



Reacții care utilizează **HEMATIILE** ca indicatori

- **R. de hemaglutinare pasivă sau indirectă (HAP)**
- **R. de inhibare a hemaglutinării (HAI)**
- **R. de fixare a complementului (RFC)**
- **R. de evidențiere a Atc anti-SLO (ASLO)**
- **Testul Coombs**



HEMAGLUTINAREA DIRECTA

HEMAGLUTININAREA DIRECTA

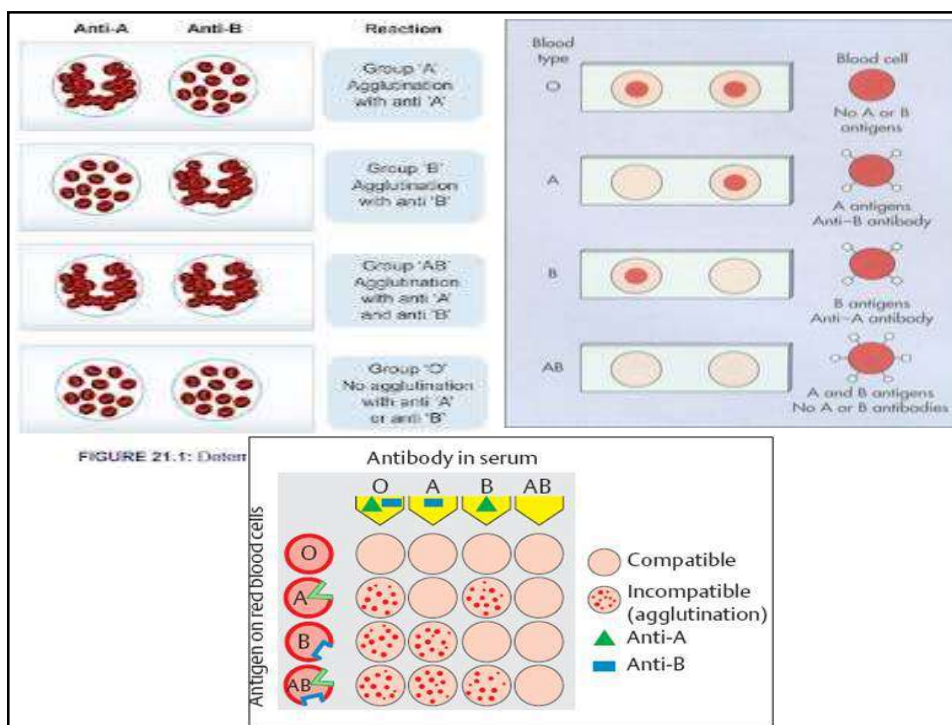
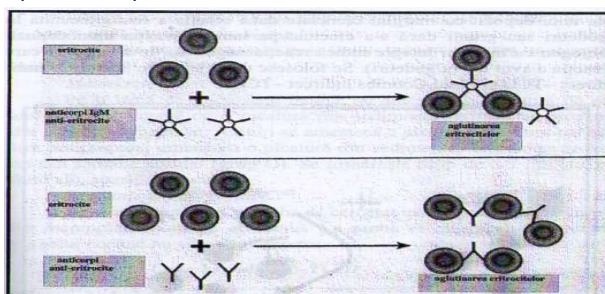
APLICATII PRACTICE

Hemaglutinarea directă este utilizată pentru :

- *determinarea grupelor sanguine sau*
- identificarea hematiilor animale, prin punerea în contact a hematiilor și a unui ser care conține Atc specifici.

PRINCIPIU - Stabilirea grupei sanguine se realizează prin cercetarea Atg (aglutinogene A și B) legate de eritrocite și a Atc (aglutininelor α și β).

- De ex. serul specific anti-A va aglutina hematiile A și nu pe cele B sau O (Atc formează punți între hematii) → prezența aglutinării = apariția grunjiilor
- Ig din izotipul IgM au o activitate aglutinantă mai înaltă față de cele din izotipul IgG date fiind cele 5 situsuri active pe care le posedă.



Cell#	Rh ⁺ rh	Donor Number	Rh-hr							KELL					DUFFY		KIDD		Lewis		MNS			P		LUTHERAN					
			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	+	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.



TESTUL COOMBS

- Hemaglutinarea sta si la baza testului Coombs care identifică Atc liberi sau fixati pe hematii, Atc care pot apare în anumite stări patologice cum sunt **anemiile hemolitice**.

-In cazul **R+** hematiiile acoperite cu anticorpi sunt aglutinate în vitro cu un ser antiglobulinic (produs pe iepure prin injectarea de globuline umane).

REACTII DE AGLUTINARE TIP COOMBS

- Atc „neaglutinanti ” (incompleti) desi se fixeaza pe Atg omologi nu reusesc sa apropie eritrocitele pentru a forma aglutinate eritrocitare in mediul salin.
(ex de Atc neaglutinanti - Ig G).

- Se folosesc diverse *artificii tehnice* : utilizarea Atc anti-globuline umane, tratarea enzimatica a eritrocitelor.

PRINCIPIUL REACTIEI – Hematiile umane pe care se fixeaza Atc specifici incompleti devin aglutinabile in prezenta serului anti-imunoglobuline umane, ale carui Ig se atașează specific pe complexele hematii-Atc incompleți formate →
→ R + - macroscopic se observa aparitia unui **depozit cu margini crenelate (godeuri), sau grunji (lama)**.

TESTUL COOMBS DIRECT TCD

PRINCIPIU - Se evidentiaza prezenta Ig ca Atc (sau fractiuni de complement) fixati in vivo pe suprafata eritrocitelor.

MATERIALE NECESARE

- Sange de cercetat recoltat pe *anticoagulant* (1ml sange de cercetat se spala prin centrifugare de 5-6 ori cu cate 10 ml sol cloruro-sodica 9% pentru indepartarea proteinelor plasmatice, dupa care se retine **sedimentul eritrocitar**) ;

- Sange normal grup 0 (martor) recoltat pe anticoagulant

- Ser anti-proteina umana (ser imun de cal) = ser anti-Ig umane

METODA DE LUCRU (pe lama)

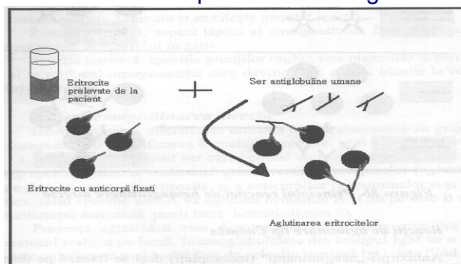
- ser anti-proteina umana + sediment eritrocitar provenit din sangele de cercetat

- **Martor** : ser anti-proteina umana + sediment eritrocitar provenit din sangele normal (grup 0).

INTERPRETARE

- Proba de cercetat → **aglutinare** →
→prezenti Atc incompleti fixati pe eritrocite

- Martor → NU este prezenta aglutinarea



TESTUL COOMBS INDIRECT TCID

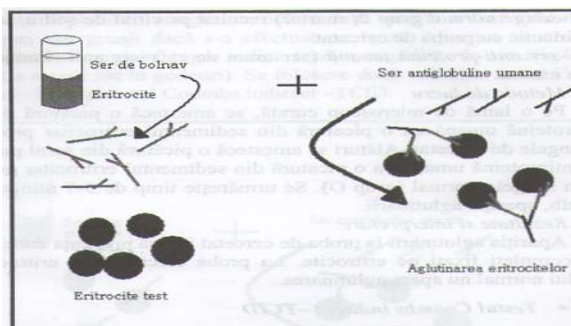
Testul Coombs indirect se realizează în 2 timpi :

1. SENSIBILIZAREA ERITROCITELOR - serul de bolnav în care căutăm Atc se incubează cu o baterie de eritrocite test de grup cunoscut (eritrocite ale căror Atg de membrana sunt determinate)

→ Atc se fixează selectiv pe Atg eritrocitelor test (reacție invizibilă cu ochiul liber)

2. FAZA DE REVELATIE - se adaugă ser antiproteina umană (reactiv antiglobulinic) care servește ca legătură între globulinele fixate la suprafața eritrocitelor → AGLUTINAREA

- **APLICAȚIILE TESTULUI**
- Un exemplu de aplicare a testului Coombs indirect se referă la **cercetarea Atc în sistemul Rh**.



CERCETAREA ATC ÎN SISTEMUL RH

Pentru cercetarea Atc anti-RhoD, eritrocitele "O" Rho D pozitive (+) și D negative (-) vor fi, într-o primă etapă, sensibilizate cu serul de cercetat.

MATERIALE NECESARE

- *Sânge de cercetat*, recoltat *fără anticoagulant*, pentru obținerea serului care este apoi inactivat 30 min la 56°C.
- *Sânge de grup O RhoD + și RhoD -*, recoltate fiind efectuate pe citrat de sodiu 3,8% (1 ml sânge din fiecare grup se spală prin centrifugare de 5-6 ori cu câte 10 ml soluție cloruro-sodică 9% pentru îndepărtarea proteinelor).
- *Ser anti-proteina umană = ser anti-Ig umane*

METODA DE LUCRU

- 2 tuburi de hemoliză

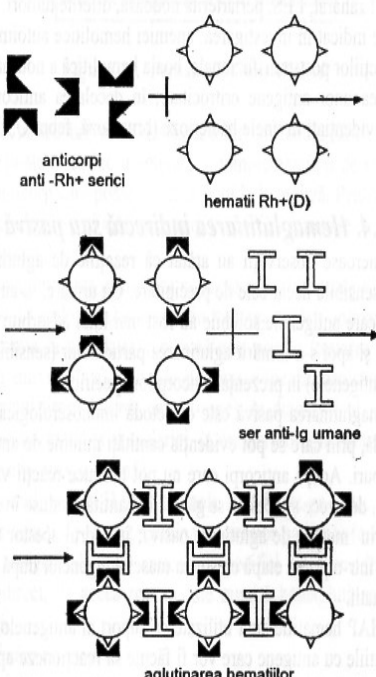
Tubul I 0,5 ml ser de cercetat + 0,5 ml suspensie 2% eritrocite de grup O RhoD+
Tubul II 0,5 ml ser de cercetat + 0,5 ml suspensie 2% eritrocite de grup O RhoD -
Incubare de 1 oră la 37°C.

- Pe lamă

1 pic de *ser antiproteină umană* + 1 pic de *sediment eritrocitar din tubul 1*
1 pic de *ser antiproteină umană* + 1 pic de *sediment eritrocitar din tubul 2*

INTERPRETARE

- Apariția aglutinării eritrocitelor din tubul 1 și absența aglutinării eritrocitelor din tubul 2, în timp de 5-7 min, indică prezența Atc incompleți, anti-antigen D din serul de cercetat.



Aplicațiile testului Coombs

TCD poate fi pozitiv în :

- anemia hemolitică autoimună idiopatică (eritrocite sensibilizate prin Atc de clasă IgG);
- transfuzie de sânge incompatibil (eritrocite sensibilizate cu IgG sau C3d);
- sensibilizarea eritrocitelor cu medicamente *in vivo*, prin atc clasa IgG;
- boala hemolitică a noului-născut (eritrocite sensibilizate cu IgG);
- hepatita infecțioasă, pneumonia virală, pneumonia cu Mycoplasma, mononucleoza infecțioasă, meningita, TBC, anemia megaloblastică, diabetul zaharat, LES, periarterita nodoasă, diferite tumori.

TCD este indicat în investigarea:

- anemiei hemolitice autoimune idiopatice,
- reacțiilor post-transfuzionale,
- boala hemolitică a nou-născutului,
- identificarea unor Atg eritrocitare,
- în decelarea Atc incompleți evidențiați în unele bacterioze (bruceloză, febra Q, febră tifoidă).



REACTIA DE HEMAGLUTINARE PASIVĂ SAU INDIRECTĂ (HAP)

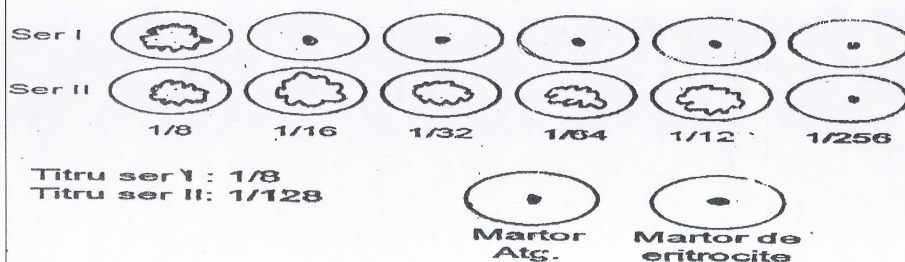
HAP

- Hemaglutinarea pasiva este o metoda imunoserologica deosebit de sensibila, prin care se pot evidientia cantitati minime de anticorpi de diferite tipuri.
- **PRINCIPIUL TEHNICII** - In cazul reactiei HAP antigenele sunt fixate pe eritrocite cu ajutorul unor agenti de legare; aglutinarea acestor particule (eritrocite) invelite cu Atg de catre Atc specifici este considerata ca un proces indirect, de aceea reactia este numita hemaglutinare indirecta sau pasiva.
- **ELEMENTELE REACTIEI**
 1. Serul de cercetat din care se efectueaza dilutii binare succesive
 - **serul I** recoltat la debut
 - **serul II** recoltat in convalescenta
 - serurile se inactiveaza la 56°C, 30 min – pt denaturarea complementului si a evita hemoliza
 2. Atg standard cunoscut
 3. Eritrocite de oaie

- **TEHNICA REACTIEI**
 - Se efectueaza dilutii binare din serurile de testat
 - Se adauga la fiecare dilutie **Atg de lucru**
 (inainte de realizarea reactiei propriu-zise se obtine antigenul de lucru : la 4 ml de Atg standard se adauga 0,1 ml eritrocite de oaie → incubare de o ora la 37°C → centrifugare → se retine sedimentul din care se pregateste suspensia necesara)
 - INCUBARE 24 ore la 37°C
- MARTORII** reactiei
 - Martor de **Atg** : Atg + diluent → hemaglutinare absenta
 - Martor de **E** : E + diluent → hemaglutinare absenta
 - Martor de **ser sigur +** : ser cu Atc hemaglutinanti pasivi + Atg de lucru → hemaglutinare prezenta
 - Martor de **ser sigur -** : ser fara Atc hemaglutinanti pasivi + Atg de lucru → hemaglutinare absenta

● INTERPRETAREA REACTIEI

C. REACTIA HAP – Stabilirea titrului de anticorpi hemaglutinanti pasivi



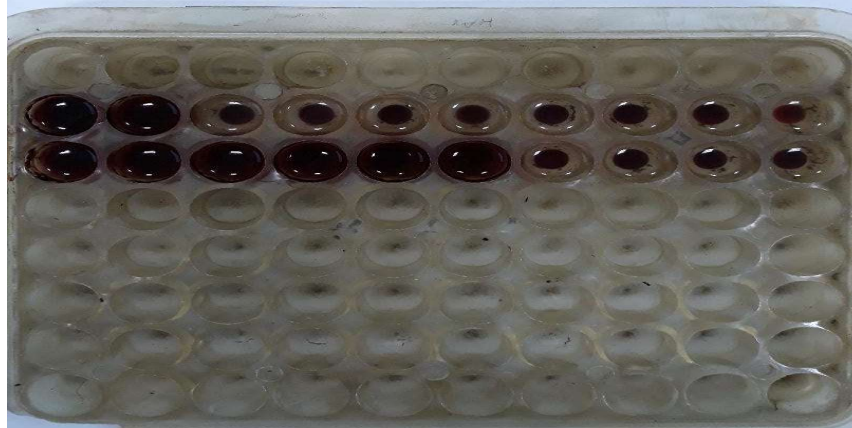
Titrul Atc hemaglutinanti = cea mai mare dilutie a serului care mai prezinta aglutinare

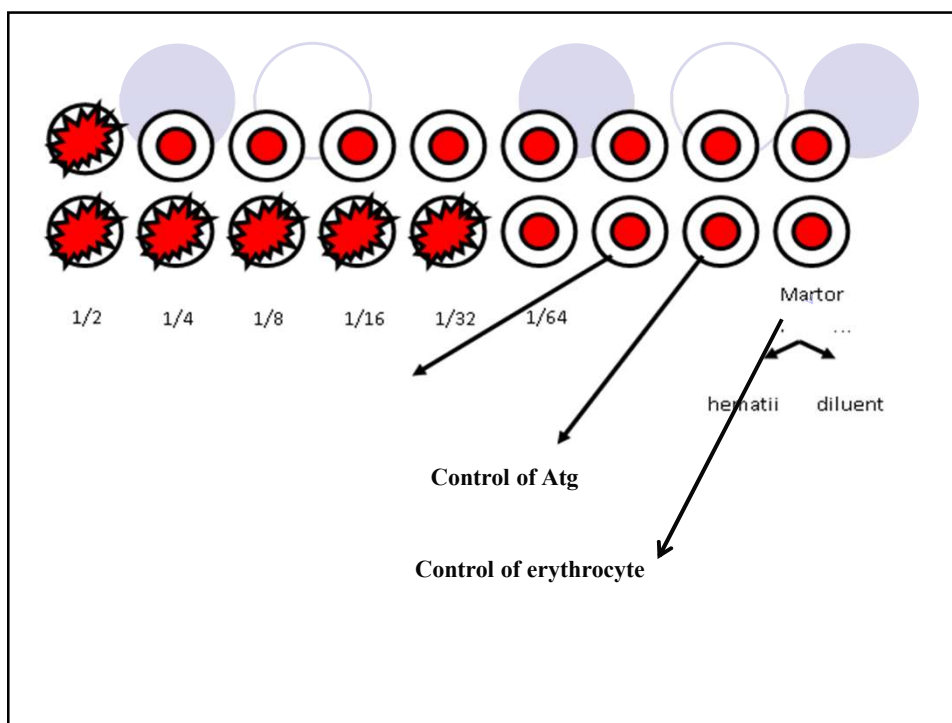
CITIREA REACTIEI

- titrul Atc aglutinanti pasivi este dat de dilutia cea mai mare a serului de testat la care se mai produce hemaglutinarea (depozit neomogen de eritrocite, cu margini franjurate).
- Martorii de Atg, de eritrocite, de ser sigur negativ → hemaglutinare absenta
- Martorul de ser sigur pozitiv → aglutinarea eritrocitelor

Nr. tub (godeu)	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluent (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Ser de testat (ml) Dilutie 1/5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Atg. virei cuplat cu eritrocite tenate (ml) (dilutie eritrocite in suspensie 2,5%)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Dilutia serului	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280

Schema reactiei HAP





● APLICATIILE REACTIEI HAP

- diagnosticul serologic al rujeolei,
- În vederea titrării anticorpilor antivirus vaccinia la populația vaccinată antivariolic (testarea eficacității vaccinării antivariolice),
- bolile autoimune (pentru depistarea auto-anticorpilor anti-tiroglobulina, anti-histone),
- diagnosticul serologic al tifosului exantematic și al malariei,
- în endocrinologie (detectarea anticorpilor anti-tiroglobulina).

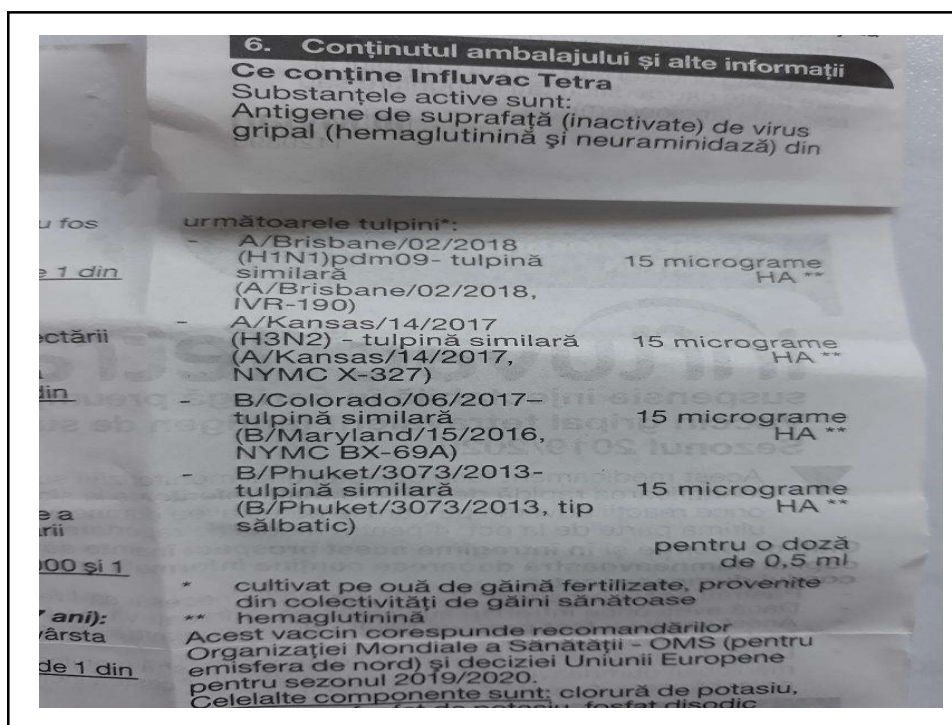


REAȚIA DE INHIBARE A HEMAGLUTINĂRII (HAI)

- **HAI** - Reacția de inhibare a hemaglutinării face parte din reacțiile care testează pierderea capacității de manifestare a unor efecte virus-specifice în prezența unui ser imun specific.
- Reacția HAI este utilizată frecvent pentru a detecta prezența Atc față de un virus hemaglutinant, în serul unui pacient suspectat de o infecție cu virus specific.
- **PRINCIPIU** - Reacția HAI folosită în **viroze** se bazează pe capacitatea anumitor virusuri, cum sunt **myxovirusurile** sau **virusul rujeolos** (paramyxovirus) de a determina aglutinarea eritrocitelor (**hemaglutinare**) prin intermediul unor componente din structura virusului.

Prezintă în structura lor proteinele funcționale:

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - virusurile gripale, - virusurile paragripale ➡ - virusul rujeolos | <ul style="list-style-type: none"> - Hemaglutinina (H) - Neuraminidaza (N) → AH1N1 - proteina factorului de fuziune celulară și - proteina responsabilă de hemoliză. |
|--|---|



Medicul dumneavoastră/farmacistul va decide dacă trebuie să vi se administreze Influvac Tetra. Adresați-vă medicului dumneavoastră sau farmacistului pentru recomandări înainte de a lua orice medicament.

Conducerea vehiculelor și folosirea utilajelor
Influvac Tetra nu are nicio influență sau are influență neglijabilă asupra capacității de a conduce vehicule sau de a folosi utilaje.

Influvac Tetra conține sodiu și potasiu
Acest medicament conține sodiu mai puțin de 1 mmol (23 mg) per doză, adică practic "nu conține sodiu".
Acest medicament conține potasiu mai puțin de 1 mmol (39 mg) per doză, adică practic "nu conține potasiu".

3. Cum se utilizează Influvac Tetra

Doze
La adulți se va administra o doză de 0,5 ml.

Utilizare la copii și adolescenți
Copiilor cu vârsta cuprinsă între 3 ani și 17 ani li se va administra o doză de 0,5 ml.
Copiilor cu vârsta mai mică de 9 ani care nu au mai fost vaccinați anterior cu un vaccin gripal sezonier: o a doua doză va fi administrată la un interval de timp de cel puțin 4 săptămâni.
Pentru copii cu vârsta mai mică de 3 ani, siguranța și eficacitatea Influvac Tetra nu au fost încă stabilite.

Mod și/sau cale(căi) de administrare
Medicul dumneavoastră vă va administra doza recomandată de vaccin prin injecție în mușchi sau profund, sub piele.
Dacă aveți orice întrebări suplimentare cu privire la acest medicament, adresați-vă medicului dumneavoastră sau farmacistului.

4. Reacții adverse posibile
Ca toate medicamentele, Influvac Tetra poate provoca reacții adverse, cu toate că nu apar la toate persoanele.
Prezențați-vă imediat la medic dacă dumneavoastră sau copilul dumneavoastră vă confrunțați cu oricare dintre următoarele reacții adverse - este posibil ca dumneavoastră sau copilul dumneavoastră să aveți nevoie de asistență medicală de urgență.
Reacții alergice severe (cu frecvență necunoscută, raportate ocazional în timpul utilizării generale a vaccinului gripal trivalent Influvac)

- care pot conduce la urgențe medicale, manifestate prin: tensiune arterială mică, respirație rapidă, superficială, bătăi rapide ale inimii și puls slab, piele rece, umedă, amețală. Care pot duce la colaps (șoc).
- umflare, mai evidentă la nivelul gâtului și capului, inclusiv la nivelul buzelor, limbii, gâtului sau oricărei alte părți a corpului și care poate cauza dificultăți la înghițire sau respirație (angioedem)

In timpul studiilor clinice cu Influvac Tetra au fost observate următoarele reacții adverse:

Adulți și vârstnici:
Foarte frecvente: care afectează mai mult de 1 din 10 persoane:

- durere de cap
- senzație de oboseală
- reacție adversă locală: durere la locul injectării vaccinului

* La vârstnici (≥ 61 ani) raportată ca frecvență

Frecvente: afectează 1 până la 10 persoane din 100:

- transpirații
- dureri musculare (mialgii), dureri articulare (artralgii)
- stare generală de rău (maleză), frisoane
- reacții adverse locale: înroșire, umflare, tendință de învinetire (echimoză), apariție a unei zone dure (indurație) la locul injectării vaccinului.

Mai puțin frecvente: afectează între 1 din 1000 și 1 din 100 persoane:

- febră

Copii (cu vârsta cuprinsă între 3 ani și 17 ani):
Reacții adverse care au apărut la copii cu vârsta cuprinsă între 3 ani și 5 ani.

Foarte frecvente: care afectează mai mult de 1 din 10 persoane:

- intabilitate
- stare de oboseală
- pierderea poftei de mâncare
- reacții adverse locale: durere la locul vaccinării, roșeață, umflare, indurație în jurul zonei în care vaccinul a fost injectat

Frecvente: afectează 1 până la 10 persoane din 100:

- transpirații
- diarree/vărsături
- febră
- reacții locale: tendință de învinetire (echimoză)

Reacții adverse care au apărut la copii cu vârsta cuprinsă între 6 ani și 17 ani:

Foarte frecvente: care afectează mai mult de 1 din 10 persoane:

- dureri de cap
- simptome gastrointestinale
- dureri musculare (mialgie)
- oboseală, stare de rău general (malaise)
- reacții locale: durere la locul vaccinării, roșeață, umflare, indurație în jurul zonei în care vaccinul a fost injectat

Frecvente: afectează 1 până la 10 persoane din 100:

- transpirații
- simptome ale articulațiilor (artralgii)
- febră
- frisoane
- reacții locale: tendință de învinetire (echimoză)

La toate grupele de vârstă, majoritatea reacțiilor adverse au fost înregistrate în cadrul primelor 3 zile după vaccinare și s-au remis spontan la 1 zi până la 3 zile după debut. Intensitatea acestor reacții adverse a fost în general ușoară.

Alături de reacțiile adverse...

Mylan
1120390

TEHNICA REACTIEI HAI

ELEMENTELE REACTIEI

Serurile de testat

- serul I de debut
- serul II de convalescență

(in care căutam Atc inhibitori ai hemaglutinării)

Antigenul standard
(tulpini standard de virus gripal);

Înainte de folosire în reacție,
Atg viral standard va fi
titrat

⇕

Serul va fi supus unui
tratament pentru îndepărtarea inhibitorilor naturali ai hemaglutinării,
cu RDE (enzima distrugătoare de receptori)

→ la 1 volum de ser (0,1ml) se adaugă 4 volume (0,4ml) RDE
→ urmează inactivarea 30 min la 56° C.

⇕

Suspensia de eritrocite
(eritrocite de cocoș
în tampon Alsever)

METODA DE LUCRU – TIMPII REACTIEI

- se efectuează diluții binare din serul de cercetat în soluție tamponată izotonă; în fiecare godeu se pune câte 0,2 ml;
- se adaugă la fiecare diluție Atg reprezentat de virusul standard titrat (4 UH) (*Atg viral standard se titrează pt a determina cantitatea minimă și suficientă de Atg care trebuie introdusă în reacție, capabilă să determine aglutinarea hematiilor*) în cantitate de 0,2 ml/ godeu

→ INCUBARE 30 min la t camerei

- se adaugă în fiecare tub (godeu) 0,4 ml din suspensia de eritrocite 0,5%

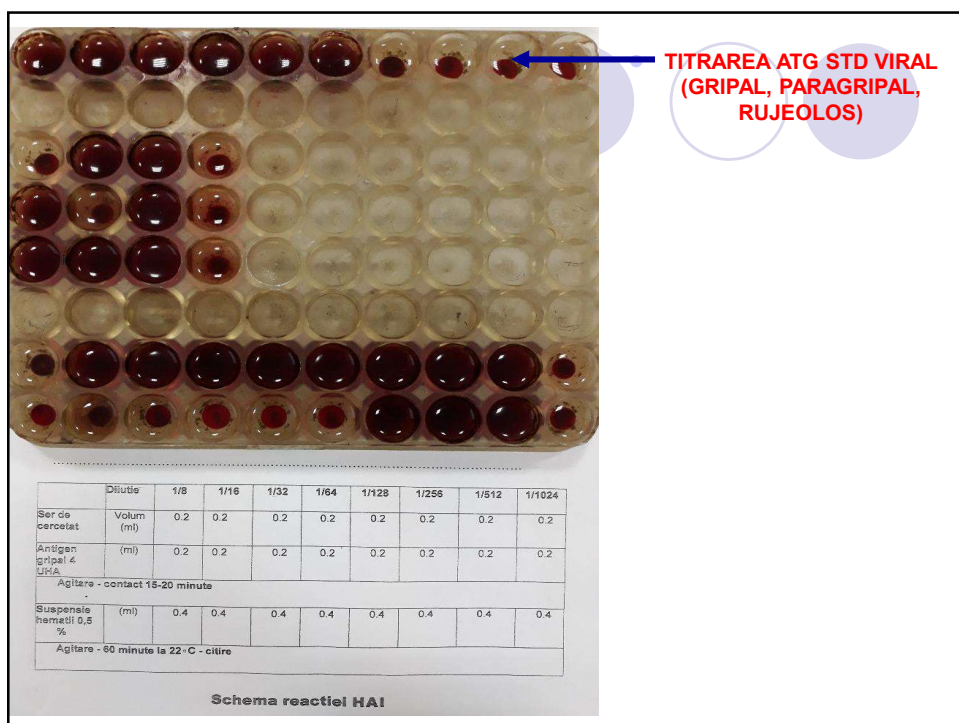
→ REINCUBARE la t camerei timp de 60 min

→ CITIREA REACTIEI

• MARTORII REACTIEI HAI

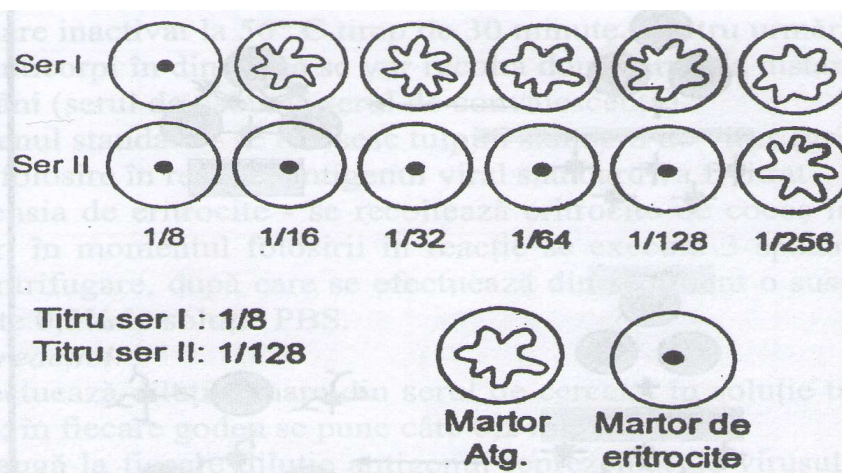
În afara seriei de diluții din ser, în reacție vor fi introduși următorii **martori**:

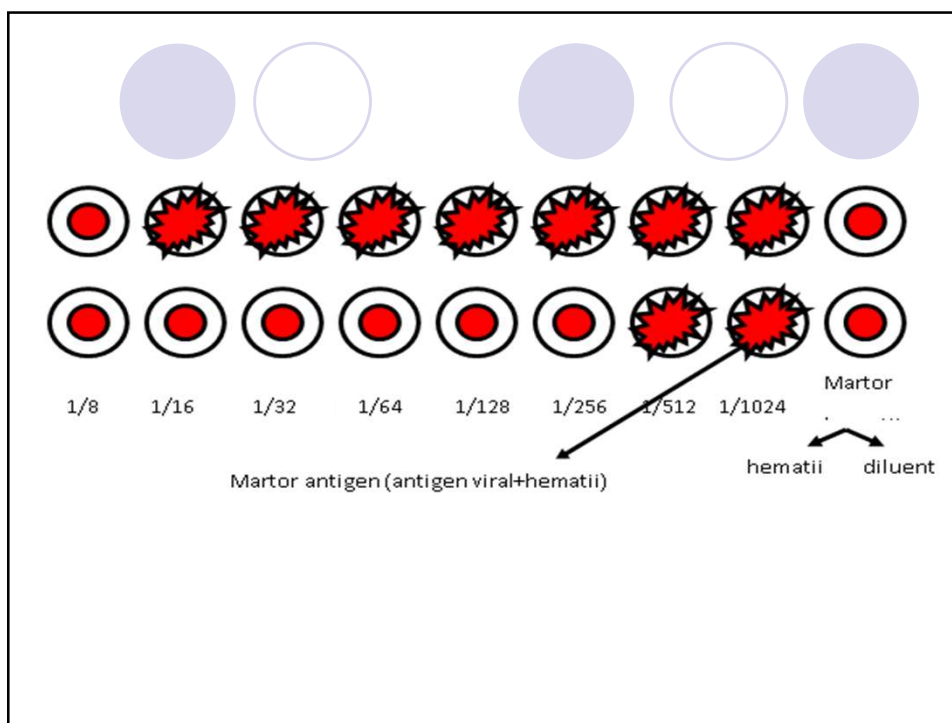
- **martor virus standard** : virus + eritrocite => *hemaglutinare prezentă*;
- **martor ser normal** : ser normal (fără Atc hemaglutinino-inhibanți) + virus standard + eritrocite => *hemaglutinare prezentă*;
- **martor ser sigur pozitiv** : ser sigur pozitiv + virus standard + eritrocite => *hemaglutinare absentă*;
- **martor ser de testat** : (ser de testat, fără virus standard, dar cu eritrocite) => *hemaglutinare absentă*;
- **martor de eritrocite** : eritrocite în tampon PBS => *hemaglutinare absentă*.



CITIREA REACTIEI

Titru **Atc hemaglutinino-inhibanti** ai serului este reprezentat de diluția cea mai mare din serul de cercetat la care se mai notează absența / inhibarea hemaglutinării





•APLICATII PRACTICE

- diagnosticul serologic al unor viroze
(gripa, rujeola, oreionul)
- identificarea serologica
(infectii cu virusuri hemaglutinante
- gripale, paragripale)

Serological identification (haemagglutinating virus infections - influenza, parainfluenza)

