



REAȚIA DE SERONEUTRALIZARE



Reacția de neutralizare face parte din
reacțiile serologice de inhibare a unor

- **caracteristici biologice** și
- **caracteristici biochimice**

ale **Atg** :

- acțiune toxică,
- acțiune infectantă,
- acțiune litică

- Atg dotate cu activitate biologică (*toxine, enzime, hormoni*) induc formarea de Atc neutralizanți care au capacitatea de a le bloca activitatea.

- Reacțiile de neutralizare pot fi realizate *in vivo* sau *in vitro*.

➤ REACȚII DE NEUTRALIZARE "IN VIVO

- Aceste teste necesită probe in vivo pe animale de experiență sau pe om.
- **IDENTIFICAREA TOXINEI DIFTERICE** prin efectul produs la animale de experiență.
- **IDENTIFICAREA TIPULUI DE TOXINĂ BOTULINICĂ** dintr-un material infecțios (toxidotipia prin testul seroprotecției).

➤ REACȚII DE NEUTRALIZARE "IN VITRO

- Sunt utilizate în **diagnosticul serologic** al unor
 - **bacterioze**
 - **viroze.**

❖ **INTRADERMOREACȚIA SCHICK** - *Apreciază gradul de imunizare a populației în urma vaccinării antidifterice;*

- Pentru evidențierea Atc anti-toxină difterică la subiectul testat se injectează *intradermic* o cantitate redusă (0,1 ml) de toxină difterică purificată;
- Dacă la locul inoculării nu se constată **efectul dermonecrotic**, subiectul este imunizat = **reacție negativă** ;
- În lipsa Atc specifici neutralizanți, efectul acțiunii toxinei este prezent (**eritem și edem de cel puțin 10 mm diametru**) = **reacție pozitivă**.
- **MARTORUL** - Pentru a elimina pseudoreacțiile, se injectează intradermic pe celălalt braț o cantitate de toxină echivalentă dar inactivată - în acest caz nu trebuie să apară reacția cutanată.

❖ **INTRADERMOREACȚIA DICK** - *testează susceptibilitatea la scarlatină și se efectuează și interpretează similar cu testul Schick ;*

- Prin această reacție se urmărește prezența Atc antitoxici induși în organism de toxina eritrogenă.
- Se injectează intradermic cantitatea minimă de toxină eritrogenă care produce un eritem cu diametrul de 10 mm → persoane receptive la scarlatină reacție pozitivă, iar la cele imune la scarlatină reacție negativă
- lipsa eritemului în zona inoculată (*imunitate antitoxică prezentă*).

INTRADERMOREACȚII

- INTRADERMOREACȚIA SCHICK - INTRADERMOREACȚIA DICK

- Teste utilizate în investigarea răspunsului imun umoral
- Utilizate pentru testarea hipersensibilității de tip imediat
- Efectul dermonecrotic se manifestă imediat în câteva minute

- INTRADERMOREACȚIA DE TIP TUBERCULINIC (IDR LA PPD)

- Test utilizat în investigarea răspunsului imun mediat celular
- Utilizată pentru testarea hipersensibilității de tip întârziat
- Efectul dermonecrotic se manifestă și atinge amplitudinea maximă după 24-72 ore

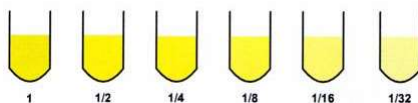
DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL INFECȚIILOR STREPTOCOCICE

(determinarea titrului antistreptolizinelor O) - reacția ASLO

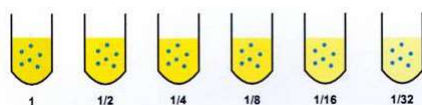
- Reacția ASLO decurge în două etape :
 - punerea în contact a *diluțiilor din serul de testat* (în care căutăm Atc anti-SLO) cu o cantitate standard de streptolizină O (Atg)
 - INCUBARE
 - repartizarea unei *suspensii de hematii* de iepure ca mijloc revelator.
- **PRINCIPIUL** care stă la baza reacției ASLO este următorul :
 - În tuburile în care diluțiile de ser conțin o cantitate suficientă de antistreptolizine O (Atc) efectul litic al Atg (streptolizină O) va fi inhibat → ceea ce se traduce prin lipsa de hemoliză;
 - În diluțiile de ser în care Atc sunt insuficienți (sau absenți) pentru a neutraliza streptolizină O, efectul litic al acesteia se observă prin prezența hemolizei.

TEHNICA DE LUCRU

- serul de cercetat se tratează cu rivanol pt îndepărtarea inhibitorilor nespecfici;
- urmează o inactivare a serului timp de 30 min la 56°C;
- se efectuează diluții succesive din serul de testat (1/100, 1/250, 1/500, 1/625, 1/833, 1/1250) în soluție cloruro-sodică izotonă;

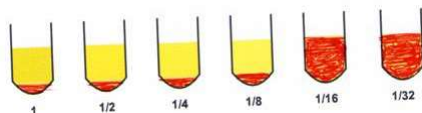


- se adaugă Atg (streptolizină O) în cantitate de 0,5 ml;

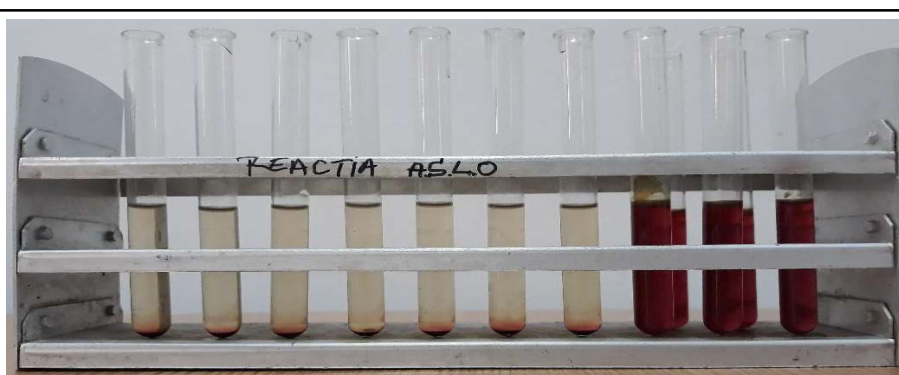


Incubare

- se repartizează în fiecare eprubetă câte 0,5 ml dintr-o suspensie de hematii de iepure 5%;



Incubare



DIAGNOSTICUL IMUNOLOGIC AL INFECTIEI STREPTOCOCCICE PRIN REACTIA ASLO

	1/100						1/250						1/500					
Ser de testat (ml)	0.5	0.2	1	0.5	0.5	0.4	0.3	1	0.5	0.4	0.3	0.2	1	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Ser fiziologic (ml)	0.2	0.8		0.2	0.6	0.6	0.7		0.2	0.4	0.6	0.7		0.2	0.4	0.6	0.7	0.8
Antigen streptococic (A.C.I. ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubare 15 minute 37 °C																		
Hematii iepure 5% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubare 45 minute 37 °C																		
Unitati ASLO	12	50	100	320	160	250	333	500	625	833	1250	2500						

Negative reaction (hemolysis)

Positive reaction (no hemolysis)

CITIREA REACTIEI

Se face în doi timpi :

- primă citire după scoaterea tuburilor de la termostat
- a doua, definitivă, după o noapte de păstrare la +4° C.

- Reacția negativă este indicată de prezența hemolizei.

- **Titrul Atc anti-streptolizina O (ASLO)** este dat de *ultimul tub în care lipsește complet hemoliza*.

* *Titrurile normale de ASLO = 160 - 200 unități/ml ser.*

* *Titrurile crescute, peste aceste limite :*

- infecție recentă streptococică sau
- instalarea unor complicații post-streptococice
 - reumatismale
 - renale
 - endocardice.

* *Titrurile înalte de Atc ASLO după o infecție streptococică se mențin crescute timp de câteva luni.*

REAȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

- Complementul este o componentă normală a serului (complex de factori globulinici), care nu se combină cu Atg izolat.
- Complementul este parte a mecanismelor de apărare înăscută, cu rol în inflamație și fagocitoză.
- Complementul are o afinitate scăzută pentru Atc și se leagă numai de complexe Atg-Atc
 - După ce se fixează de aceste complexe, *complementul este activat* → și își exercită mai multe proprietăți biologice, având chiar o reacție agresivă față de structurile pe care se fixează (*liza eritrocitelor* din sistemul hemolitic; liza bacteriilor, virusurilor)
- Complementul prezintă mai multe subfracțiuni : C1(q,r,s), C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, factorul B, factorul P- prezente în mod normal în fluidele corpului nostru în formă inactivă și activate de acțiunea agenților infecțioși.

REACTIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI (RFC)

PRINCIPIU - RFC folosește două sisteme Atg-Atc care pot activa / consuma o concentrație standard de complement.

- **Primul sistem** - reprezentat de **Atc din serul de bolnav** și de un **Atg corespunzător**;
- **Al doilea sistem** - **sistem cu rol indicator (sistemul hemolitic)**
 - face vizibil rezultatul reacției din primul sistem
 - constituit din **hematii de oaie (Atg)** în asociere cu un ser hemolitic (**Atc**) (ser obținut prin imunizarea iepurilor cu hematii de oaie).
- ✓ Dacă serul de bolnav conține Atc față de Atg std, **C** se leagă de acest complex Atg-Atc → nu mai există **C** liber în reacție, care să poată fi fixat de sistemul hemolitic → **hematiile de oaie vor sedimenta**, constatându-se **absența hemolizei**.
- ✓ Dacă serul de cercetat nu conține Atc specifici Atg folosit în reacție → nu se formează complexe Atg-Atc, **C** rămâne liber și se fixează pe sistemul indicator producând **liza hematiilor de oaie**.

ELEMENTELE REACTIEI

▪ **Serul de testat – 2 seruri (serul I -la debut, serul II -în convalescență)** inactivate prin încălzire 30 min la 56°C, pentru distrugerea **C**;

*** În mod normal avem în serul nostru niveluri diferite ale fracțiunilor C*

- Pentru a înlătura efectele produse de prezența **fracțiunilor proteice ale C**, **C** din serul pacientului trebuie distrus și introdusă în reacție o cantitate cunoscută din complementul standard;

- Serul este inactivat prin încălzire - prin încălzire distrugem **C** dar nu și **Atc**, deoarece **fracțiunilor proteice ale C** sunt mult mai susceptibile pentru a fi distruse prin încălzire.

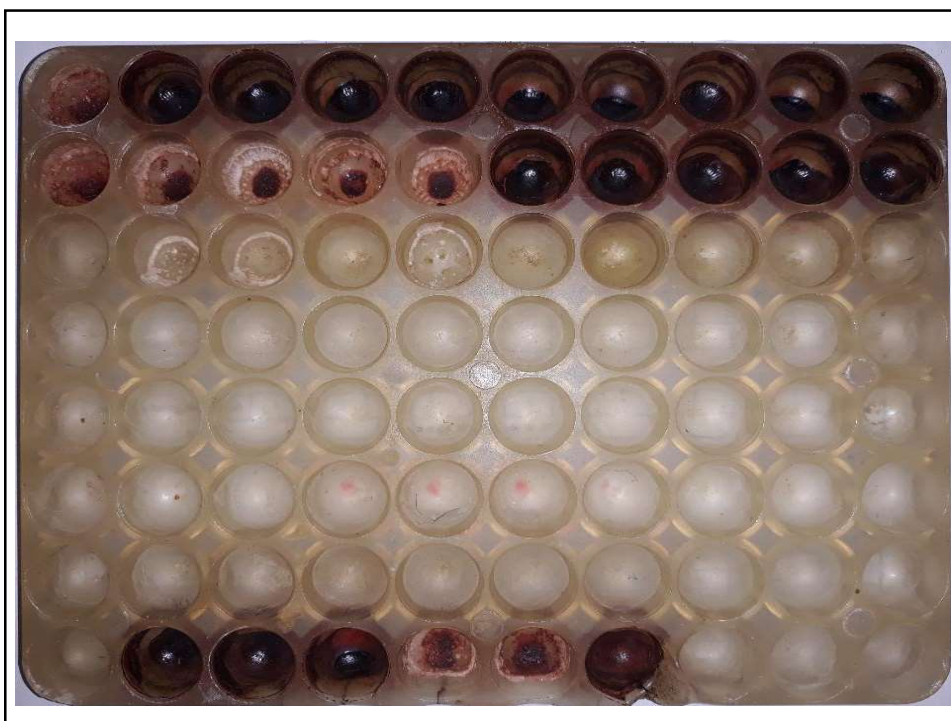
▪ **Atg standard** - diferă în funcție de natura Atc bănuți în serul de cercetat;

- Atg sunt titrate pentru stabilirea puterii lor anticomplementare;

▪ **Complementul (alexina)** – ser proaspăt de cobai sau liofilizat;

- în momentul utilizării este **titrat față de sistemul hemolitic** - pentru a stabili cantitatea minimă de alexină care să fie introdusă în reacție în vederea fixării de către unul din cele două sisteme Atg-Atc.

▪ **Sistemul hemolitic** - compus din **eritrocite de oaie (berbec)** (obținute după spălarea de 3 ori a E în tampon veronal) și din **Atc anti-eritrocite berbec**, obținuți prin imunizarea iepurilor cu eritrocite de berbec și apoi inactivați la cald.

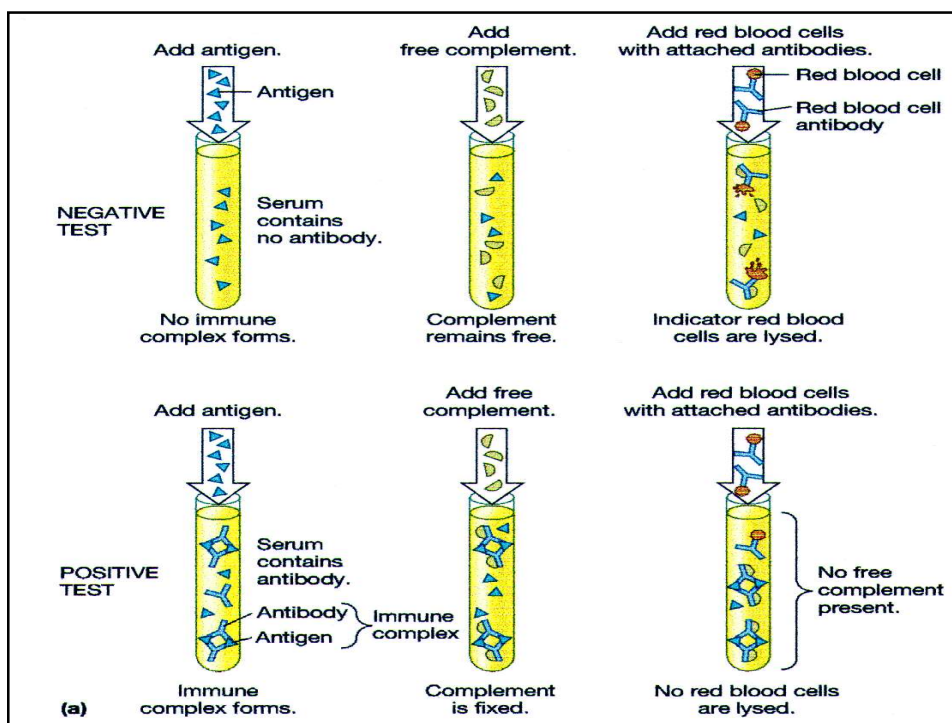


REAȚIA WASSERMAN (RFC CALITATIVĂ)

Nr. tub	Martori ser cercetat			Martor antigen	Martor alexină	Martor sistem hemolitic	Martor ser pozitiv	Martor ser negativ
	1	2	3					
Ser de testat inactivat 30 minute la 56 °C (ml)	0,1	0,2	0,3	-	-	-	-	-
Ser sigur pozitiv (ml)	-	-	-	-	-	-	0,2	-
Ser sigur negativ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0,2
Antigen cardiolipinic (ml)	0,2	0,2	-	0,4	-	-	0,2	0,2
Alexină 2 u H (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,2
Diluent (ml)	1	0,7	0,7	0,9	1,3	1,5	0,9	0,9
Incubare la 37 °C timp de 45 minute								
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Citire după 30 minute la 37 °C								

TITRAREA ALEXINEI

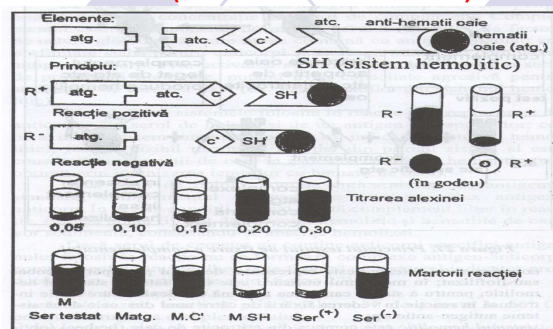
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Martor sistem hemolitic
Alexină diluată 1/10 (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	-
Ser fiziologic (ml)	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,05	- 1,5
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Incubare 30 minute la 37 °C, citire										



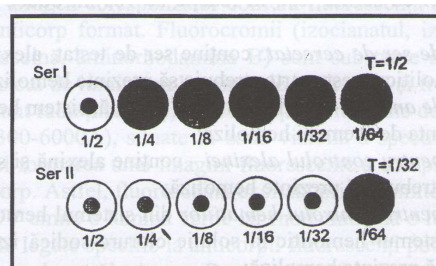
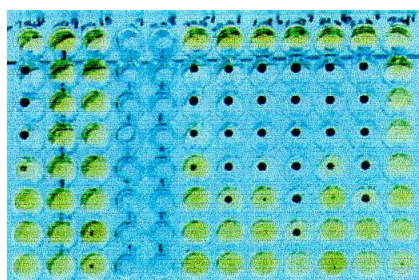
Reacția de fixare a complementului poate fi

- **Calitativă** - de exemplu *reacția Wasserman* utilizată pentru diagnosticul sifilisului
- **Cantitativă** - *reacția Ida Bengston*, folosită pentru aprecierea dinamicii Atc într-o serie de afecțiuni bacteriene sau virale.

RFC calitativa (Tehnica WASSERMAN)



RFC cantitativa (Tehnica IDA-BENGSTON)



MARTORII

În paralel cu seriile test, în reacție se vor introduce următorii martori:

- **Martor de ser de cercetat**
 - conține ser de testat + Alexină (A) + SH = **hemoliză prezentă**;
- **Martor de Atg**
 - conține Atg + A + SH = **hemoliză prezentă**;
- **Martor ptr controlul alexinei**
 - conține A + SH = **hemoliză prezentă**;
- **Martor ptr controlul hematiilor** din sistemul hemolitic
 - include SH și soluție cloruro-sodică izotonă = **hemoliză absentă**;
- **Martor de ser sigur pozitiv**
 - include ser sigur pozitiv și toți ceilalți reactanți (Atg + A + SH) = **hemoliză absentă**;
- **Martor de ser sigur negativ**
 - conține ser sigur negativ și toți ceilalți reactanți (Atg + A + SH) = **hemoliză prezentă**.

INTERPRETAREA REZULTATELOR

Metoda calitativa

- Hemoliza totala → rezultat negativ
- Hemoliza incompleta → rezultat dubios
- Lipsa hemoliza → rezultat de la slab pozitiv (+) la intens pozitiv (++++);
- Hemoliza partiala (50% hemoliza) sediment globular cu lichid supernatant rosu = RFC pozitiva (++)
- Hemoliza absenta in totalitate, sediment compact de hematii, lichid supernatant incolor = RFC intens pozitiva (++++)

Metoda cantitativa

Titrul fixator al serului de cercetat este indicat de ultima dilutie care determina o RFC pozitiva ++ (hemoliza 50%).

****** Rezultatul este semnificativ daca intre serul I si II exista o crestere in dinamica a titrului de Atc fixatori de complement cu cel putin 4 trepte binare ale dilutiei.

TEHNICI SEROLOGICE CU UTILIZAREA ATC MARCAȚI

- ❖ În unele cazuri este imposibil de a detecta o reacție Atg-Atc:
 - unii Atc nu precipită,
 - alți Atc nici nu precipită, nici nu aglutinează,
 - există complexe Atg-Atc care nu fixează C.
- ❖ În aceste cazuri pot fi utilizați Atc marcați pentru a vizualiza Atg respectiv.
- ❖ Conjugarea Atc cu marcați nu afectează proprietățile lor imunologice.
- ❖ **Marcanții utilizați uzual**
 - **Fluorocromi** (rodamina, fluoresceina), care emit respectiv o lumină roșu-oranj sau verde-galbenă la tratarea lor cu raze UV (**Reacția de Imuno-Fluorescență**)
 - **Enzime** (fosfataza alcalină, peroxidaza), capabile să modifice culoarea unui substrat (**Reacția Imuno-enzimatică**)
 - **Radio-izotopi** (^{125}J sau ^3H), care emit respectiv raze gamma și beta (Analiza Radio-Imună)

REAȚIA DE IMUNOFLOURESCENȚĂ

PRINCIPIUL REACȚIEI - Tehnica imunofluorescenței se bazează pe proprietatea fluorocromilor de a se fixa pe **Ig** (Atc) fără a le modifica proprietățile biologice.

➤ Acești Atc conjugați (marcați fluorescent), vor deveni trasori sensibili pentru Atg tisulare și în urma legării lor de un Atg corespunzător conferă fluorescență complexului Atg-Atc format.

➤ **Fluorocromii (izocianatul, izotiocianatul de fluoresceină, aminorhodamina B)** sunt substanțe care iradiate de un fascicul de lumină cu lungime de undă mică și frecvență mare (cum sunt radiațiile UV), emit radiații cu lungime de undă superioară (5300-6000Å), situate în zona vizibilă a spectrului, permițând astfel formarea unei imagini fluorescente a complexului Atg-Atc.

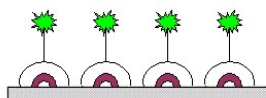
➤ Astfel, **fluoresceina** excitată prin anumite lungimi de undă în UV emite o lumină **verde** iar **rhodamina** dă o lumină **roșie**.

➤ Atg legate specific la Atc fluorescenți pot fi detectate prin culoarea lor strălucitoare. De obicei se folosesc Atc care sunt marcați la nivelul fragm Fc.

➤ Relevarea fluorocromilor fixați în cadrul reacției Atg-Atc necesită folosirea unui **microscop** echipat pentru fluorescență cu o sursă de UV și cu filtre de excitație.

VARIANTA DIRECTĂ

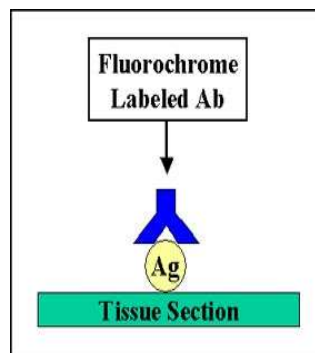
- Varianta directă a tehnicii de imunofluorescență se aplică mai frecvent pentru **identificarea Atg**.
- **PRINCIPIU** - Se folosește un **ser standard imun** marcat cu o substanță fluorescentă; Atc din acest ser, fluorescenți și specifici Atg, vor reacționa cu Atg de identificat (**Atg din culturi, frotiuri, țesuturi animale sau umane**) formând complexe fluorescente ce pot fi observate în lumina ultravioletă.



antigen din preparatul montat pe lamă (preparat histologic sau suspensie de pe culturi de celule infectate)

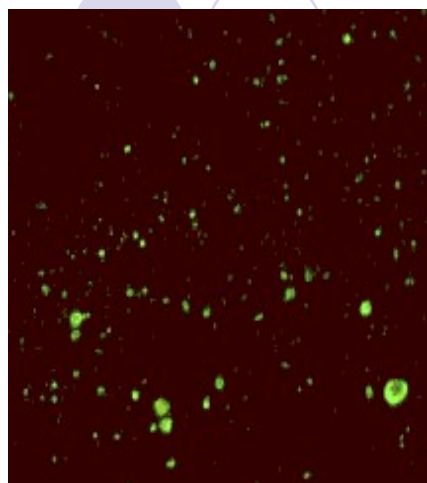


anticorp marcat cu fluorocrom



VARIANTA DIRECTĂ

- **Avantajele** acestei metode constau în
 - rapiditatea tehnicii
 - permite evidențierea prezenței Atg microbiene după inactivarea lor prin tratamentul cu antibiotice.
- **Dezavantajele** variantei se referă la necesitatea preparării unui număr mare de seruri imune specifice fluorocromate, diferite pentru fiecare antigen.



• Positive test for rabies



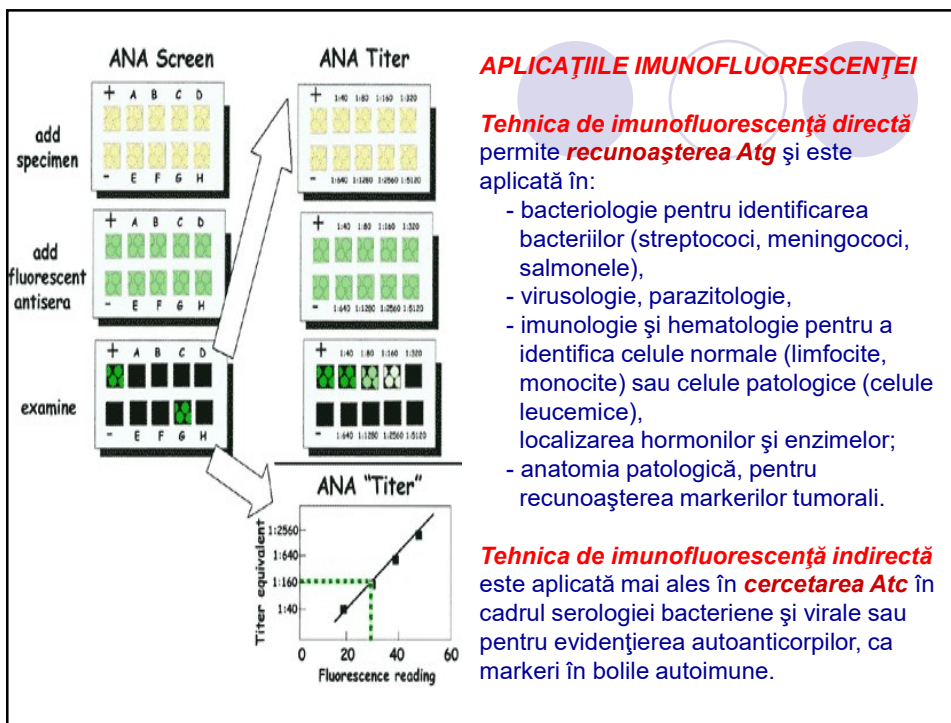
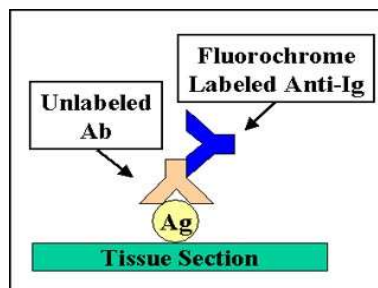
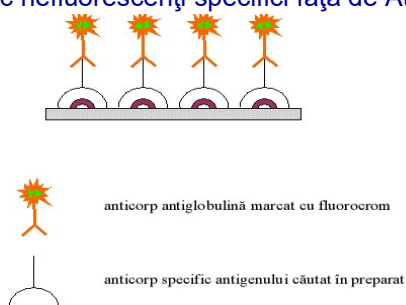
• Negative test for rabies

VARIANTA INDIRECTĂ

Utilă pentru **identificarea Atg** cât și pentru **evidențierea Atc**.

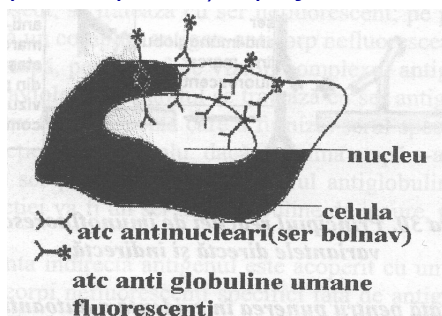
PRINCIPIU - Varianta indirectă se desfășoară în două etape :

- **Prima etapă** - preparatul fixat, conținând Atg cunoscut/ necunoscut, se tratează cu ser nefluorescent → incubare → complex Atg-Atc nefluorescent.
- **Etapa a doua** - pentru a face vizibil complexul Atg-Atc în lumina UV, preparatul se tratează cu **ser antiglobulinic fluorescent**, activ față de specia care a furnizat serul specific din primul timp al reacției.
- În varianta indirectă Atg este acoperit cu un strat dublu de Atc:
 - Atc nefluorescenti specifici față de Atg și Atc fluorescenți anti-γ globuline.



TEHNICA UTILIZATĂ PENTRU PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A AUTOANTICORPILOR ANTINUCLEARI (AAN)

- Pentru cercetarea Atc anti-nucleari dintr-un ser uman sunt utilizate ca substrat *cupe de țesuturi (amprente de ficat de șobolan)* care sunt incubate cu serul pacientului suspectat de o boală autoimună.
- Toate proteinele umane care nu se vor fixa pe parcursul incubării prin reacția Atg-Atc vor fi îndepărtate prin spălare iar autoanticorpii anti-nucleari fixați pe nucleu vor fi relevați prin xenoanticorpi anti-Ig umane (cal, iepure, capră etc) cuplați cu substanțe fluorescente.



TEHNICA DE LUCRU

Se parcurg următorii timpi:

- obținerea **lamelor cu amprente de ficat de șobolan**
 - se secționează fragmente dintr-un ficat de șobolan și suprafața proaspăt tăiată se aplică pe lame de microscop bine degresate;
 - se usucă lamele la aer;
- pe fiecare din amprente obținute se pipetează câte o picătură din :
 - **serul de testat** (din care se fac diluții succesive)
 - **serul martor negativ** (ser testat anterior și declarat negativ pentru Atc antinucleari)
 - **serul martor pozitiv**
 - se indică pentru fiecare ser să se folosească două amprente;
- lamele se așează pe un suport de sticlă, într-o cutie Petri și se lasă la t camerei 20 de min;
- se spală preparatele cu o soluție cloruro-sodică izotonă ;
- se acoperă fiecare amprentă cu câte o picătură din **serul fluorescent anti-gamaglobuline umane** → incubare la t camerei, 20 min
- urmează o nouă spălare cu soluție cloruro-sodică izotonă.

CITIREA REZULTATELOR

Citirea rezultatelor se face cu ajutorul unui microscop prevăzut cu lampă HBO 200 și cu filtrele necesare (caloric, de excitație, de baraj).

- * Rezultatul “+” - indicat de următoarea imagine: pe un fond ușor **verzui** apar nucleii fluorescenți ai celulelor hepatice;
- * Rezultat “-” - se remarcă zone mici, întunecoase care corespund nucleilor necolorați.
- * Se exprimă titrul autoanticorpilor prin diluția cea mai înaltă a serului de bolnav care a mai produs fluorescență.

Fluorescența poate fi de mai multe **tipuri**:

- omogenă,
- inelară,
- pătată,
- nucleolară etc.

Tipul de imunofluorescență omogen, difuz este dat de prezența Atc anti-dezoxiribonucleoproteine (DNP). Nucleul este uniform omogen colorat. Acești Atc sunt responsabili de formarea celulelor Harves (care au constituit prima anomalie imună semnalată în LES) și sunt corelați cu forma activă de boală,

Tipul de imunofluorescență inelar sau periferic este expresia prezenței Atc anti-ADN nativ și Atc anti-DNP solubile. Imaginea este caracteristică **forme acute de boală lupică**.

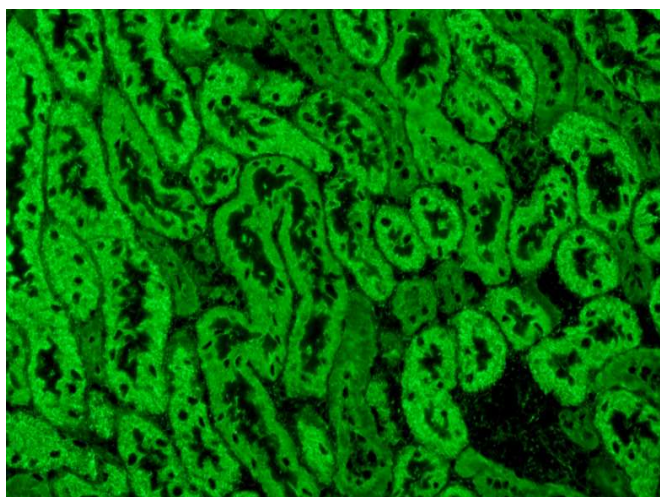
Tipul de imunofluorescență nucleolară este determinat de colorarea omogenă a nucleolului; el este indus de prezența Atc anti-ribonucleoproteină (RNP).

- Prezența acestei colorații este semnalată mai frecvent în **sclerodermie, dermatomiozită**.

ANA Patterns			
Peripheral (rim)		Anti-DNA (not seen on HEP-2)	SLE
Homogeneous (diffuse)		Anti-DNA Anti-histone Anti-DNP (nucleosomes)	RA & SLE Misc. Disorders (anti-ssDNA)
Speckled		Anti-Sm & RNP Anti-Ro & La Anti-Jo-1 & Mi-2 Anti-Scl-70	SLE & SS PM/DM PSS (Systemic)
Centromere		Anti-centromere	PSS (CREST)
Nucleolar		Anti-nucleolar	SLE & PSS

Aspect nuclear omogen	Aspect patat fin	Aspect patat grosier	Aspect de tip centromer
Aspect nucleolar omogen	Aspect nucleolar patat (Scl-70)	Aspect de puncte nucleare	Aspect membrana nucleara

Antimitochondrials autoantibodies (AMA) - la nivelul celulelor renale



Anti- parietal cells autoantibodies



Anti-lysis muscle autoantibodies

