

TESTE DE IMUNITATE CELULARĂ

REAȚIA LA TUBERCULINĂ-TESTUL PPD-TESTUL MANTOUX

- Test folosit pentru a determina dacă persoana a dezvoltat un răspuns imun la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MT) ce determină TBC
- Acest răspuns poate să apară :
 1. Dacă persoana are în prezent TBC
 2. Dacă a fost expusă la acest germen în trecut
 3. Dacă a primit vaccinul BCG împotriva TBC.
- Testul cutanat la tuberculină se bazează pe faptul că în infecția cu MT se produce un tip de **reație cutanată de hipersensibilitate** la anumite componente bacteriene – componentele bacteriei sunt conținute în extractele de culturi filtrate și sunt elementele de bază ale tuberculinei PPD (*purified protein derivated = derivate proteice purificate*)



TEHNICA TESTULUI

- Se injectează intradermic 0,1 mL 5 UT (unități de tuberculină) PPD la nivelul antebrăului
- Citirea se face la 48-72 ore
- Baza de citire a testului cutanat este prezența sau absența și mărimea indurației (umflătura localizată) în și în jurul locului de injectare
- **Test pozitiv** – dacă zona **INDURAȚIEI** depășește diametrul de **15 mm**, iar la persoanele imunocompromise diametrul semnificativ este peste **5 mm**
- **Test negativ** – nu înseamnă întotdeauna că persoana nu are TBC

MECANISMUL IMUN

- celulele T, celule imunitare specializate, care au fost sensibilizate printr-o infecție anterioară, sunt activate și se deplasează la locul infecției unde eliberează citokine determinând :
 - **O indurație (zonă tare)** în și în jurul locului de injectare prin vasodilatație locală
 - Acumularea de lichid (edem), fibrină și de alte tipuri de celule inflamatorii.

TESTAREA FUNCTIONALA A LIMFOCITELOR T

- testul de transformare blastica limfocitara
- testul de inhibare a migrarii macrofagelor
- testul citotoxicitatii immune

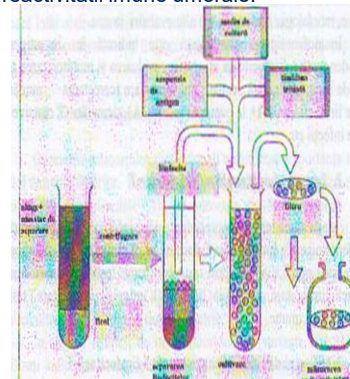
TESTUL DE TRANSFORMARE BLASTICA LIMFOCITARA T

Testul de transformare blastica limfocitara este utilizat pentru aprecierea raspunsului imun celular si se bazeaza pe acelasi principiu care sta la baza evaluarii reactivitatii imune umorale.

PRINCIPIUL TEHNICII

= Cultivarea in vitro a unei suspensii de limfocite, recoltate de la bolnavul testat, in prezenta Atg presupus a fi sensibilizant este urmata de cresterea numarului de blasti.

- **Limfocitele T sensibilizate** au capacitatea de a elibera in vitro **factori mitogeni** care induc activarea altor limfocite cu declansarea proliferarii lor celulare cu aparitia de limfoblasti



- Testul de transformare blastica limfocitara se realizeaza prin :
- * stimularea policlonala a Ly, pe de o parte cu mitogeni nespecifici si
- * pe de alta parte prin rapel cu antigenul incriminat in declansarea raspunsului imun constatat la pacientul investigat

TEHNICA DE LUCRU

- Se obtine mai intai un **concentrat leucocitar** din sange prelevat de la pacient, cu ajutorul unui mediu de separare (sepcel, ficoll) ;
- Concentratul leucocitar este cultivat in prezenta antigenului sensibilizant timp de 2-3 zile la 37°C
- In paralel se face un MARTOR din Ly bolnavului stimulate cu mitogeni (fitohemaglutinina, concavalina A), in vederea controlarii capacitatii de raspuns a celulelor
- Probele vor fi controlate zilnic privind starea viabila a culturii de Ly

INTERPRETAREA REZULTATELOR

- Se face prin 2 metode
- * **metoda citologica** - pe preparate microscopice colorate Giemsa se apreciaza procentual limfoblastii
- raspuns imun umoral normal = 10-20% la 3-4 zile dupa stimularea cu Atg sensibilizant testat
- Martorul = 90-95% dupa 2 zile de stimulare cu un mitogen nespecific
- * **metoda radiometrica**

TESTUL DE INHIBITIE A MIGRARII MACROFAGELOR

PRINCIPIUL TEHNICII - Macrofagele mentinute in conditii corespunzatoare *in vitro* parasesc locul in care se afla si migreaza in diferite directii .

Anumite **limfokine** eliberate de limfocitele care au reactionat specific cu un anumit Atg, inhiba migrarea acestor celule.

Evidentierea **limfokinei** denumita **factorul de inhibitie a migrarii macrofagelor = MIF** se realizeaza *in vitro* prin testul inhibitiei migrarii macrofagelor care se bazeaza pe :

- memoria imunologica a celulelor T de a recunoaste in cultura Atg cu care a venit in contact inaintea investigarii
- capacitatea lor de a elibera factorul solubil cu rol in impiedicarea migrarii macrofagelor.

Acest test releva prezenta limfocitelor T sensibilizate fata de un anumit Atg sau poate identifica Atg sensibilizant, care a determinat instalarea raspunsului imun celular.

TEHNICA DE LUCRU

se obtine mai intai un **concentrat leucocitar** din sange prelevat de la pacient, cu ajutorul unui mediu de separare (sepcel, ficoll) ;

celulele separate sunt spalate, suspensionate in mediu de cultura si introduse in *tuburi capilare* de 1 mm diametru, care sunt inchise la o extremitate cu plastilina ;

urmeaza *centrifugarea tuburilor si sectionarea lor la nivelul interfetei sediment celular-supernatant* (mediu de cultura in care au fost suspensionate celulele) ;

tuburile cu sedimentul celular vor fi introduse in **camere de migrare** si *fixate orizontal* de marginea cutiei cu portiunile inchise, iar cu partile libere orientate spre centrul ei ;

se pipeteaza in camera **mediu de cultura suplimentat cu ser fetal de vitel** (5-10%)

dupa o **incubare** de 16-24 ore la 37° C macrofagele vor migra prin extremitatea libera a tubusorului formand o coroana in jurul orificiului - acest tubusor care prezinta migrarea normala a macrofagelor in absenta Atg este considerat **tubul martor** ;

Pentru interpretarea rezultatelor acestui test se calculeaza un indice de inhibitie a migrarii macrofagelor dupa formula:

$$\text{I.I.M.M.} = \frac{\text{suprafata coroanei de macrofage la proba}}{\text{suprafata coroanei de macrofage la martor}} \times 100$$

Reactia este considerata pozitiva cand valoarea I.I.M.M. < 70.

APLICATII

In bolile infectioase virale si bacteriene

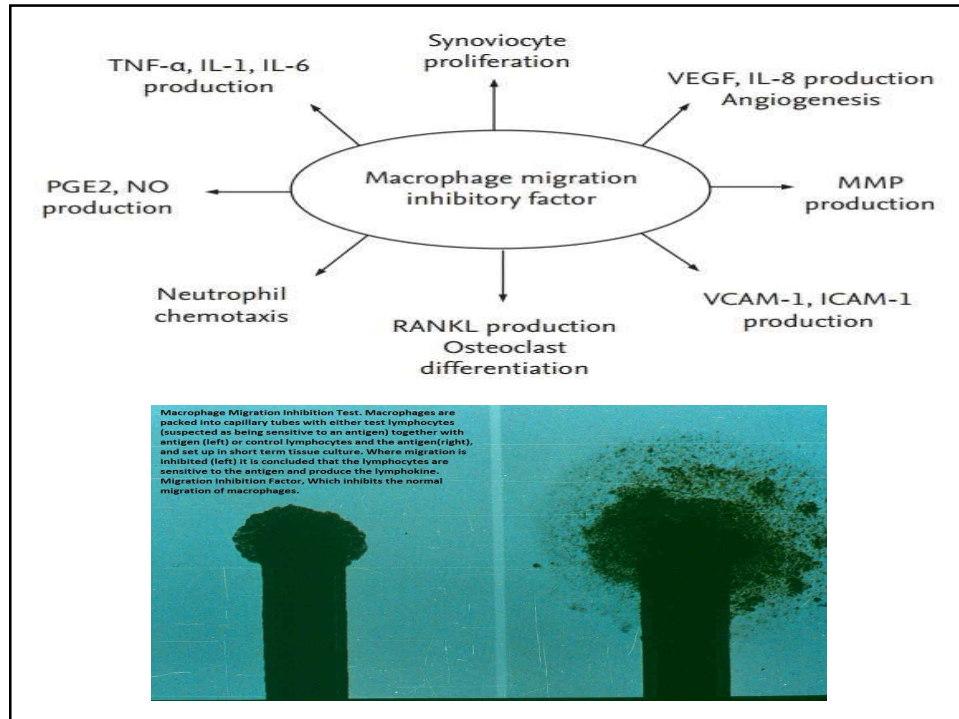
In parazitoze

In anumite condidoze cutaneo-mucoase generalizate

In cadrul unui transplant de organe

In patologia autoimuna

La bolnavii suferinzi de infectii de focar la care titrul ASLO este valoric normal sau crescut nesemnificativ.



TESTUL CITOTOXICITATII IMUNE (DETERMINAREA FUNCTIEI EFECTORII A CELULELOR T CITOTOXICE- TCD8+)

PRINCIPIUL TEHNICII - Limfocitele subiectului investigat, puse in contact *in vitro* cu acelasi Atg care le-a sensibilizat *in vivo*, elaboreaza factorul solubil numit **limfotoxina (TNF β)**, care determina pe culturi celulare efecte de citotoxicitate .

TEHNICA

Consta in punerea in contact a **limfocitelor sensibilizate**, recoltate de la pacient, cu **Atg corespunzator** (reprezentat de celule-tinta cum sunt *celulele tumorale, celulele unei alte specii sau allotip decat cele ale donatorului*).

In situatia in care exista un raspuns imun celular indreptat fata de celulele-tinta, in monostratul celular apar modificari citotoxice sau chiar plaje, cauzate de actiunea limfotoxinei eliberate de limfocitele sensibilizate, dovedind reactia imuna mediata celular.

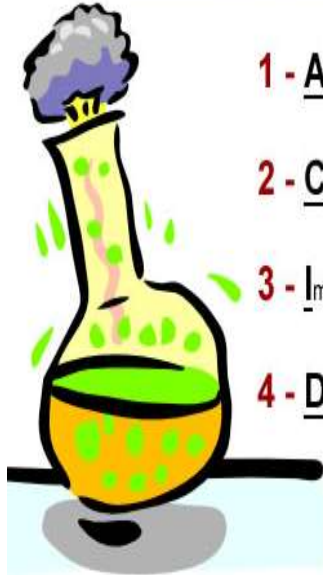
Aprecierea citotoxicitatii se face prin teste de viabilitate celulara sau prin masurarea eliberarii de izotop radioactiv.

In varianta cea mai utilizata, celulele din culturi (celulele-tinta) sunt in prealabil marcate cu **crom radioactiv (^{51}Cr)**.

Cand limfocitele subiectului testat au un *efect citotoxic*, prin *factorul limfotoxic eliberat*, are loc **liza celulara** cu eliberarea in mediul culturii celulare a cromului radioactiv ;

Intensitatea radioactivitatii va masura **gradul de citotoxicitate**.

HYPERSENSITIVITY TYPE AND TEST



1 - Anaphylacti & Atopic | Assay radioimmunoabsorbent, scratch test

2 - Cy-2-toxic | Coomb's (direct and indirect)

3 - Immune complex | Immunofluorescent staining

4 - Delayed | ppD

"ACID"