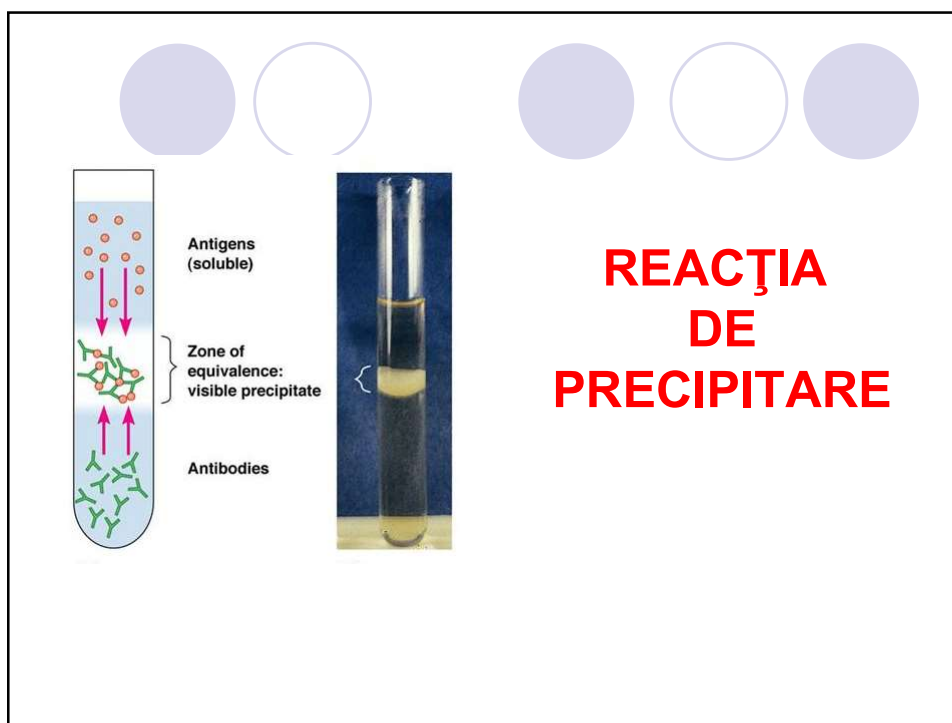




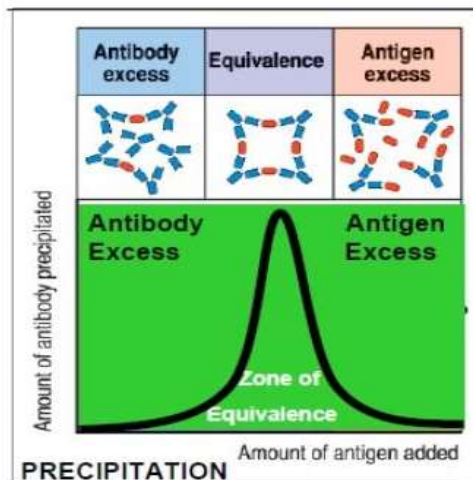
\* **Precipitarea imună** rezultă din punerea în contact a unor cantități echivalente de Atg solubil și Atc specifici.

\* Un Atg reprezentat de o moleculă solubilă în prezența Atc specifici poate produce un precipitat dacă Atg este multivalent (pe suprafața Atg există diferiți epitopi care induc sinteza de Atc specifici acestora).

\* Tipurile reacției de precipitare

- precipitare **calitativă** și
- precipitare **cantitativă**
- sau
- precipitare în **mediul lichid** și
- precipitare în **mediul solid**.

## Precipitation Curve



- Zone of Equivalence  
optimum precipitation
- Prozone  
excess antibody is present
- Postzone  
excess antigen is present

Prozone and Postzone phenomena are negative reactions.

## PRECIPITAREA CALITATIVĂ

- In **tuburi** unde sunt depuși mai întâi Atc de specificitate cunoscută, după care se adaugă proba cu Atg de testat. In reacția pozitivă, se formează un **precipitat în formă de inel** la interfață - puțin utilizată
- In **mediul gelificat** se bazează pe faptul că Atg și Atc pot difuza pasiv sau activ într-un gel semisolid constituit din agar/un echivalent.
- Imunodifuzia calitativă poate fi orientată sub câmp electric, fiind vorba de **contraimmunoelectroforeza (electrosinereza)** în cursul căreia antigenul și imunoserul sunt distribuite în godeuri într-un gel neutru. Sub efectul câmpului electric întâlnirea dintre antigen și anticorpi este accelerată.
- **Imunoelectroforeză** reprezintă o asociere între electroforeză și dubla imunodifuzie.
- Precipitarea calitativă are importanță pentru **investigarea calitativă a imunoglobulinelor** în ser, urină, LCR.

## PRECIPITAREA CANTITATIVĂ

- Precipitarea cantitativă utilizează un **gel** în care sunt incluși anticorpii cu specificitate cunoscută.
- Cel mai adesea este folosită **tehnica Mancini - imunodifuzie radială simplă**
  - efectuată în plăci care conțin gel de agaroză cu Atc incluși;
  - serurile de testat se pipetează în godeuri și se urmăresc traseele de precipitare;
  - diametrele inelelor de precipitare, concentrice godeurilor, vor determina concentrațiile Atg.
- **Tehnica Laurell** utilizează de asemenea un gel cu Atc
  - Godeurile sunt aliniate și reprezintă linia de plecare a Atg depuse în acestea. Difuzia Atg va fi orientată în câmp electric și la echivalență precipitatele vor avea aspect de flacără de lumânare.

## PRECIPITAREA IN MEDIUL LICHID

În urma reacției dintre Atg și Atc în mediul lichid se formează complexe care precipită când cei doi reactanți se găsesc în anumite proporții, excesul unuia dintre ei având capacitatea de a inhiba reacția.

### PRECIPITAREA PRIN FLOCULARE

- **tehnica Ramon** utilizată în scopul stabilirii titrului unui Atg (ex. toxină) folosind cantități variabile de Atc (ex. antitoxină) cu titru cunoscut;
- **metoda Dean** care folosește cantități variabile de Atg cu titru cunoscut, cu scopul dozării Atc specifici.

### PRECIPITAREA IN INEL

- Atg și Atc sunt eliberați într-un tub în așa fel încât cele două faze (faza inferioară conținând Atc și faza superioară conținând Atg) să nu se amestece. Atg coboară lent intrând în contact cu Atc și formează complexe Atg-Atc. Formarea inelului de precipitat indică prezența Atg sau a Atc de cercetat.
- **Avantajul metodei** – rapiditatea și simplitatea.

**APLICATII** - tehnică stă la baza reacțiilor :

- reacția Ascoli (identificarea bacilului carbunos-diagn. retrospectiv al antraxului);
- identificarea grupei serologice Lancefield a streptococilor;
- identificarea apartenenței (animală/umană) unor pete de sânge în medicina judiciară;
- stabilirea provenienței cărnii, prin tehnica Uhlemuth.



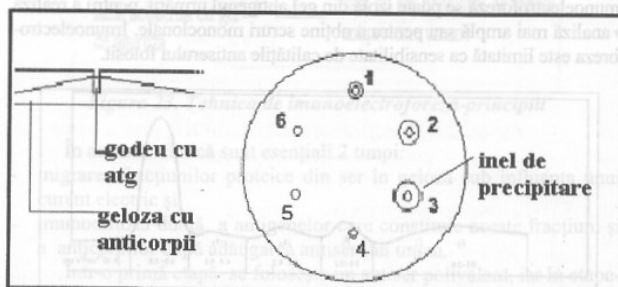
## PRECIPITAREA IN MEDIUL SOLID (MEDIU GELIFICAT)

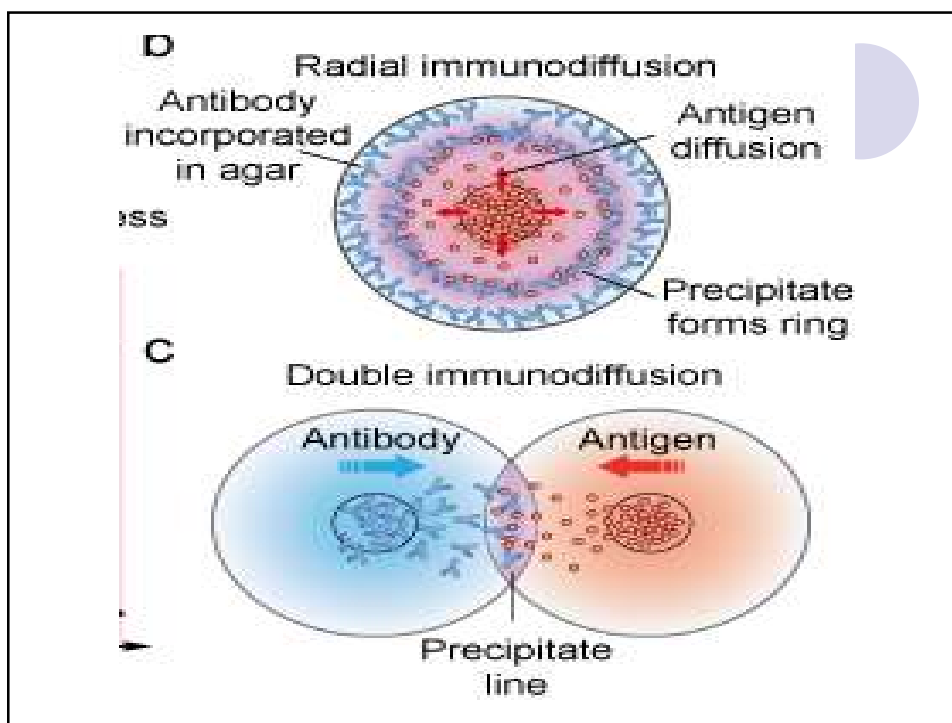
- Precipitarea în mediul solid se bazează pe **principiul** - dacă Atg și Atc sunt introduse într-un mediu gelificat, vor difuza unul către celălalt.
- În cazul în care există o corespondență imună și un raport optim între concentrațiile celor doi reactanți, va avea loc o reacție de precipitare în punctul lor de întâlnire.
- Se folosește **gelul de agaroză** (3% -10%) care reține precipitatele în ochiurile sale.

### \*\* TEHNICA MANCINI-CARBONARA

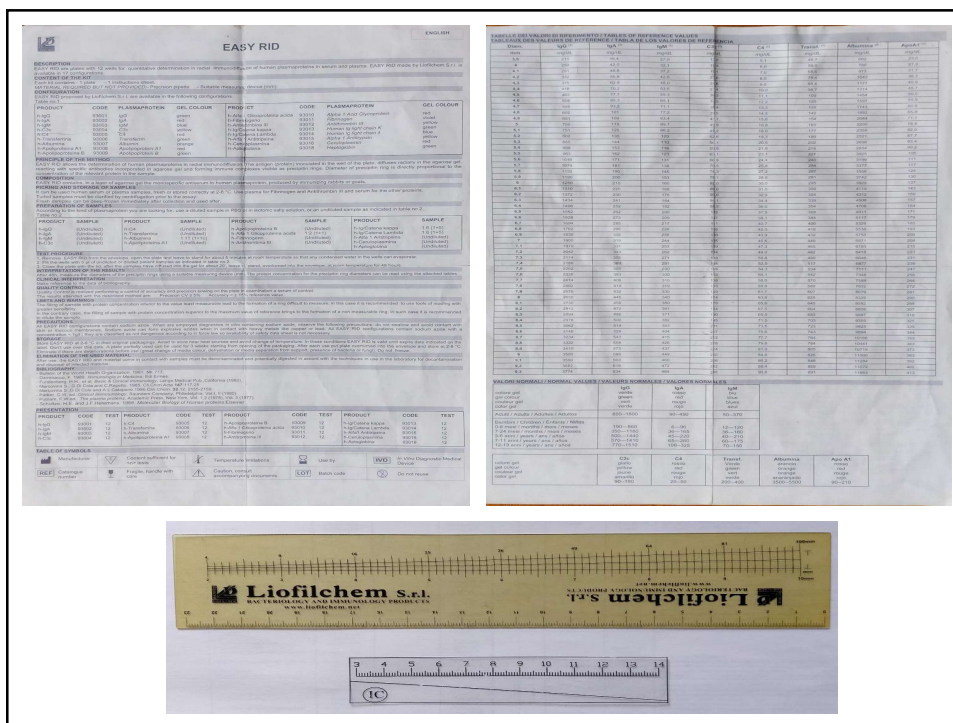
**PRINCIPIU** - În cadrul acestei tehnici gelul de agaroză inclus în plăcuțe de polistiren va conține **Atc specifici** Atg cercetat;

- în godeurile practicate în gel se depun probele de testat, în care se caută Atg → Atg difuzează în gel, deplasând zona de echilibru, și va reacționa cu Atc din gel, în cazul existenței unei corespondențe imune;
- după 24-48 ore apar **inelele de precipitare** a căror diametre (mm) sunt proporționale cu cantitatea de Atg.
- Concentrațiile (mg) parametrului investigat se apreciază conform unei curbe de etalonare obținute folosind Atg standard cu concentrații determinate.

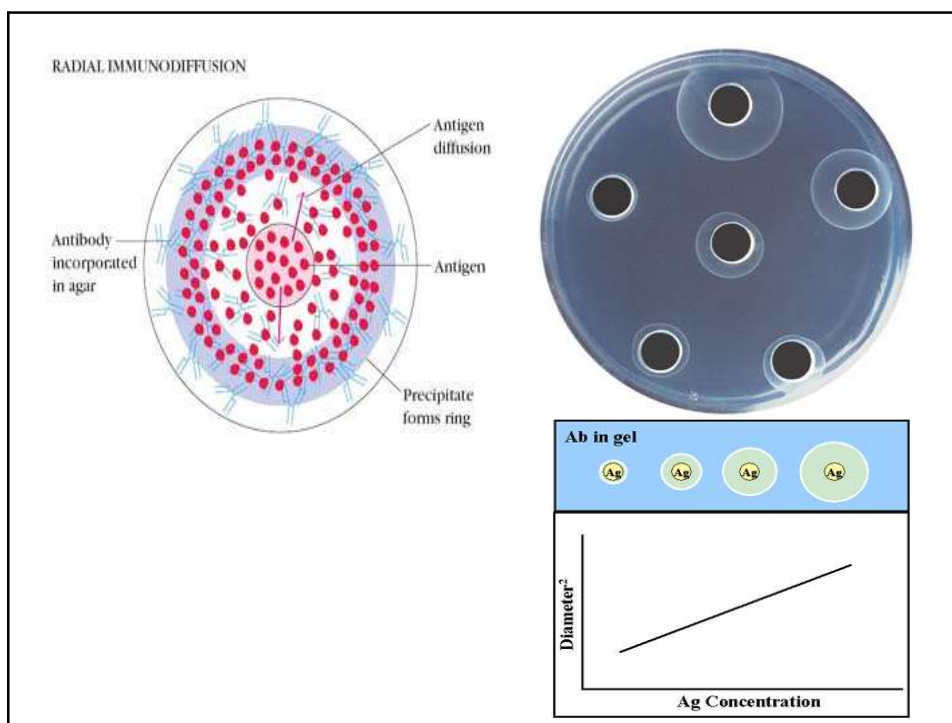








| TABLEAU DES VALEURS DE REFERENCE / TABLE OF REFERENCE VALUES / TABLA DE LOS VALORES DE REFERENCIA |                    |                    |                    |                   |                   |                        |                         |                       |                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| Dim.                                                                                              | IgG <sup>(1)</sup> | IgA <sup>(1)</sup> | IgM <sup>(1)</sup> | C3 <sup>(1)</sup> | C4 <sup>(1)</sup> | Transf. <sup>(1)</sup> | Albumina <sup>(1)</sup> | Apo A1 <sup>(1)</sup> | Apo B <sup>(1)</sup> |
| mm                                                                                                | mg/dL              | mg/dL              | mg/dL              | mg/dL             | mg/dL             | mg/dL                  | mg/dL                   | mg/dL                 | mg/dL                |
| 3.8                                                                                               | 211                | 35.4               | 27.6               | 1.0               | 6.1               | 45.7                   | 502                     | 23.5                  | 27.5                 |
| 4                                                                                                 | 280                | 42.0               | 32.1               | 1.0               | 6.0               | 50.0                   | 500                     | 27.5                  | 31.7                 |
| 4.1                                                                                               | 291                | 43.8               | 32.2               | 1.0               | 7.0               | 60.0                   | 613                     | 31.7                  | 35.9                 |
| 4.2                                                                                               | 302                | 45.6               | 32.3               | 1.0               | 8.0               | 70.0                   | 684                     | 35.9                  | 40.0                 |
| 4.3                                                                                               | 313                | 47.4               | 32.4               | 1.0               | 9.0               | 80.0                   | 755                     | 40.0                  | 44.1                 |
| 4.4                                                                                               | 324                | 49.2               | 32.5               | 1.0               | 10.0              | 90.0                   | 826                     | 44.1                  | 48.2                 |
| 4.5                                                                                               | 335                | 51.0               | 32.6               | 1.0               | 11.0              | 100.0                  | 897                     | 48.2                  | 52.3                 |
| 4.6                                                                                               | 346                | 52.8               | 32.7               | 1.0               | 12.0              | 110.0                  | 968                     | 52.3                  | 56.4                 |
| 4.7                                                                                               | 357                | 54.6               | 32.8               | 1.0               | 13.0              | 120.0                  | 1039                    | 56.4                  | 60.5                 |
| 4.8                                                                                               | 368                | 56.4               | 32.9               | 1.0               | 14.0              | 130.0                  | 1110                    | 60.5                  | 64.6                 |
| 4.9                                                                                               | 379                | 58.2               | 33.0               | 1.0               | 15.0              | 140.0                  | 1181                    | 64.6                  | 68.7                 |
| 5                                                                                                 | 390                | 60.0               | 33.1               | 1.0               | 16.0              | 150.0                  | 1252                    | 68.7                  | 72.8                 |
| 5.1                                                                                               | 401                | 61.8               | 33.2               | 1.0               | 17.0              | 160.0                  | 1323                    | 72.8                  | 76.9                 |
| 5.2                                                                                               | 412                | 63.6               | 33.3               | 1.0               | 18.0              | 170.0                  | 1394                    | 76.9                  | 81.0                 |
| 5.3                                                                                               | 423                | 65.4               | 33.4               | 1.0               | 19.0              | 180.0                  | 1465                    | 81.0                  | 85.1                 |
| 5.4                                                                                               | 434                | 67.2               | 33.5               | 1.0               | 20.0              | 190.0                  | 1536                    | 85.1                  | 89.2                 |
| 5.5                                                                                               | 445                | 69.0               | 33.6               | 1.0               | 21.0              | 200.0                  | 1607                    | 89.2                  | 93.3                 |
| 5.6                                                                                               | 456                | 70.8               | 33.7               | 1.0               | 22.0              | 210.0                  | 1678                    | 93.3                  | 97.4                 |
| 5.7                                                                                               | 467                | 72.6               | 33.8               | 1.0               | 23.0              | 220.0                  | 1749                    | 97.4                  | 101.5                |
| 5.8                                                                                               | 478                | 74.4               | 33.9               | 1.0               | 24.0              | 230.0                  | 1820                    | 101.5                 | 105.6                |
| 5.9                                                                                               | 489                | 76.2               | 34.0               | 1.0               | 25.0              | 240.0                  | 1891                    | 105.6                 | 109.7                |
| 6                                                                                                 | 500                | 78.0               | 34.1               | 1.0               | 26.0              | 250.0                  | 1962                    | 109.7                 | 113.8                |
| 6.1                                                                                               | 511                | 79.8               | 34.2               | 1.0               | 27.0              | 260.0                  | 2033                    | 113.8                 | 117.9                |
| 6.2                                                                                               | 522                | 81.6               | 34.3               | 1.0               | 28.0              | 270.0                  | 2104                    | 117.9                 | 122.0                |
| 6.3                                                                                               | 533                | 83.4               | 34.4               | 1.0               | 29.0              | 280.0                  | 2175                    | 122.0                 | 126.1                |
| 6.4                                                                                               | 544                | 85.2               | 34.5               | 1.0               | 30.0              | 290.0                  | 2246                    | 126.1                 | 130.2                |
| 6.5                                                                                               | 555                | 87.0               | 34.6               | 1.0               | 31.0              | 300.0                  | 2317                    | 130.2                 | 134.3                |
| 6.6                                                                                               | 566                | 88.8               | 34.7               | 1.0               | 32.0              | 310.0                  | 2388                    | 134.3                 | 138.4                |
| 6.7                                                                                               | 577                | 90.6               | 34.8               | 1.0               | 33.0              | 320.0                  | 2459                    | 138.4                 | 142.5                |
| 6.8                                                                                               | 588                | 92.4               | 34.9               | 1.0               | 34.0              | 330.0                  | 2530                    | 142.5                 | 146.6                |
| 6.9                                                                                               | 599                | 94.2               | 35.0               | 1.0               | 35.0              | 340.0                  | 2601                    | 146.6                 | 150.7                |
| 7                                                                                                 | 610                | 96.0               | 35.1               | 1.0               | 36.0              | 350.0                  | 2672                    | 150.7                 | 154.8                |
| 7.1                                                                                               | 621                | 97.8               | 35.2               | 1.0               | 37.0              | 360.0                  | 2743                    | 154.8                 | 158.9                |
| 7.2                                                                                               | 632                | 99.6               | 35.3               | 1.0               | 38.0              | 370.0                  | 2814                    | 158.9                 | 163.0                |
| 7.3                                                                                               | 643                | 101.4              | 35.4               | 1.0               | 39.0              | 380.0                  | 2885                    | 163.0                 | 167.1                |
| 7.4                                                                                               | 654                | 103.2              | 35.5               | 1.0               | 40.0              | 390.0                  | 2956                    | 167.1                 | 171.2                |
| 7.5                                                                                               | 665                | 105.0              | 35.6               | 1.0               | 41.0              | 400.0                  | 3027                    | 171.2                 | 175.3                |
| 7.6                                                                                               | 676                | 106.8              | 35.7               | 1.0               | 42.0              | 410.0                  | 3098                    | 175.3                 | 179.4                |
| 7.7                                                                                               | 687                | 108.6              | 35.8               | 1.0               | 43.0              | 420.0                  | 3169                    | 179.4                 | 183.5                |
| 7.8                                                                                               | 698                | 110.4              | 35.9               | 1.0               | 44.0              | 430.0                  | 3240                    | 183.5                 | 187.6                |
| 7.9                                                                                               | 709                | 112.2              | 36.0               | 1.0               | 45.0              | 440.0                  | 3311                    | 187.6                 | 191.7                |
| 8                                                                                                 | 720                | 114.0              | 36.1               | 1.0               | 46.0              | 450.0                  | 3382                    | 191.7                 | 195.8                |
| 8.1                                                                                               | 731                | 115.8              | 36.2               | 1.0               | 47.0              | 460.0                  | 3453                    | 195.8                 | 199.9                |
| 8.2                                                                                               | 742                | 117.6              | 36.3               | 1.0               | 48.0              | 470.0                  | 3524                    | 199.9                 | 204.0                |
| 8.3                                                                                               | 753                | 119.4              | 36.4               | 1.0               | 49.0              | 480.0                  | 3595                    | 204.0                 | 208.1                |
| 8.4                                                                                               | 764                | 121.2              | 36.5               | 1.0               | 50.0              | 490.0                  | 3666                    | 208.1                 | 212.2                |
| 8.5                                                                                               | 775                | 123.0              | 36.6               | 1.0               | 51.0              | 500.0                  | 3737                    | 212.2                 | 216.3                |
| 8.6                                                                                               | 786                | 124.8              | 36.7               | 1.0               | 52.0              | 510.0                  | 3808                    | 216.3                 | 220.4                |
| 8.7                                                                                               | 797                | 126.6              | 36.8               | 1.0               | 53.0              | 520.0                  | 3879                    | 220.4                 | 224.5                |
| 8.8                                                                                               | 808                | 128.4              | 36.9               | 1.0               | 54.0              | 530.0                  | 3950                    | 224.5                 | 228.6                |
| 8.9                                                                                               | 819                | 130.2              | 37.0               | 1.0               | 55.0              | 540.0                  | 4021                    | 228.6                 | 232.7                |
| 9                                                                                                 | 830                | 132.0              | 37.1               | 1.0               | 56.0              | 550.0                  | 4092                    | 232.7                 | 236.8                |
| 9.1                                                                                               | 841                | 133.8              | 37.2               | 1.0               | 57.0              | 560.0                  | 4163                    | 236.8                 | 240.9                |
| 9.2                                                                                               | 852                | 135.6              | 37.3               | 1.0               | 58.0              | 570.0                  | 4234                    | 240.9                 | 245.0                |
| 9.3                                                                                               | 863                | 137.4              | 37.4               | 1.0               | 59.0              | 580.0                  | 4305                    | 245.0                 | 249.1                |
| 9.4                                                                                               | 874                | 139.2              | 37.5               | 1.0               | 60.0              | 590.0                  | 4376                    | 249.1                 | 253.2                |
| 9.5                                                                                               | 885                | 141.0              | 37.6               | 1.0               | 61.0              | 600.0                  | 4447                    | 253.2                 | 257.3                |
| 9.6                                                                                               | 896                | 142.8              | 37.7               | 1.0               | 62.0              | 610.0                  | 4518                    | 257.3                 | 261.4                |
| 9.7                                                                                               | 907                | 144.6              | 37.8               | 1.0               | 63.0              | 620.0                  | 4589                    | 261.4                 | 265.5                |
| 9.8                                                                                               | 918                | 146.4              | 37.9               | 1.0               | 64.0              | 630.0                  | 4660                    | 265.5                 | 269.6                |
| 9.9                                                                                               | 929                | 148.2              | 38.0               | 1.0               | 65.0              | 640.0                  | 4731                    | 269.6                 | 273.7                |
| 10                                                                                                | 940                | 150.0              | 38.1               | 1.0               | 66.0              | 650.0                  | 4802                    | 273.7                 | 277.8                |
| 10.1                                                                                              | 951                | 151.8              | 38.2               | 1.0               | 67.0              | 660.0                  | 4873                    | 277.8                 | 281.9                |
| 10.2                                                                                              | 962                | 153.6              | 38.3               | 1.0               | 68.0              | 670.0                  | 4944                    | 281.9                 | 286.0                |
| 10.3                                                                                              | 973                | 155.4              | 38.4               | 1.0               | 69.0              | 680.0                  | 5015                    | 286.0                 | 290.1                |
| 10.4                                                                                              | 984                | 157.2              | 38.5               | 1.0               | 70.0              | 690.0                  | 5086                    | 290.1                 | 294.2                |
| 10.5                                                                                              | 995                | 159.0              | 38.6               | 1.0               | 71.0              | 700.0                  | 5157                    | 294.2                 | 298.3                |
| 10.6                                                                                              | 1006               | 160.8              | 38.7               | 1.0               | 72.0              | 710.0                  | 5228                    | 298.3                 | 302.4                |
| 10.7                                                                                              | 1017               | 162.6              | 38.8               | 1.0               | 73.0              | 720.0                  | 5299                    | 302.4                 | 306.5                |
| 10.8                                                                                              | 1028               | 164.4              | 38.9               | 1.0               | 74.0              | 730.0                  | 5370                    | 306.5                 | 310.6                |
| 10.9                                                                                              | 1039               | 166.2              | 39.0               | 1.0               | 75.0              | 740.0                  | 5441                    | 310.6                 | 314.7                |
| 11                                                                                                | 1050               | 168.0              | 39.1               | 1.0               | 76.0              | 750.0                  | 5512                    | 314.7                 | 318.8                |
| 11.1                                                                                              | 1061               | 169.8              | 39.2               | 1.0               | 77.0              | 760.0                  | 5583                    | 318.8                 | 322.9                |
| 11.2                                                                                              | 1072               | 171.6              | 39.3               | 1.0               | 78.0              | 770.0                  | 5654                    | 322.9                 | 327.0                |
| 11.3                                                                                              | 1083               | 173.4              | 39.4               | 1.0               | 79.0              | 780.0                  | 5725                    | 327.0                 | 331.1                |
| 11.4                                                                                              | 1094               | 175.2              | 39.5               | 1.0               | 80.0              | 790.0                  | 5796                    | 331.1                 | 335.2                |
| 11.5                                                                                              | 1105               | 177.0              | 39.6               | 1.0               | 81.0              | 800.0                  | 5867                    | 335.2                 | 339.3                |
| 11.6                                                                                              | 1116               | 178.8              | 39.7               | 1.0               | 82.0              | 810.0                  | 5938                    | 339.3                 | 343.4                |
| 11.7                                                                                              | 1127               | 180.6              | 39.8               | 1.0               | 83.0              | 820.0                  | 6009                    | 343.4                 | 347.5                |
| 11.8                                                                                              | 1138               | 182.4              | 39.9               | 1.0               | 84.0              | 830.0                  | 6080                    | 347.5                 | 351.6                |
| 11.9                                                                                              | 1149               | 184.2              | 40.0               | 1.0               | 85.0              | 840.0                  | 6151                    | 351.6                 | 355.7                |
| 12                                                                                                | 1160               | 186.0              | 40.1               | 1.0               | 86.0              | 850.0                  | 6222                    | 355.7                 | 359.8                |
| 12.1                                                                                              | 1171               | 187.8              | 40.2               | 1.0               | 87.0              | 860.0                  | 6293                    | 359.8                 | 363.9                |
| 12.2                                                                                              | 1182               | 189.6              | 40.3               | 1.0               | 88.0              | 870.0                  | 6364                    | 363.9                 | 368.0                |
| 12.3                                                                                              | 1193               | 191.4              | 40.4               | 1.0               | 89.0              | 880.0                  | 6435                    | 368.0                 | 372.1                |
| 12.4                                                                                              | 1204               | 193.2              | 40.5               | 1.0               | 90.0              | 890.0                  | 6506                    | 372.1                 | 376.2                |
| 12.5                                                                                              | 1215               | 195.0              | 40.6               | 1.0               | 91.0              | 900.0                  | 6577                    | 376.2                 | 380.3                |
| 12.6                                                                                              | 1226               | 196.8              | 40.7               | 1.0               | 92.0              | 910.0                  | 6648                    | 380.3                 | 384.4                |
| 12.7                                                                                              | 1237               | 198.6              | 40.8               | 1.0               | 93.0              | 920.0                  | 6719                    | 384.4                 | 388.5                |
| 12.8                                                                                              | 1248               | 200.4              | 40.9               | 1.0               | 94.0              | 930.0                  | 6790                    | 388.5                 | 392.6                |
| 12.9                                                                                              | 1259               | 202.2              | 41.0               | 1.0               | 95.0              | 940.0                  | 6861                    | 392.6                 | 396.7                |
| 13                                                                                                | 1270               | 204.0              | 41.1               | 1.0               | 96.0              | 950.0                  | 6932                    | 396.7                 | 400.8                |
| 13.1                                                                                              | 1281               | 205.8              | 41.2               | 1.0               | 97.0              | 960.0                  | 7003                    | 400.8                 | 404.9                |
| 13.2                                                                                              | 1292               | 207.6              | 41.3               | 1.0               | 98.0              | 970.0                  | 7074                    | 404.9                 | 409.0                |
| 13.3                                                                                              | 1303               | 209.4              | 41.4               | 1.0               | 99.0              | 980.0                  | 7145                    | 409.0                 | 413.1                |
| 13.4                                                                                              | 1314               | 211.2              | 41.5               | 1.0               | 100.0             | 990.0                  | 7216                    | 413.1                 | 417.2                |
| 13.5                                                                                              | 1325               | 213.0              | 41.6               | 1.0               | 101.0             | 1000.0                 | 7287                    | 417.2                 | 421.3                |
| 13.6                                                                                              | 1336               | 214.8              | 41.7               | 1.0               | 102.0             | 1010.0                 | 7358                    | 421.3                 | 425.4                |
| 13.7                                                                                              | 1347               | 216.6              | 41.8               | 1.0               | 103.0             | 1020.0                 | 7429                    | 425.4                 | 429.5                |
| 13.8                                                                                              | 1358               | 218.4              | 41.9               | 1.0               | 104.0             | 1030.0                 | 7500                    | 429.5                 | 433.6                |
| 13.9                                                                                              | 1369               | 220.2              | 42.0               | 1.0               | 105.0             | 1040.0                 | 7571                    | 433.6                 | 437.7                |
| 14                                                                                                | 1380               | 222.0              | 42.1               | 1.0               | 106.0             | 1050.0                 | 7642                    | 437.7                 | 441.8                |
| 14.1                                                                                              | 1391               | 223.8              | 42.2               | 1.0               | 107.0             | 1060.0                 | 7713                    | 441.8                 | 445.9                |
| 14.2                                                                                              | 1402               | 225.6              | 42.3               | 1.0               | 108.0             | 1070.0                 | 7784                    | 445.9                 | 450.0                |
| 14.3                                                                                              | 1413               | 227.4              | 42.4               | 1.0               | 109.0             | 1080.0                 | 7855                    | 450.0                 | 454.1                |
| 14.4                                                                                              | 1424               | 229.2              | 42.5               | 1.0               | 110.0             | 1090.0                 | 7926                    | 454.1                 | 458.2                |
| 14.5                                                                                              | 1435               | 231.0              | 42.6               | 1.0               | 111.0             | 1100.0                 | 7997                    | 458.2                 | 462.3                |
| 14.6                                                                                              | 1446               | 232.8              | 42.7               | 1.0               | 112.0             | 1110.0                 | 8068                    | 462.3                 | 466.4                |
| 14.7                                                                                              | 1457               | 234.6              | 42.8               | 1.0               | 113.0             | 1120.0                 | 8139                    | 466.4                 | 470.5                |
| 14.8                                                                                              | 1468               | 236.4              | 42.9               | 1.0               | 114.0             | 1130.0                 | 8210                    | 470.5                 | 474.6                |
| 14.9                                                                                              | 1479               | 238.2              | 43.0               | 1.0               | 115.0             | 1140.0                 | 8281                    | 474.6                 | 478.7                |
| 15                                                                                                | 1490               | 240.0              | 43.1               | 1.0               | 116.0             | 1150.0                 | 8352                    | 478.7                 | 482.8                |
| 15.1                                                                                              | 1501               | 241.8              | 43.2               | 1.0               | 117.0             | 1160.0                 | 8423                    | 482.8                 | 486.9                |
| 15.2                                                                                              | 1512               | 243.6              | 43.3               | 1.0               | 118.0             | 1170.0                 | 8494                    | 486.9                 | 491.0                |
| 15.3                                                                                              | 1523               | 245.4              | 43.4               | 1.0               | 119.0             | 1180.0                 | 8565                    | 491.0                 | 495.1                |
| 15.4                                                                                              | 1534               | 247.2              | 43.5               | 1.0               | 120.0             | 1190.0                 | 8636                    | 495.1                 | 499.2                |
| 15.5                                                                                              | 1545               | 249.0              | 43.6               | 1.0               | 121.0             | 1200.0                 | 8707                    | 499.2                 | 503.3                |
| 15.6                                                                                              | 1556               | 250.8              | 43.7               | 1.0               | 122.0             | 1210.0                 | 8778                    | 503.3                 | 507.4                |
| 15.7                                                                                              | 1567               | 252.6              | 43.8               | 1.0               | 123.0             | 1220.0                 | 8849                    | 507.4                 | 511.5                |
| 15.8                                                                                              | 1578               | 254.4              | 43.9               | 1.0               | 124.0             | 1230.0                 | 8920                    | 511.5                 | 515.6                |
| 15.9                                                                                              | 1589               | 256.2              | 44.0               | 1.0               | 125.0             | 1240.0                 | 8991                    | 515.6                 | 519.7                |
| 16                                                                                                | 1600               | 258.0              | 44.1               | 1.0               | 126.0             | 1250.0                 | 9062                    | 519.7                 | 523.8                |
| 16.1                                                                                              | 1611               | 259.8              | 44.2               | 1.0               | 127.0             | 1260.0                 | 9133                    | 523.8                 | 527.9                |
| 16.2                                                                                              | 1622               | 261.6              | 44.3               | 1.0               | 128.0             | 1270.0                 | 9204                    | 527.9                 | 532.0                |
| 16.3                                                                                              | 1633               |                    |                    |                   |                   |                        |                         |                       |                      |



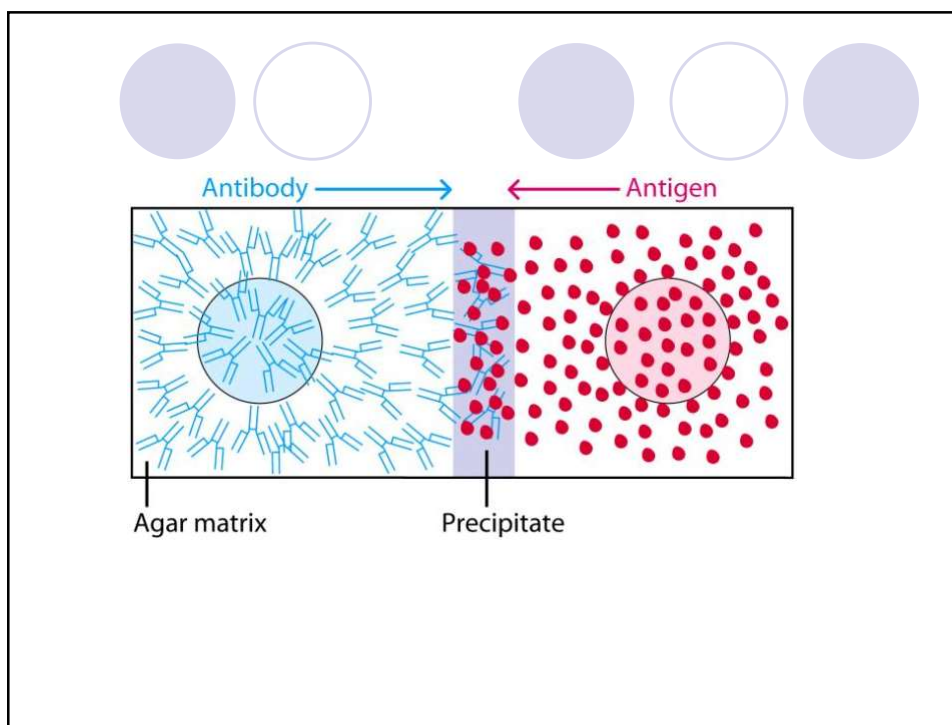
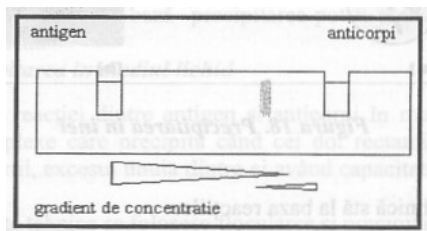
### APLICAȚIILE TEHNICII MANCINI:

- dozarea proteinei C reactive;
- dozarea imunoglobulinelor (mai ales IgG, IgA, IgM și IgD);
- determinarea cantitativă a fracțiunilor complementului;
- determinarea cantitativă a siderofilinei;
- dozarea alfa1 - anti-tripsinei umane etc.

## TEHNICA DE IMUNODIFUZIE DUBLA OUCHTERLONY

### \* PRINCIPIU – TEHNICA DE LUCRU

- Agaroză este turnată într-un strat de câțiva mm grosime pe o placă/lamă de sticlă/cutie Petri.
- Se decupează 2 godeuri pentru fiecare probă de testat, într-un godeu se plasează Atc în celălalt Atg.
- În zona de echilibru va apare un precipitat - traseul de precipitare se deplasează în funcție de conc. Astfel, se va situa aproape de un godeu dacă concentrația elementului inclus la acest nivel este mai joasă.
- Când reacția este terminată (24-48 h), se poate spăla agaroză cu ser fiziologic fără a altera complexe imune reținute de rețeaua agaroză, apoi colora proteinele complexului imun pentru a releva banda de precipitat.



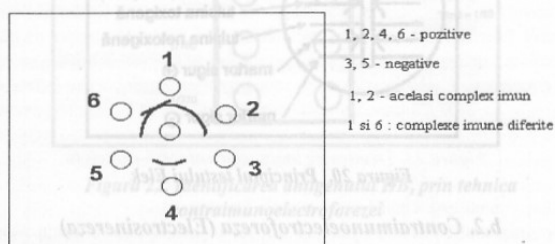
### ● INTERPRETARE

- fuziunea arcurilor → indică un același complex imun ;
- arcuri secante → indicând două complexe imune diferite (godeurile periferice neconținând aceleași Atg) ;
- arcuri duble → în cazul mai multor Atg în godeurile periferice și mai mulți Atc în godeul central.

### ● APLICAȚII

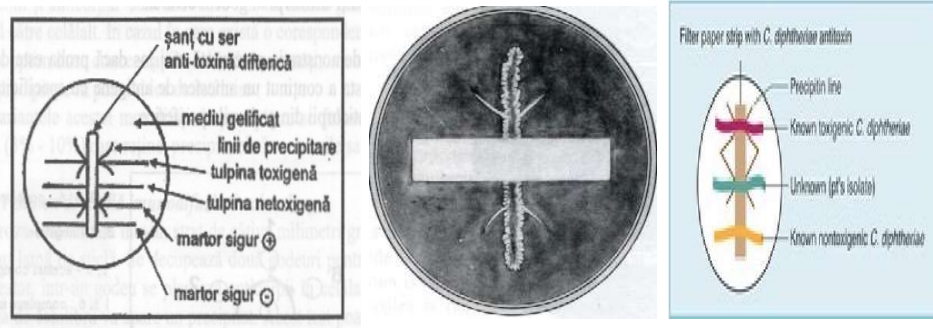
- decelarea unor proteine umane în condiții patologice cum sunt :

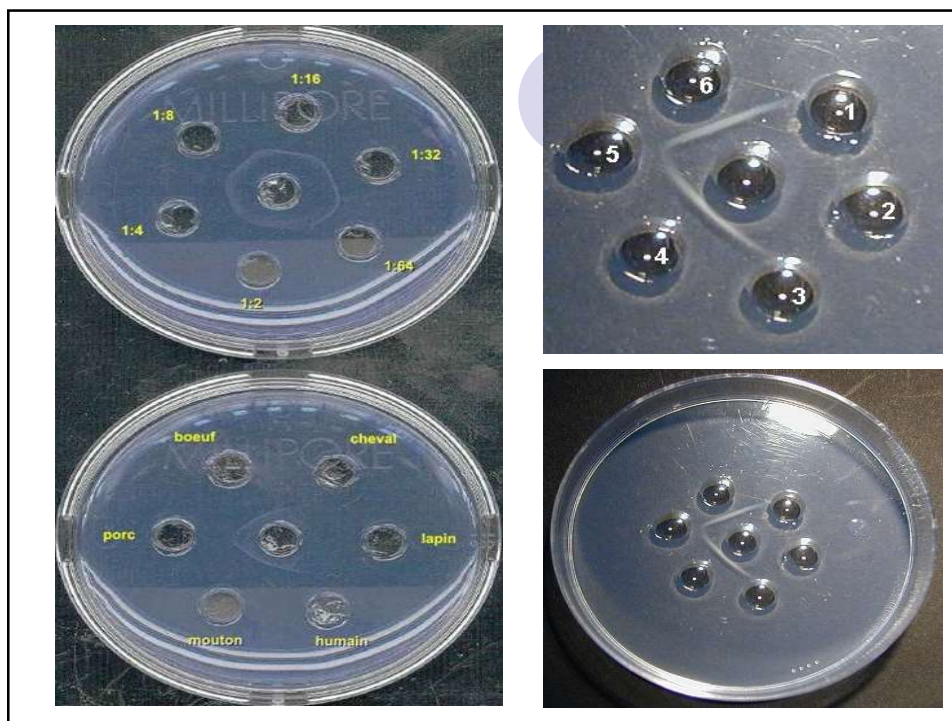
- $\alpha$  - fetoproteina umană,
- proteinele Bence-Jones,
- proteina C reactivă,
- antigenul HBs.



### TESTUL ELEK (identificarea tulpinilor toxigene de bacil difteric)

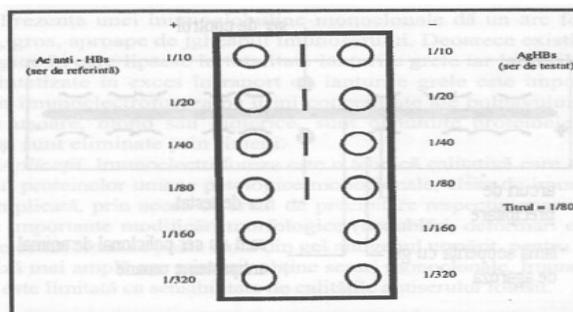
- **PRINCIPIU** - difuzia Atg și Atc în unghi drept.
- În acest caz tulpina de bacil difteric (Atg de testat este reprezentat de toxina difterică) se însămânțează perpendicular pe direcția unui șant practicat în gel în care s-a introdus anterior antiserul ce conține Atc anti-toxină difterică.
- Pozitivarea reacției este indicată de apariția unor trasee de precipitare sub forma unor „mustăți” la locul întâlnirii celor doi reactanți, Atg și Atc migrați în gel.

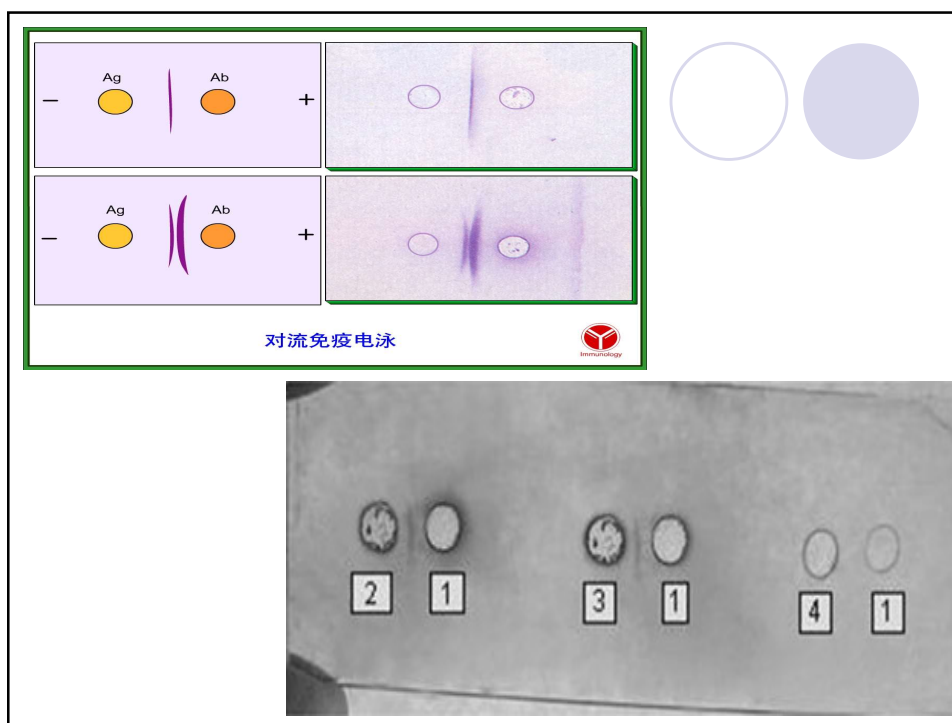




### \*\* CONTRAIMUNOELECTROFOREZA (ELECTROSINEREZA) (CIE)

- Tehnică în care migrarea reactanților este accelerată de curentului electric.
- **PRINCIPIU** - Tehnica se bazează pe faptul că proteinele (Atg) cu migrare anodică sunt precipitate într-un câmp electric de către Atc specifici. La pH=8,2- 8,6 , Atc încărcăți slab (-) se deplasează în gel către catod datorită electroendosmozei iar Atg cu sarcina electrică mai mare migrează spre anod.
- Rezultatele se citesc după 3-4 ore prin prezența imunoprecipitării situată între cele două godeuri.
- Această metodă este mai sensibilă și mai rapidă decât dubla difuzie.
- **APLICATII** - CIE servește la examinarea componentelor Atg din lichide biologice: LCR, urină, lichid pleural, ascită, etc.

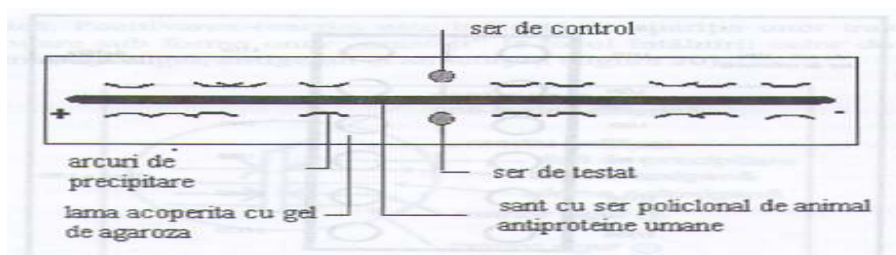


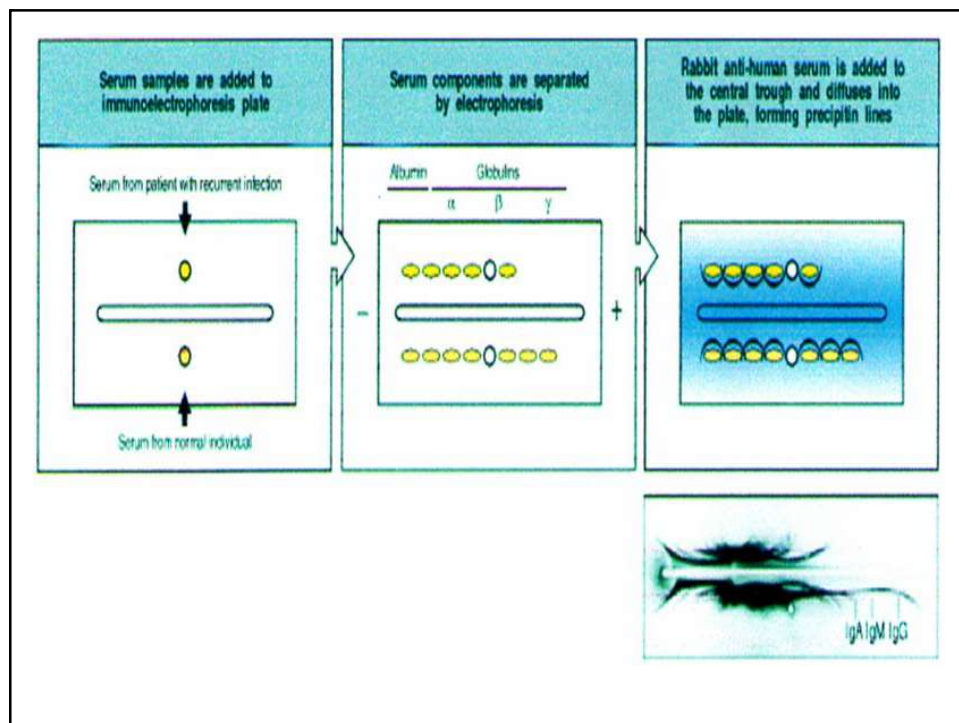


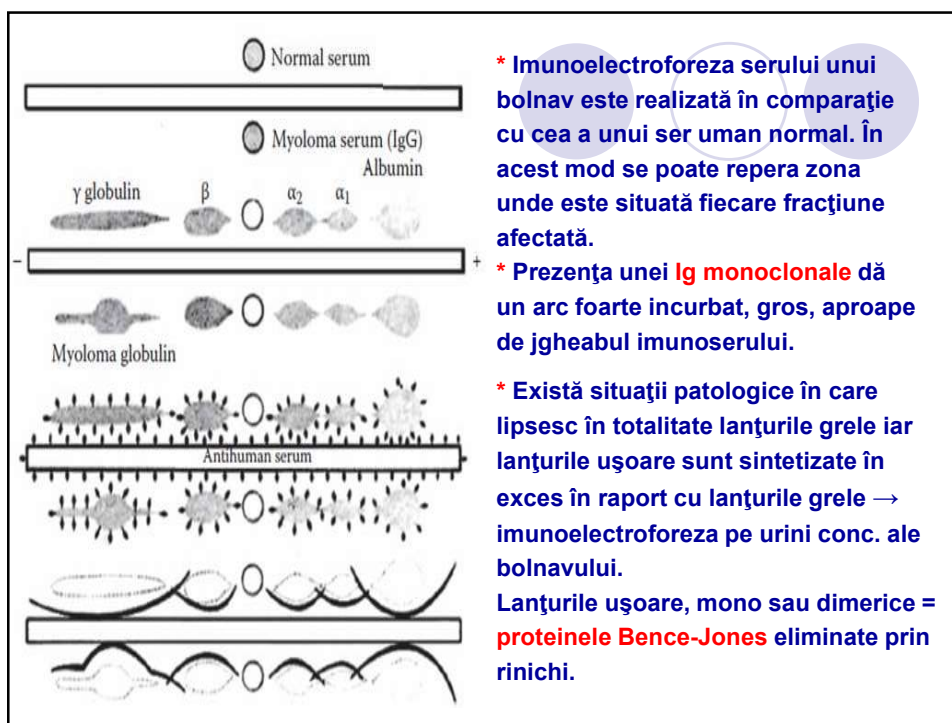
## \*\* IMUNOELECTROFOREZA

### Etapele tehnicii :

- O lamă de microscop este acoperită de agaroză după care se practică 2 godeuri;
- Se separă proteinele electroforetic grație curentului electric (ex : electroforeza serului uman);
- Se decupează apoi un șanț central, în mijlocul lamei, în care se va pipeta ser policlonal de animal anti-proteine umane (Atc anti-Ig umane) care va recunoaște toate fracțiunile proteice din serul uman ;
- După difuzie, se obțin diferite arcuri de precipitare care pot fi colorate și comparate.



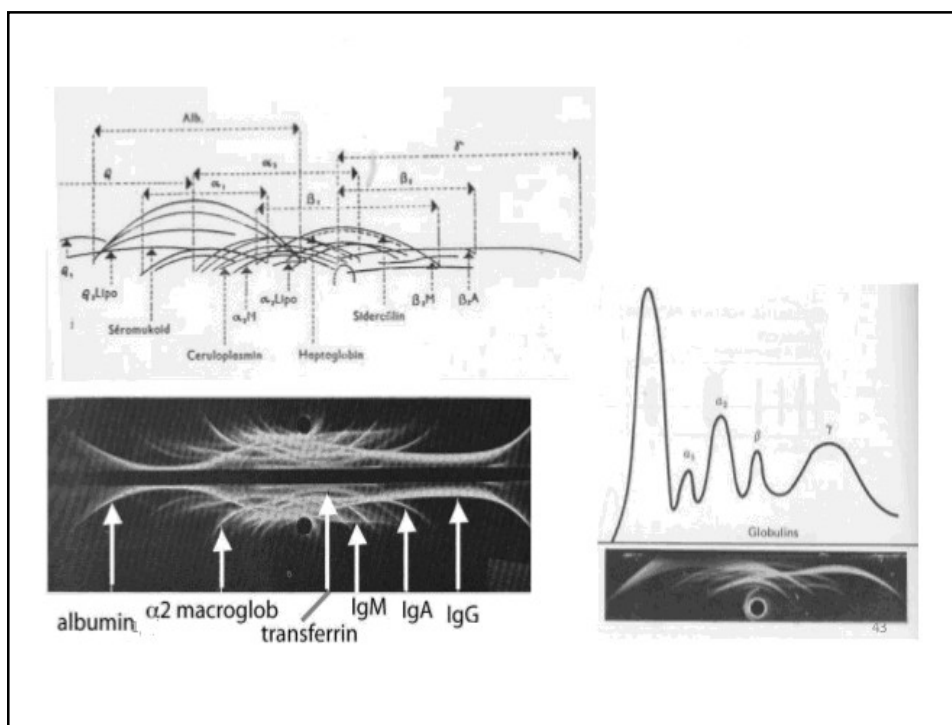
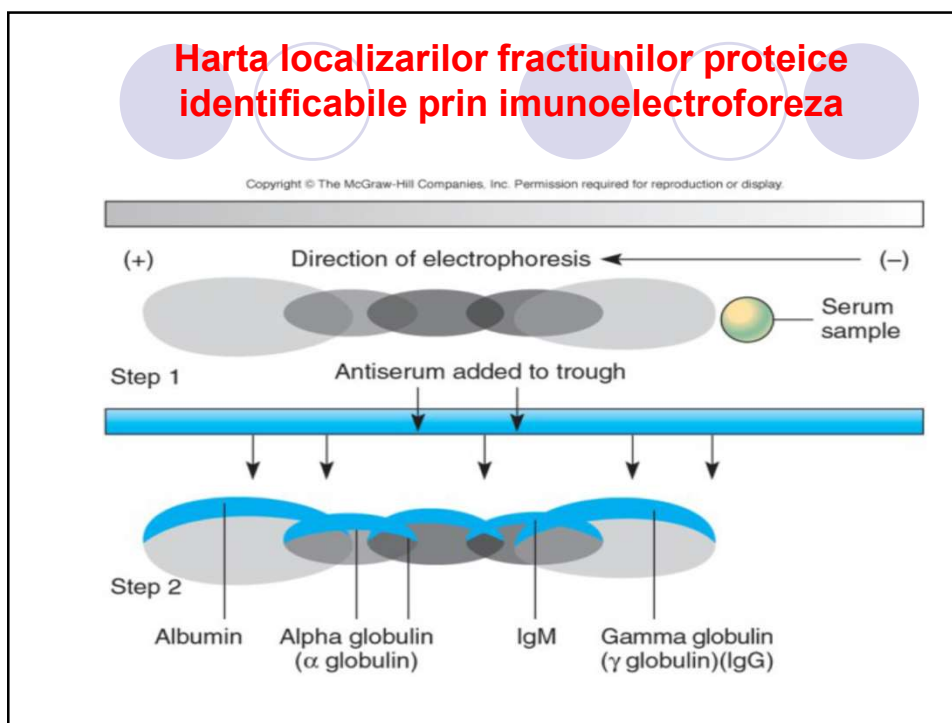




## APLICAȚII

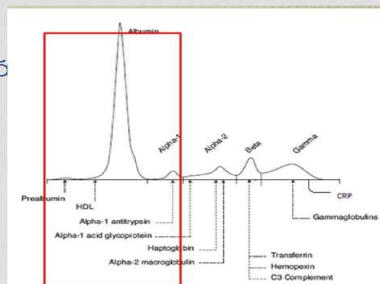
- Imunoelectroforeza este o tehnică calitativă care stabilește în cazul proteinelor umane patologice monoclonale, clasa de Ig implicată, prin aceea că **arcul de precipitare** respectiv apare îngroșat sau cu importante modificări morfologice (*dedublări, deformări* etc).
- Prin imunoelectroforeză se poate izola din gel Atg urmărit, pentru a realiza o analiză mai amplă sau pentru a obține seruri monoclonale. Imunoelectroforeza este limitată ca sensibilitate de calitățile antiserului folosit.

## Harta localizarilor fractiunilor proteice identificabile prin imunoelectroforeza



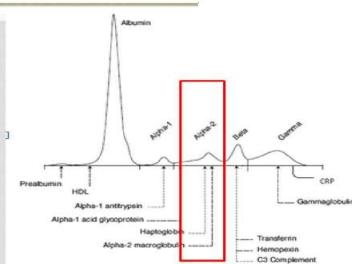
### Zona albumine și alfa1 globuline :

- × Prealbumina
- × Albumina
- × Alfa1-antitripsina
- × Alfa1-glicoproteina acidă
- × Alfa-fetoproteina
- × Protrombina



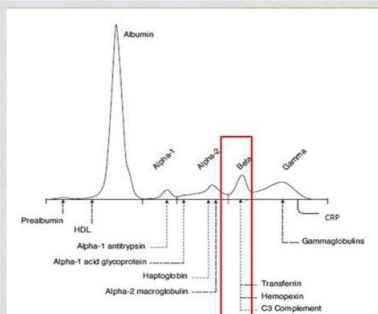
### Zona alfa2 globuline:

- × Haptoglobina
- × Ceruloplasmina
- × Alfa2 macroglobulina
- × Colinesteraza
- × Alfa2 antitrombina
- × Plasminogen
- × Transcortina
- × Eritropoietina
- × Componentele C1, C4, C6, C9 ale complementului
- × Lipoproteine



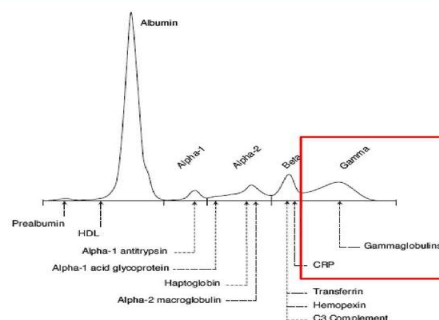
### Zona beta globuline:

- Beta2 microglobulina
- Transferina
- Lizozim
- Beta-lipoproteinele
- Complement- C3



### Zona gama:

- Proteina C reactivă
- Fibrinogenul
- Imunoglobuline



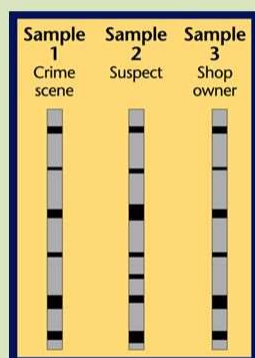




## What is Gel Electrophoresis used for?

### Uses:

1. Evidence in criminal cases



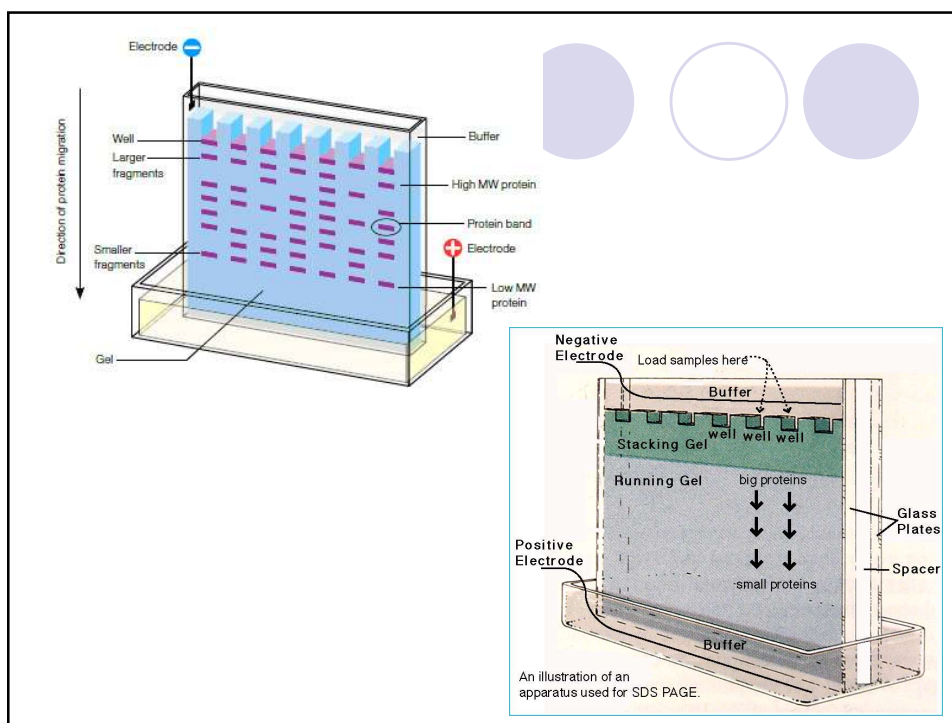
**Who is guilty? Why?**

**The OWNER! The DNA sample is the same as the Owners DNA**



**Who is guilty? Why?**

**Suspect 2! The DNA sample matches the crime scene's DNA!**



## COMPLEXELE IMUNE CIRCULANTE (CIC)

- Complexele imune în exces pot apare în cadrul reactivității imune față de o serie de tipuri de *antigene persistente*:
  - antigene microbiene (antigene ale germenilor infecțioși care determină infecții streptococice, parazitoze, viroze cum sunt mononucleoza, hepatitele virale);
  - autoantigene, specifice bolilor autoimune
  - antigene prezente în mediu sub formă de particule (pulberi, praf) și care sunt inhalate.
- **Cercetarea CIC** în practica clinică este de interes în următoarele situații:
  - pacienții cu afecțiuni în care disordinile autoimune se asociază cu leziuni determinate de reacții de hipersensibilitate imediată tip III (LES, vasculite, crioglobulinemii, poliartrita reumatoidă etc) pot fi urmăriți privind activitatea bolii prin măsurarea CIC;
  - boli infecțioase cum sunt endocarditele, lepra, hepatitele virale sau infecțiile parazitare.

### DIAGNOSIS OF IMMUNE CIRCULAR COMPLEXES (CIC)

Determination of CIC in clinical practice is of interest in the following situations:

- patients with conditions in which autoimmune disorders are associated with lesions caused by type III immediate hypersensitivity reactions (SLE, vasculitis, cryoglobulinemia, rheumatoid arthritis etc.) can follow the disease activity by measuring CIC;
- infectious diseases such as endocarditis, leprosy, viral hepatitis or parasitic infections.

### PRINCIPLE OF PRECIPITATION OF IMMUNE COMPLEXES WITH PEG

Principle of the method - Polyethylene glycol with molecular weight 6000 changes the solubility of immune complexes, allowing them to be highlighted by precipitation.

#### The working technique

Reagent 1: PEG 6000 solution in borate buffer

Reagent 2: boron buffer, pH = 8.4.

- Blood samples after harvest are kept at thermostat for 3 hours at 37 ° C, then clot and decant the serum.
- The serum thus obtained can be stored in the refrigerator (+ 4 ° C) until processing.

#### Prepare the sample and the control according to the table:

- The sample and control shall be stored overnight (24 hours) in the refrigerator (+4 ° C), after which are measured the extinction of the sample (ES) and the control (EC) against the distilled water at the wavelength  $\lambda = 450$  nm, in 1 cm cuvette.

- Calculation:  $E = (ES - EC) \times 1000$  (photometric units),

ES = sample extinction, EC = extinction of the blank/Control

- Normal values: 0-50 photometric units

| Reagents  | u.m. | Sample (S) | Control (C) |
|-----------|------|------------|-------------|
| Serum     | ml   | 0,1        | 0,1         |
| Reagent 1 | ml   | 2,9        | -           |
| Reagent 1 | ml   | -          | 2,9         |

## IDENTIFICAREA CRIOGLOBULINELOR

- *Crioglobulinele* reprezintă agregate serice constituite fie numai din imunoglobuline fie dintr-o formă specială de complexe antigen-anticorp care precipită (reversibil) la temperaturi scăzute și se solubilizează după expunerea la 37°C.
- *Crioglobulinemia* reprezintă starea caracterizată prin prezența anormală de crioglobuline în sânge care sunt precipitate în vasele mici în urma expunerii la temperaturi scăzute și care cauzează diminuarea fluxului sanguin în ariile expuse, finalizată uneori cu necroză.

- Există 3 tipuri de *crioglobulinemie* din punct de vedere imunochimic:

**Tipul I** (20-25% din crioglobulinemii)-este reprezentat de prezența unui singur tip de *imunoglobuline monoclonale*, uzual aparținând izotipului *IgM* (dar pot fi și *IgG*, *IgA*, sau proteine Bence Jones), în general fără activitate de factor reumatoid (FR); este asociat cu mielom multiplu, boala Waldenstrom, limfoame ne Hodgkiniene.

**Tipul II** (25%-40%) - este reprezentat de *imunoglobuline monoclonale IgM* (cu activitate de FR) și *policlonale IgG* (mai rar *IgA*); comun în hepatita virală C, sindrom Sjogren.

**Tipul III** (40-50%) - denumit *crioglobulinemie mixtă policlonală* se caracterizează prin prezența de *Ig policlonale G, M, A* legate prin activitatea de FR; *variante* :*IgM-IgG*, *IgM-IgG-IgA*; frecvent în boli de collagen, infecții cronice.

| Tipul<br><i>crioglobulinemiei</i> | Compoziția<br>chimică                                 | Boli asociate                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tip I</b>                      | IgM<br>IgG<br>IgA<br>Lanțuri<br>monoclonale<br>ușoare | ✱ Mielom<br>✱ Boala Waldenstrom<br>✱ Macroglobulinaemia<br>✱ Leucemia cronică limfocitară<br>✱ Limfadenopatie<br>✱ Leucemia cu celule păroase                                                                                                                                  |
| <b>Tip II</b>                     | IgM-IgG<br>IgG-IgG<br>IgA-IgG                         | ✱ Mielom<br>✱ Boala Waldenstrom<br>✱ Macroglobulinaemia<br>✱ Leucemia cronică limfocitară<br>✱ Crioglobulinemia mixtă esențială                                                                                                                                                |
| <b>Tip III</b>                    | IgM-IgG<br>IgM-IgG-IgA                                | Boli autoimune:<br>✱ Lupus (LES)<br>✱ Artrita reumatoidă<br>✱ Sclerodermia<br>✱ Sindrom Sjogren<br>✱ Hepatita cronică activă<br>✱ Ciroza biliară primară<br>✱ Nefrita post streptococică<br>Vasculite<br>Infecții: EBV, Sifilis, Hepatite, Leprosy,<br>Kala-azar, Sindrom Lyme |

**Din punct de vedere clinic**, crioglobulinemiile, mai ales cele mixte, sunt caracterizate prin **triada**:

- purpură vasculară,
- artralгии,
- stare de oboseală.

**Diagnosticul unei crioglobulinemii** presupune trei etape:

- evidențierea crioglobulinelor și diferențierea lor de alte crioproteine (fibrinogenul, aglutininele la rece);
- analiza lor calitativă și cantitativă;
- precizarea manifestărilor de vasculită și a bolii de bază.

#### IDENTIFICAREA CRIOGLOBULINELOR

- Sângele este *prelevat "a jeun"* cu o seringă preîncălzită la 37°C și colectat în tuburi uscate care sunt menținute la temperatura de 37°C, 3-4 ore pentru a separa cheagul. Nerespectarea acestei precauții poate să ducă la precipitarea momentană a crioglobulinelor și implicit la rezultate eronate.
- După *separare*, *serul bolnavului* este centrifugat și repartizat în 2 tuburi:
  - un tub se conservă la *termostat* iar
  - celălalt este *refrigerat la + 4° C* (cel puțin 48-72 ore).
- După acest interval de timp se compară macroscopic tuburile ; **prezența crioglobulinelor este indicată de un precipitat care apare în tubul menținut la rece**, precipitat care va dispărea după încălzirea lui la 37°C.
  - Tubul menținut la termostat de la începutul testării, folosit ca martor, nu va prezenta precipitat.
- După izolarea și spălarea precipitatului are loc analiza crioprecipitatului (tipajul crioglobulinei) pentru identificarea componentelor (izotipurile Ig, fracțiuni de complement, complexe imune circulante) crioglobulinei care se face prin diferite metode sensibile: imunoelectroforeză, imunofixare (immunoblotting), electroforeză în gel de poliacrilamidă.