N	P ₁	Lu ^a	Lu ^b	
1	R1wR1	323156	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+
2	R2R2	312419	+	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+
3	rr	316061	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	/	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+
Patient Cells																														

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment.

Ortho Clinical Diagnostics

Reagent Red Blood Cells
0.8% BioVue® Screen
© Ortho Clinical Diagnostics 2010

LOT NO.
BVS345

EXP. DATE
2019-11-26
CCYY-MM-DD

ANTIGRAM®
Antigen
Profile

635201171

• **Tipuri de anticorpi iregulari antieritrocitari, cel mai frecvent IDENTIFICAȚI prin ANTIGRAMĂ:**

- **Anticorpi naturali iregulari/imuni (Auto-anticorpi)** care sunt activi la 37°C (tip IgM):
 1. **Anticorpi în sistemul LEWIS:** anti- Le^a, anti- Le^b;
 2. **Anticorpi în sistemul P:** anti-P1;
 3. **Anticorpi în sistemul MNS:** anti-M, anti-N.
- **Allo-anticorpi** – cel mai frecvenți (tip IgG, cu risc transfuzional):
 1. **Anticorpi în sistemul Rh:** anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e, anti-f, anti-C^w, anti-V;
 2. **Anticorpi în sistemul KELL:** anti-K, anti-k, anti-Kp^a, anti-Kp^b, anti-Js^a, anti-Js^b;
 3. **Anticorpi în sistemul DUFFY:** anti- Fy^a, anti- Fy^b;
 4. **Anticorpi în sistemul KIDD:** anti-Jk^a, anti-Jk^b;
 5. **Anticorpi în sistemul MNS:** anti-S, anti-s;
 6. **Anticorpi în sistemul LUTHERAN:** anti- Lu^a, anti- Lu^b.



