

10

METODA IMUNOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC

Reacțiile anticorpilor sau limfocitelor specific sensibilizate cu agenții infecțioși asigură imunitatea fie în mod direct (e. g. prin neutralizarea toxinelor, a adezinelor, a virusurilor), fie prin amorsarea specifică a importanșilor efectori antiinfecțioși ai mediului intern: fagocitele cu întregul lor arsenal microbicid (dependent sau independent de mieloperoxidază) și complementul.

În acest capitol vom vedea pe rând noțiuni privind:

- explorarea capacităților funcționale ale efectorilor antiinfecțioși nespecifici ai mediului intern și epitelilor secretorii: fagocite, complement, lizozim;
- explorarea imunității celulare și umorale atât pentru scopuri diagnostice, cât și pentru aprecierea capacităților imunoreactive ale pacienșilor.

10.1. FACTORII REZISTENŢEI NATURALE A ORGANISMULUI: FAGOCITOZA, COMPLEMENTUL, LIZOZIMUL

10.1.1. Explorarea unor funcții fagocitare

Fagocitoza presupune: chemotaxia, recunoașterea țintei de atac, ingestia, omorârea și digestia microbilor. Principalele sisteme fagocitare ale organismului sunt: sistemul fagocitar mononuclear și leucocitele polimorfonucleare neutrofile (PMN).

■ *Chemotaxia*. Fagocitele receptează semnale chemotactice prin care identifică locul invaziei microbilor spre care se mobilizează prin emitere de pseudopode. Secvența tripeptidică formilmetionilleucocilfenilalanină de la extremitatea N-terminală a proteinelor bacteriene este o chemotaxină activă, dar principalii factori chemotactici sunt complexul C5b67 și anafilatoxinele generate prin activarea complementului (figura 10.2). PMN având o mobilitate mai mare decât monocitele, ajung primele în focarul de infecție.

■ *Recunoașterea țintei de atac*. Atașarea particulelor străine la membrana fagocitelor este indispensabilă pentru ingestie. Unii microbi (ca streptococii viridans) sunt fagocitați direct. Alții însă nu realizează atașarea la membrana fagocitului, deoarece au suprafața hidrofilă și sarcina electronegativă ca și fagocitele, și, pentru a fi fagocitați, trebuie opsonizați. *Opsonizarea* se realizează de factori serici nespecifici (fracțiunea C3b) sau specifici (anticorpilor), care fixați pe suprafața bacteriilor îi reduc hidrofilia și sarcina electronegativă, funcționând și ca liganzi la receptori de membrană ai fagocitelor.

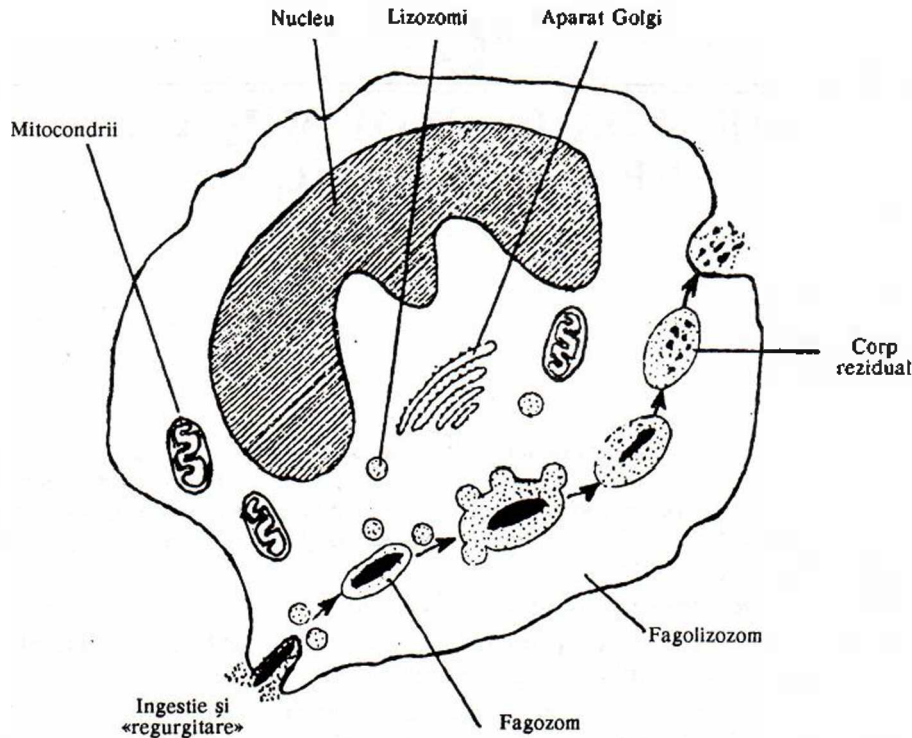


Fig. 10.1. Fagocitarea unui bacil, schematic. Prin fuziunea membranelor conținutul lizozomal este «regurgitat» în cursul ingestiei, iar ulterior se formează fagolizozomul în care bacteria este omorâtă și digerată sau reținută într-un corp rezidual, din care poate fi excretată prin fuziunea cu membrana citoplasmică

■ **Ingestia.** Fuziunea pseudopodelor închide într-un fagozom particula atașată la membrana celulară (figura 10.1). O dată cu progresarea ingestiei, în fagocit ce declanșează *degranularea și o explozie respiratorie*, care pregătesc omorârea și digestia microbilor.

Degranularea: lizozomii fuzionează cu membrana citoplasmică și cu cea a fagozomului și își descarcă conținutul atât în exterior («regurgitare» înainte de închiderea fagozomului), cât și în fagozom. «Regurgitarea» joacă un rol important în mecanismele microbicide din focarul inflamator.

Explozia respiratorie stimulează șuntul hexozomonofosfat și generează în fagozom superoxid, iar prin dismutarea acestuia, peroxid de hidrogen.

■ **Omorârea și digestia.** Factorii lizozomali acumulați în fagolizozom omoară microbii prin două mecanisme: unul dependent de mieloperoxidază, altul independent.

Mieloperoxidaza, activată de pH-ul acid din fagolizozom, descompune H_2O_2 cu formare de oxigen molecular, care generează radicali microbicizi: hipoclorit prin oxidarea clorului și aldehide prin peroxidarea membranelor.

Mecanismul independent de mieloperoxidază, activ în condiții anaerobe, implică: scăderea pH-ului prin acidul lactic rezultat din fermentarea glucozei, fixarea fierului prin lactoferină, efectul bactericid al lizozimului și al polipeptidelor bazice din lizozomii PMN. Microbii omorâți sunt digerați de enzimele lizozomale hidrolitice deversate în fagozom.

Defecte ale funcțiilor PMN pot să apară în diferite boli ereditare sau dobândite. Chemotaxia este deficitară la pacienții cu sindrom Chediak-Higashi, la diabeticii în dezechilibru metabolic etc. Defecte ale activității *-cide* intracelulare sunt prezente la

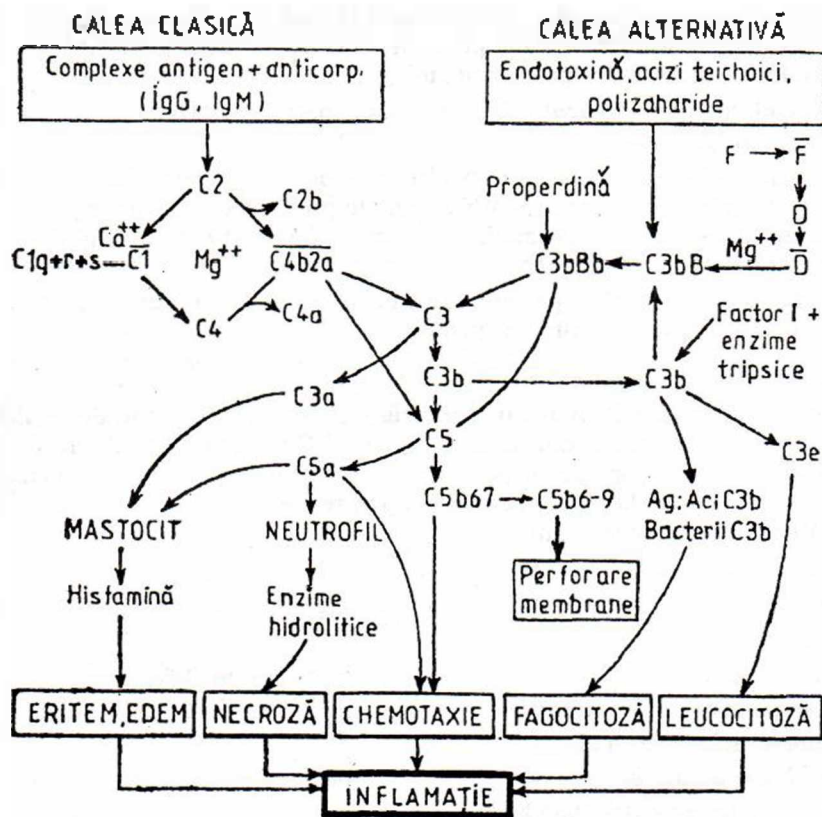


Fig. 10.2. Sistemul complement: căile de activare și efectorii

pacienții cu boală granulomatoasă cronică etc. Toți acești pacienți au o receptivitate crescută la infecții.

Mai multe teste sunt indicate pentru explorarea funcțiilor complexe ale fagocitelor. Ansamblul acestor teste depășește obiectivele acestui manual. Ne vom opri doar asupra celor mai accesibile, al căror rezultat indică sau nu necesitatea unor testări suplimentare (tabelul 10.1).

Tabelul 10.1. Explorarea funcțională a leucocitelor polimorfonucleare neutrofile

<p>Leucograma cu formula leucocitară Morfologia polimorfonuclearelor neutrofile Migrarea nedirecționată (la întâmplare) Migrarea direcționată (chemotaxia) Indicele opsonic Indicele fagocitar și bactericid Activități postfagocitare:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Degranularea ■ Testul cu <i>nitroblue tetrazoliu</i> (NTB) ■ Testarea activității șuntului hexozomonofosfat ■ Testarea producerii radicalului superoxid ■ Iodurarea bacteriilor ■ Chimioluminescența

1. Leucograma cu formula leucocitară și morfologia PMN sunt cele mai simple și importante teste care inițiază studiul anomaliilor funcționale ale PMN (vezi lucrările practice de histologie, morfopatologie și hematologie).

2. Testul cu NTB. *Indicații:* Investigarea capacității PMN de a-și stimula metabolismul oxidativ după fagocitare.

Principiu: Nitroblue tetrazoliu (NTB), un colorant galben, formează complexe cu fibrinogenul din sânge, captate de PMN stimulate prin fagocitarea unor particule (bacterii etc.). Colorantul este redus enzimatic cu formare de formazan insolubil, care apare la microscop ca cristale albastre-purpuriu.

Probă: Sânge integral la pacienții cu număr normal sau crescut de leucocite. Concentrat leucocitar la pacienții cu leucopenie.

Necesar:

a) Sticlute cu Na₂EDTA uscat. În sticlute de 10 ml (flacoane de penicilină foarte bine spălate) se repartizează din soluția 1% Na₂EDTA câte 0,2 ml sau 0,5 ml pentru tehnica cu sânge integral, respectiv pentru cea cu concentrat leucocitar. Sticlutele se lasă, fără dop, peste noapte la 37°C pentru evaporarea apei. Astfel vor conține 2 mg și, corespunzător, 5 mg anticoagulant.

b) Soluția stock 1% de NTB:

NTB	10 mg
Apă distilată	1 ml

Se păstrează mai multe luni la 4°C în tub ermetic închis.

c) Tampon Michaelis cu pH 7,4:

Soluție acetat-veronal	5 ml
HCl soluție 0,1 N	5 ml
NaCl soluție neutră 0,85%	90 ml

Se verifică pH-ul și se păstrează la 4°C

Na acetat	19,428 g
Na veronal	29,428 g
Apă distilată ad	1000 ml

Procedură:

■ *Pentru sângele integral:*

a) Se prelevă prin venipunctură 1—2 ml sânge în flacon cu 2 mg Na₂EDTA. Se agită.

b) Se amestecă într-un tub 100/10 mm cu dop de vată umezit:

Tampon Michaelis cu pH 7,4	0,08 ml
NTB soluție 1%	0,02 ml
Probă de sânge	0,10 ml

c) Se incubează 30 minute la 37°C.

d) Se agită, se întind frotiuri subțiri.

e) Se colorează Giemsa:

— fixare cu alcool metilic pe 5 minute;

— colorare cu soluția Giemsa (1 picătură la 1 ml apă distilată neutră) 20 min.

f) Se examinează la microscop cu imersia 100 PMN consecutive și se înregistrează separat cele NTB-pozitive (cu cristale albastre-purpuriu de formazan) de cele NTB-negative (fără cristale de formazan).

■ *Pentru concentratul leucocitar:*

- a) Se prelevă prin venipunctură 5 ml sânge în flacon cu 5 mg Na₂EDTA. Se agită.
- b) Se toarnă proba într-un tub de 100/10 mm și acesta se menține o oră la 37°C inclinat la 45°.
- c) Se prelevă cu o pipetă Pasteur plasma tulbure și se transvazează într-un tub de 100/10 mm.
- d) Se centrifughează 5 minute la 3000 rpm.
- e) Se decantează absorbind îngrijit resturile de supernatant cu hârtie de filtru.
- f) Se procedează în continuare conform punctelor b)–f) de la procedura pentru sânge integral.

Rezultatul: Se exprimă în procente de polimorfonucleare NTB-pozitive.

Interpretare: În sângele persoanelor normale proporția polimorfonuclearelor NTB-pozitive nu depășește 14%. La pacienții normoreactivi infecțiile bacteriene determină creșteri masive ale procentului de celule NTB-pozitive, iar cele virale nu-l modifică semnificativ.

La copii cu boală granulomatoasă cronică, chiar în plin puseu de infecție bacteriană, polimorfonuclearele NTB-pozitive lipsesc.

3. Indicele opsonic explorează capacitatea opsonică a serului și fagocitară a leucocitelor. Un amestec de sânge citratat și suspensie bacteriană standardizată este menținut într-un tub capilar timp de 15 minute la 37°C. Se fac frotiuri subțiri, se colorează Giemsa, iar bacteriile conținute în 50–100 PMN sunt numărate. Raportul dintre numărul mediu al bacteriilor fagocitate de PMN din sângele bolnavului și al unei persoane normale constituie indicele opsonic, care trebuie interpretat în contextul nivelului complementului și imunoglobulinelor serice (vezi mai jos). Erorile metodei sunt mari. De aceea se preferă determinarea *indicelui fagocitar și bactericid*.

Indicele fagocitar și bactericid. În principiu, în condiții standardizate, se calculează în prezența serului sangvin rata de fagocitare a unei suspensii bacteriene (*S. aureus* sau *E. coli*) și omorârea intracelulară la pacient comparativ cu un martor normal.

Indicele fagocitar este diferența dintre numărul bacteriilor vii adăugate suspensiei de fagocite și numărul bacteriilor vii rămase în momentul *t* de incubare (până la 30 minute). Similar se calculează *indicele bactericid*, luând însă în considerație numărul bacteriilor vii intracelulare în momentul inițial al observației și în momentul *t* de incubare. Pentru aceasta este necesară liza fagocitelor (e. g. cu saponină).

10.1.2. Explorarea sistemului complement

Sistemul complement este un complex de 15 substanțe proteice dotat cu capacități biologice potențiale, declanșate printr-o cascadă de reacții enzimatică, al căror rol în apărarea antiinfecțioasă este ilustrat în figura 10.2.

Liza hematiilor sensibilizate cu anticorpi antihematiilor permite *dozarea activității complementului total*. Imunochimiștii ne pun însă la dispoziție în prezent seruri monospecifice față de componentele complementului prin care le putem doza satisfăcător și mai simplu, folosind testul Mancini.

Deficitul unor componente ale sistemului complement explică receptivitatea deosebită la anumite infecții (e. g. meningococice etc.). Componenta C3 în special scade, prin consum, în boli de sensibilizare prin mecanism de tip III. Multe din componentele complementului (C1s, C2-C6, B) sunt reactivi de fază acută și concentrația lor crește în infecții bacteriene și în boli neoplazice.

Dozarea complementului total prin metoda hemolizei 50% (CH₅₀)

Indicații: Dozările în serul sanguin sunt utile în diagnosticul unor boli prin mecanisme de sensibilizare fie citolitic-citotoxic (unele anemii hemolitice etc.), fie prin complexe imune circulante (glomerulonefrite). Dozarea în exsudatul articular poate diferenția artritele reumatoide de cele infecțioase.

Principiu: Complementul de om activat în reacția cu serul de antihematii de berbec determină, prin complexul de atac C5b6-9, liza hematiilor de berbec. Procentul hemolizei în funcție de creșterea cantității de complement se exprimă printr-o curbă doză—efect care, conform ecuației lui von Krogh, are formă de «S» și, de manieră generală, între 30 și 70% hemoliză evoluează exponențial, încât determinarea punctului 50% este supusă unor erori minime.

Proba: Sângele prelevat prin venipunctură se lasă timp de 30 minute la temperatura camerei în tubul înclinat la cca 20° pentru coagulare. Se desprinde cheagul de pe pereții tubului și se centrifughează pentru separarea serului care se conservă la +4°C, când se lucrează în aceeași zi, sau la -25°C, când testarea se temporizează pentru zilele următoare. Decongelarea tuburilor se va face brusc la curent de apă sau prin agitare în baie de apă la 37°C.

Amănuntele privind prepararea reactivilor necesari și amănuntele tehnice ale procedurii depășesc obiectivele acestui manual.

Necesar, enumerare:

1. Hematii de berbec.
2. Ser hemolitic (ser de iepure imunizat cu hematii de oaie).
3. Complement de cobai (amestec de seruri de la cobai masculi, adulți, normali).
4. Diluent, tampon veronal cu pH 7,3.

Procedura, în rezumat (tabelul 10.2): În tuburi de hemoliză (12/120 mm), peste volume determinate din diluțiile duble ale serului de testat se adaugă volume determinate din *suspensia standardizată a hematiilor de berbec sensibilizate cu o anumită diluție a serului hemolitic*. După omogenizarea conținutului, tuburile sunt incubate timp de 30 minute la 37°C în baie de apă, după care sunt răcite brusc la +4°C, pentru stoparea hemolizei, și centrifugate 3 minute la 3000 rpm. Procentul hemolizei este apreciat spectrofotometric în supernatantul fiecărui tub. Cu valorile obținute se trasează curba procesului hemolitic față de concentrațiile de ser (figura 10.3).

Tabelul 10.2. Dozarea complementului prin metoda hemolizei de 50%, schema de pipetare a reactivilor (vezi și textul)

Diluția inițială a serului	Ser diluat 1:40				Ser diluat 1:10					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Numărul tubului										
Diluent, ml	1,25	1,20	1,10	1,00	1,30	1,25	1,20	1,10	1,00	0,70
Ser de bolnav, ml diluție	0,25	0,30	0,40	0,50	0,20	0,25	0,30	0,40	0,50	0,80
Cuplu hemolitic ¹ , ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

¹ Hematii de berbec sensibilizate cu ser hemolitic antioaie titrat în prezența complementului de cobai

NOTĂ: Complementul de cobai se folosește pentru titrarea serului hemolitic, amănunt tehnic asupra căruia nu insistăm.

Interpretare: Unitatea CH₅₀ este cantitatea cea mai mică de ser care lizează 50% din hematiile sistemului hemolitic. Astfel, titrul complementului în unități CH₅₀/ml este obținut din raportul 1 ml/volum de ser care dă hemoliza 50%. Din figura 10.3 se observă că hemoliza de 50% este dată de 0,020 ml ser hipocomplementemic (curba 3); deci titrul complementului în acest ser este: $1/0,020 = 50$ unități.

Valorile normale pentru adulți sunt 120 unități CH₅₀/ml \pm 20, iar pentru copii 100 unități CH₅₀ \pm 20.

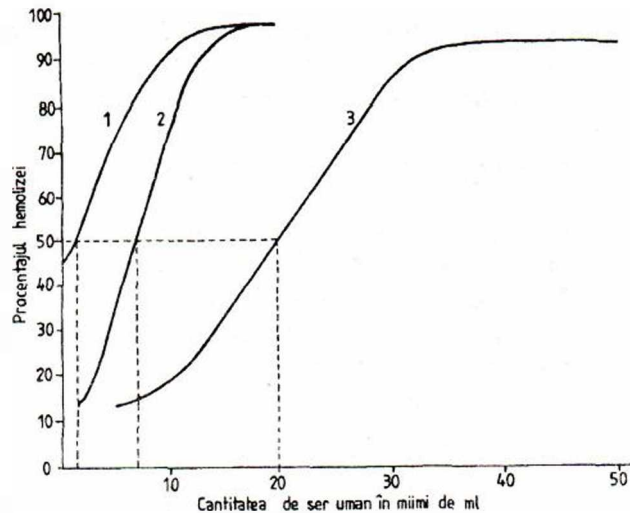


Fig. 10.3. Curba normală și curbe patologice ale complementului, conform titrării activității hemolitice de 50%: 1 — ser hipercomplementemic; 2 — ser normal; 3 — ser hipocomplementemic

10.1.3. Dozarea difuzimetrică a lizozimului în umori

Indicații: Estimarea capacității antibacteriene a urinei, diagnosticul diferențial al leucemiilor acute.

Principiu: Lizozimul difuzează radial într-un gel de agar în care este incorporat *Micrococcus lysodeikticus* (bacterie foarte sensibilă la acțiunea acestei muramidaze) și clarifică mediul opac într-o arie circulară cu diametrul proporțional cu logaritmul concentrației enzimei.

Probă: Ser sangvin sau urină.

Necesar:

1. Tampon fosfat cu pH 6,3.
2. Agar soluție 1%.

Agar	1 g
NaCl	1 g
Tampon fosfat cu pH 6,3	100 ml

Se amestecă, se solvă și se sterilizează prin autoclavare timp de 20 minute la 1 atmosferă.

3. Suspensia stock de *Micrococcus lysodeikticus*:

- a) Se suspensionează în soluție salină izotonă sterilă cultura de 48 ore la 37°C a *M. lysodeikticus* pe pante de geloză nutritivă.
- b) Se controlează microscopic puritatea suspensiei (coci grampozitivi).
- c) Se centrifughează suspensia 10 minute la 3000 rpm și se decantează supernatantul.
- d) Se resuspensionează sedimentul în soluție salină izotonă și se centrifughează în aceleași condiții pentru o nouă spălare.

■ *fizico-chimice*: instabilizarea fazei disperse a reactivilor (creșterea greutatei complexului, neutralizarea sarcinilor polare cu reducerea densității lor): precipitarea și aglutinarea;

■ *biologice*: neutralizarea toxinelor, enzimelor, virusurilor, recrutare de noi molecule (complementul) sau celule (fagocite, mastocite) care favorizează eliminarea antigenului complexat.

Reacțiile antigen-anticorp utilizate în laboratorul clinic diferă prin sensibilitatea lor (tabelul 10.3).

Tabelul 10.3. Sensibilitatea reacțiilor antigen-anticorp utilizate în laboratorul clinic, exprimată prin concentrația minimă de anticorpi decelabilă

Reacții și metode	Sensibilitate, $\mu\text{g/ml}$
<i>A. Reacții primare</i>	
Imunofluorescență ¹	10^{5-6} UFC sau UFP/ml
ELISA	0,001
RIA	0,001
<i>B. Reacții secundare</i>	
Reacții de precipitare: ■ precipitare în mediu lichid ■ imunodifuzia radială — dublă (Ouchterlony) — simplă (Mancini) ■ contraimunoelectroforeză	10 40 10 100
Reacții de aglutinare: ■ aglutinare bacteriană ■ hemaglutinare pasivă	0,01 0,005—0,01
Reacția de fixare a complementului	0,1
Reacții de neutralizare ■ neutralizarea toxinelor ■ neutralizarea virusurilor	0,01 0,001
¹ Sensibilitatea imunofluorescenței ca metodă microscopică pentru detectarea microorganismelor apreciată în unități formatoare de colonii bacteriene (UFC) sau plaje virale (UFP)	

10.2.2. Aplicații practice ale reacțiilor antigen-anticorp

Aplicațiile practice ale reacțiilor antigen-anticorp se bazează pe *specificitatea cuplării acestor două elemente*, care trebuie verificată prin martori adecvați.

Se pot urmări: *identificarea unui antigen necunoscut prin anticorpii omolog prezente în seruri imune de referință; identificarea unui anticorp necunoscut prin antigenul omolog.*

Se pot obține *relații calitative*, simpla identificare a unui reactiv; *relații cantitative*. Diluția maximă a unui reactiv la care mai este vizibilă reacția cu cantități constante și

definite ale reactivului omolog se numește *titru*; ea caracterizează cantitatea reactivului cercetat și se exprimă printr-o reacție ordinară cu numărătorul 1.

10.2.2.1. Reacții de precipitare

Un antigen solubil formează cu anticorpul omolog un complex insolubil. Reacția poate avea loc în mediu lichid (reacția de precipitare inelară, de floculare) sau în mediu gelificat (reacții de imunodifuzie, imunoelectroforeza).

Reacția de precipitare inelară. Într-un mic tub, peste un volum de ser imun se pipetează, fără a amesteca cei doi reactivi, un volum din soluția de antigen. Apariția unui precipitat inelar la limita de separare a reactivilor, cu absența acestuia la martorul negativ (ser normal plus soluția de antigen), semnifică un rezultat pozitiv. Reacția de precipitare inelară dă numai rezultate calitative și nu indică numărul sistemelor antigen-anticorp implicate. **Se utilizează în laboratorul clinic pentru identificarea unor antigeni (polizaharida de grup a streptococilor etc.), în medicina legală pentru identificarea originii petelor de sânge, în controlul alimentelor pentru identificarea originii cărnii.**

Reacția de floculare este utilă când se poate urmări un singur sistem antigen-anticorp. Ca și în reacția de precipitare inelară, reactivii trebuie să fie perfect limpezi. Peste cantități egale de ser imun repartizate într-o serie de tuburi se pipetează cantități crescând din soluția antigenului omolog. Precipitatul format, după omogenizarea conținutului și incubarea tuburilor, este spălat prin centrifugare. Acest precipitat poate fi cuantificat prin diferite metode (dozarea azotului total, dozarea proteinelor). Dacă antigenul conține azot, diferența dintre azotul total și azotul antigen determină cantitatea de azot anticorp. Reacția de floculare *se utilizează în special pentru dozarea anatoxinelor.*

Imunodifuzia se bazează pe proprietatea antigenului și anticorpului de a difuza într-un gel transparent (agar, agaroză).

Imunodifuzia radială simplă (tehnica Mancini). Antigenul difuzează radial dintr-un godeu în stratul de gel care conține ser imun monospecific. După o perioadă de incubare la 37°C, în jurul godeului cu antigen se formează un halou de precipitat, al cărui diametru este direct proporțional cu concentrația antigenului (figura 10.4). Tehnica Mancini este folosită pentru determinarea concentrației proteinelor plasmatică (IgG, IgA, IgM, IgD, proteine ale sistemului complement, proteina C reactivă etc.).

Imunodifuzia dublă radială (tehnica Ouchterlony). Antigenul și anticorpul difuzează radial din godeuri practicate la distanță convenabilă în stratul de gel. După cca 24 ore de incubare, în zona dintre godeuri, unde reactivii corespondenți în difuziune au realizat proporții echivalente, apare o linie de precipitare. Tehnica Ouchterlony este utilizată pentru caracterizarea antigenilor în amestec (figura 10.5).

Prin **testul Elek** se poate demonstra toxigenența bacilului difteric. Într-o placă Petri cu mediu de cultură adecvat se aplică în lungul unui diametru o bandă din hârtie de

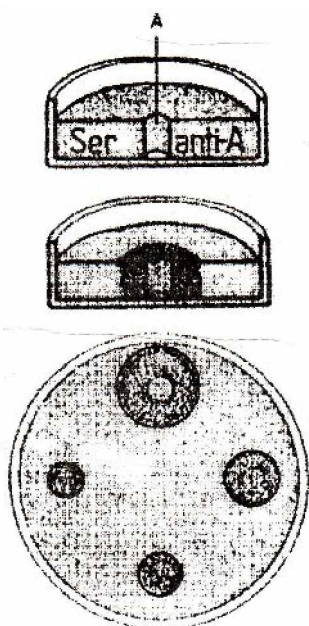


Fig. 10.4. Imunodifuzia radială simplă (testul Mancini). Antiserul A este încorporat în gel. Antigenul omolog A în diluții succesive, este dispus în godeuri. Diametrul haloului de precipitare este proporțional cu concentrațiile antigenului

filtru imbibată cu antitoxină difterică. Perpendicular pe direcția benzii de hârtie se însămânțează, în striu, tulpina de cercetat și câte o tulpină toxigenă și netoxigenă de bacil difteric (respectiv martorul pozitiv și cel negativ). Plăcile se incubează la 37°C. După 24 și 48 ore se urmărește apariția în unghiul dintre striul de cultură și depozitul de antitoxină a unei linii de precipitare, care continuă cu linia de precipitare toxină-antitoxină a mar-torului pozitiv.

Imunoelectroforeza. Prin asociere cu electroforeza puterea de rezoluție a imunodifuziei dublu radiale crește considerabil. Într-un prim timp, amestecul antigenic este supus migrării electroforetice în gel. În al doilea timp, se plasează antiserul într-un șanț paralel cu direcția de migrare electroforetică a antigenilor. În gel se formează arcuri de precipitare cu poziții caracteristice.

Contraimmunoelectroforeza. În gel de agar la pH 8,2—8,6 și când tamponul din gel are forța ionică mai mică decât cea din băile electrozilor, anticorpul are încărcătură electro negativă slabă și sunt antrenați de curentul de electroendosmoză spre catod, iar antigenii, cu sarcină electronegativă mai mare, sunt antrenați în câmpul electric spre anod. Dacă godeul cu anticorpi este dispus spre anod, iar cel cu antigen spre catod, cei doi reactivi se deplasează rapid și în sens contrar, iar unde se întâlnesc în proporții echivalente formează o linie de precipitare (figura 10.6). Lectura se poate face uzual în 30—60 minute. Contraimmunoelectroforeza este folosită pentru depistarea rapidă a antigenilor microbieni în umori.

Reacția de umflare a capsulei este o formă particulară a precipitării: când un ser anticapsular este amestecat pe o lamă de microscop cu microbul care conține polizaharida capsulară omoloagă, microscopic, capsula apare mai bine conturată și cu dimensiuni sensibile mai mari. Testul permite identificarea rapidă, direct în prelevate patologice, a bacteriilor capsulate (pneumococi ș. a.).

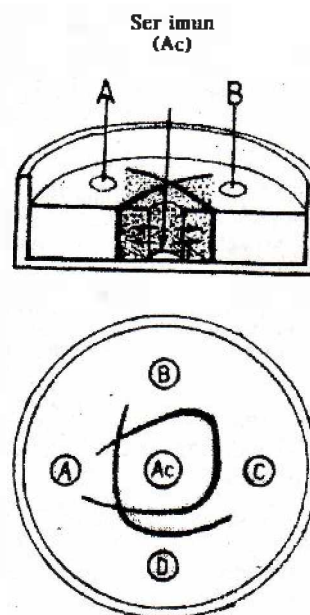


Fig. 10.5. Imunodifuzia dublă radială (testul Ouchterlony). Antiserul este plasat în godeul central, iar antigenul în godeurile periferice

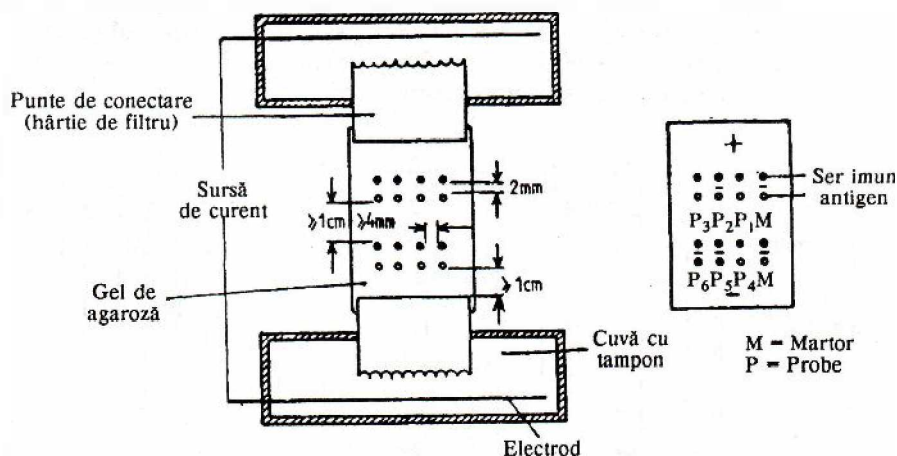


Fig. 10.6. Contraimmunoelectroforeza practică pentru depistarea unui antigen. Probele 2, 5 și 6 conțin antigenul căutat

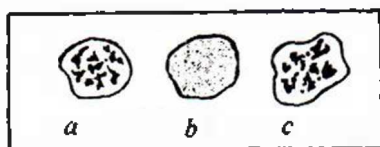


Fig. 10.7. Reacția de aglutinare pe lamă pentru identificarea unei tulpini de *Salmonella*. Suspensia bacteriană aglutinează cu serul polivalent anti-*Salmonella* grup A (a) și cu serul anti-*Salmonella* grup C (c), dar nu și cu serul anti-*Salmonella* grup B (b). Tulpina este deci o *Salmonella* grup C. Absența aglutinării cu serul antigrup B a verificat stabilitatea suspensiei testate

10.2.2.2. Reacții de aglutinare

Cuplarea unui antigen în suspensie cu anticorpii omolog determină apariția unui aglutinat, care se depune și lasă supernatantul limpede. Antigeni în suspensie sunt: suspensii de bacterii, hematii (reacții de aglutinare directă) sau hematii ori particule uniforme de latex pe suprafața cărora a fost adsorbit un antigen (reacții de aglutinare indirectă sau pasivă).

În altă variantă a aglutinării anticorpii sunt fixați prin fragmentul Fc pe proteina A din învelișul *Staphylococcus aureus* (reacția de coaglutinare) sau adsorbiți pe particule de latex. În aceste cazuri se pot depista antigeni, care, reacționând cu fragmentele Fab ale anticorpului de pe particule vecine, determină aglutinarea.

Reacțiile de aglutinare pot fi efectuate pe lamă când uzual obținem rezultatele calitative, sau în tuburi, când putem realiza cuantificări. Martorii adecvați trebuie să ateste stabilitatea suspensiilor folosite: suspensia antigenică + soluție salină izotonă sau un ser care nu conține anticorpi omologi.

Reacții de aglutinare pe lamă. Aglutinările macroscopice pe lamă, citite după 1—2 minute în oglinda concavă (figura 10.7), se folosesc curent pentru identificarea antigenică a bacteriilor. Sunt mai puțin sensibile decât aglutinările în tub. Aglutinările anumitor microorganisme trebuie urmărite microscopic pe preparate colorate (rickettsiile) sau pe fond negru (leptospirele). Reacțiile de microaglutinare sunt foarte sensibile și se folosesc atât pentru identificarea microbilor, cât și, lucrând cu diluții de ser, pentru cuantificarea anticorpilor.

Latex-aglutinarea și coaglutinarea sunt reacții foarte sensibile larg utilizate pentru depistarea rapidă a antigenilor microbieni în umori.

Reacții de aglutinare în tub (figura 10.8) se folosesc pentru:

- cuantificarea anticorpilor din serul pacienților (serodiagnostic);
- confirmarea rezultatelor aglutinării pe lamă (identitatea microbului aglutinat pe lamă se confirmă dacă serul respectiv îl aglutinează și în tub până la titrul nominal indicat de furnizor — vezi 13.1). Perioada de incubație la 37°C sau 56°C și aspectul aglutinantului diferă cu antigenul: antigen flagelar, incubare 2 ore, aglutinat floconos ușor dissociabil; antigeni somatici, incubare 20 ore, aglutinat grunjos greu dissociabil.

Tubul	1	2	3	4	5	6	7	8	Martor antigen
Diluția	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	
ml antigen	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ml ser de testat	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ml diluent	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Fig. 10.8. Reacția de aglutinare în tuburi pentru depistarea și titrarea anticorpilor din serul unui pacient. Titrul aglutininilor în serul testat este de 1:1280

10.2.2.3. Reacția de fixare a complementului (RFC)

Indicații: Este frecvent utilizată pentru identificarea și titrarea anticorpilor (serodiagnostic), dar poate fi aplicată și la identificarea unor antigeni virali (e. g. identificarea tipului de virus gripal izolat pe embrionul de găină etc.).

Principiu: Reacția se desfășoară în doi timpi:

1. La diluții de ser imun de complementat (prin încălzire 30 minute la 56°C) se adaugă în cantități determinate antigen și complement, iar amestecul este incubat 18 ore la 4°C pentru formarea complexului antigen-anticorp și fixarea (activarea) complementului.

2. Se adaugă o cantitate determinată de cuplu hemolitic (amestec de hematii de berbec cu ser antihematie de oaie) care, după incubare 30 minute la 37°C (pentru dezvoltarea hemolizei) și 1—2 ore la 4°C (pentru sedimentarea hematiilor nelizate), testează absența sau prezența complementului în sistem, interpretată după cum urmează:

■ **absența lizei** (hematiile sedimentate în buton cu supernatantul incolor): complementul a fost fixat de complexul imun format în primul timp al reacției; **reacția este pozitivă**;

■ **liza** (amestecul reactivilor limpede, colorat în roșu, fără buton de sedimentare a hematiilor): în primul timp al reacției nu s-a format un complex antigen-anticorp, complementul rămas liber determină liza hematiilor; **reacția este negativă** (fig. 10.9).

În funcție de cantitatea complexului antigen-anticorp fixarea complementului variază și, convențional se notează cu 4; 3; 2; 1 și 0 (respectiv 100; 75; 50; 25 și 0% fixare, adică lipsă de liză).

Proba: În funcție de indicație, ser cu anticorp necunoscut sau suspensie microbiană de identificat.

Necesar:

1. Diluent, tampon veronal cu pH 7,3.
2. Reactivul imunologic de referință, antigen sau anticorp, în funcție de indicația reacției.
3. Hematii de berbec.
4. Ser hemolitic anti-oaie.
5. Complement de cobai.
6. Plăci standard din material plastic cu godeuri.
7. Pipete automate și semiautomate reglabile pentru volum de 0,1 ml.
8. Eprubete, pipete gradate.

Procedura: Amănuntele complexe privind standardizarea reactivilor depășesc scopul manualului.

Interpretarea corectă a RFC se face după lectura maritorilor:

■ **maritorul cuplu hemolitic verifică** dacă hematiile nu lizează spontan (sursă de rezultat fals negativ);

■ **maritorul complement verifică** dacă în reacție sunt prezente cele 2,5 DH₅₀ indicate uzual;

■ **maritorul antigen verifică** dacă antigenul nu fixează complementul în absența anticorpului;

		Reacție pozitivă	Reacție negativă
PRIMA REACȚIE	Ser imun (anticorp)	+	-
	Antigen microbial	+	+
	Complement	+	+
A DOUA REACȚIE	Hematii de oaie	+	+
	Ser hemolitic antioaie	+	-
		Absența hemolizei	Hemoliză

Fig. 10.9. Reacția de fixare a complementului, schema de principiu

■ *martorul ser pozitiv* verifică dacă în reacție a fost utilizată doza precisă de antigen; acest martor trebuie să reproducă titrul cunoscut al serului pozitiv;

■ *martorul ser negativ*;

■ *martorul ser de investigat*.

Un ser care în absența antigenului fixează complementul se numește *anticomplementar*. Cauzele anticomplementarității unui ser pot fi preexistente recoltării (complexe antigen-anticorp circulante) sau din cauza recoltării și conservării defectuoase a serului (seruri contaminate în care microbii de contaminare activează complementul).

10.2.2.4. Reacții de neutralizare și reacții de inhibare

Ca și RFC, sunt modalități indirecte de depistare și cuantificare a reacției antigen-anticorp. În esență în aceste reacții sunt implicate antigeni virali sau toxine a căror legare de receptori celulari specifici este urmată de efecte definite (infecție virală, hemaglutinare, hemadsorbție, hemoliză, intoxicație etc.). Anticorpii omologi previn fixarea acestor antigeni pe receptorii celulari. Sistemele indicator în aceste reacții variază cu natura și cu efectele antigenului:

În *reacțiile de neutralizare* se urmărește supraviețuirea animalelor receptive după inocularea amestecului ser imun—virus sau ser imun—toxină și blocarea efectului citopatic după inocularea amestecului în culturi de celule. O variantă a reacției de neutralizare este *testul de seroprotecție*, în care se urmărește capacitatea unei anti-toxine, inoculate în prealabil la un animal receptiv, de a preveni efectele specifice ale unei toxine.

Frecvent folosită în laboratorul clinic este *dozarea antistreptolizinei O* bazată pe neutralizarea efectului hemolitic al streptolizinei O, o citotoxină produsă de streptococii grup A, C și G.

Prin *teste intradermice* poate fi urmărită neutralizarea toxinelor difterice, cu efect dermonecrotic (testul Schick) sau a eritrotoxinei streptococice (testul Dick).

Reacțiile de inhibare a hemaglutinării (RIHA) sunt uzual folosite pentru identificarea virusurilor hemaglutinante și în serodiagnosticul infecțiilor determinate de asemenea virusuri. În condițiile necesare hemaglutinării (pH, temperatură), peste diluțiile de ser se adaugă o doză determinată de hemaglutinină și suspensia de hematii. RIHA trebuie însoțită de martori care să ateste: lipsa în serul testat a inhibitorilor nespecifici ai hemaglutinării, a izo- și heteroaglutininelor, sedimentarea hematiilor în buton.

Reacția pozitivă: în prezența anticorpilor inhibitori omologi hemaglutininei, hematiile sedimentează în buton. *Reacția negativă*: în absența acestor anticorpi, hematiile aglutinează în pelicula care tapisează fundul godeului sau al tubului. În funcție de cantitatea complexului anticorp—hemaglutinină, inhibarea variază și, convențional, se notează cu 4; 3; 2; 1 și 0 (respectiv 100; 75; 50; 25 și 0% inhibare) (figura 10.10).

10.2.2.5. Reacții cu anticorpi sau antigeni marcați

Imunofluorescența. Coloranți fluorescenți (izotiocianatul de fluorescență, rodamină) pot fi legați covalent la imunoglobuline. Dacă excesul de colorant este îndepărtat din soluție, se obțin anticorpi marcați fluorescent (imunoconjugate) prin care pot fi identificați și localizați variați antigeni pe frotiuri examinate la microscopul cu radiații ultraviolete (figura 10.11).

Tehnica directă folosește anticorpi marcați specific pentru fiecare antigen. Numărul mare de imunoconjugate necesare face restrictivă utilizarea acestei tehnici.

Tehnica indirectă folosește anticorpi marcați antiimunoglobuline, condiție în care elementele de identificat pot fi atât antigenii, cât și anticorpii. Pentru laboratorul clinic

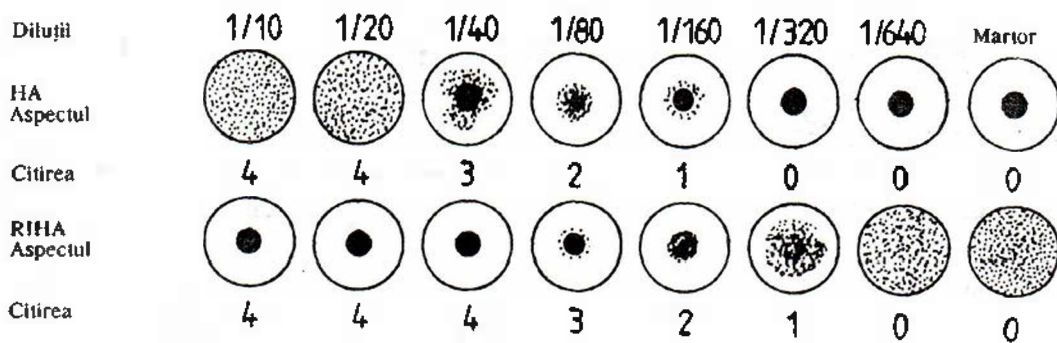


Fig. 10.10. Reacția de hemaglutinare și de inhibare a hemaglutinării în gripă

avantajele metodei indirecte sunt triple: numărul limitat de imunoconjugate necesare; utilitatea și în serodiagnosticul unor boli infecțioase, sensibilitatea mai mare.

Radioimunodozarea (RIA). Antigenii pot fi marcați cu izotopi radioactivi (^3H , ^{125}I , ^{14}C). Există o competiție specifică pentru anticorp între o cantitate cunoscută de antigen marcat radioactiv și antigenul nemarcat (în calitate necunoscută). Se măsoară radioactivitatea complexului antigen-anticorp. Pentru aceasta, fie anticorpul este în prealabil fixat pe un suport insolubil, fie complexul este precipitat cu ser antiimunoglobulină. Concentrația antigenului nemarcat se află comparând radioactivitatea complexului cu o curbă standard. RIA este cea mai sensibilă metodă de cuantificare a antigenilor și haptanelor. În laboratorul clinic este utilizată pentru dozarea hormonilor, medicamentelor, antigenului HBs.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Unul din reactivi, antigenul sau anticorpul, este fixat prin adsorbție pe o suprafață de polistiren (e. g. godeul unei plăci din polistiren). Un anticorp corespunzător este marcat prin conjugare cu o enzimă ca peroxidaza din hrean sau fosfataza alcalină. După formarea complexului cu antigenul și spălarea reactivului necuplat, activitatea enzimatică restantă pe suprafață, care atestă reacția antigen-anticorp urmărită, este testată prin adăugarea substratului cromogen al enzimei de marcare, iar reacția stopată după 30 minute. Culoarea dezvoltată este măsurată spectrofotometric, iar cantitatea reactivului depistat este apreciată în raport cu o valoare prag a densității optice (*cut-off*) sau în EIU (*Enzyme Immunoassay Units*).

Avantajele testelor ELISA sunt două: sensibilitate de același ordin cu RIA și accesibilitate mai mare pentru laboratoarele clinice.

Există trei tipuri de metode ELISA: indirectă, competitivă și cu dublu *sandwich*.

■ **Metoda indirectă** detectează anticorpul. Antigenul de referință, fixat pe suprafața de polistiren, este incubat cu serul testat, apoi cu anticorpi antiimunoglobulină marcați cu enzimă. După fiecare etapă, reactivii necuplați sunt îndepărtați prin spălarea suportului. În final se adaugă substratul cromogen, iar culoarea dezvoltată în interval de 30 minute este măsurată (figura 10.12, a).

■ **Metoda competitivă** detectează de asemenea anticorpi. Anticorpul din serul testat și anticorpul omolog monoclonal marcat cu peroxidaza din hrean, pipetați în ordinea enunțată, intră în competiție pentru antigenul fixat pe suprafața de polistiren. Anticorpii necuplați sunt îndepărtați prin spălare, apoi este adăugat substratul cromogen pentru testarea enzimei restante pe suprafața de reacție. Intensitatea culorii, măsurată după stoparea reacției la 30 minute, deci activitatea enzimei de marcare este invers proporțională cu concentrația anticorpului din serul pacientului testat (figura 10.12, b).

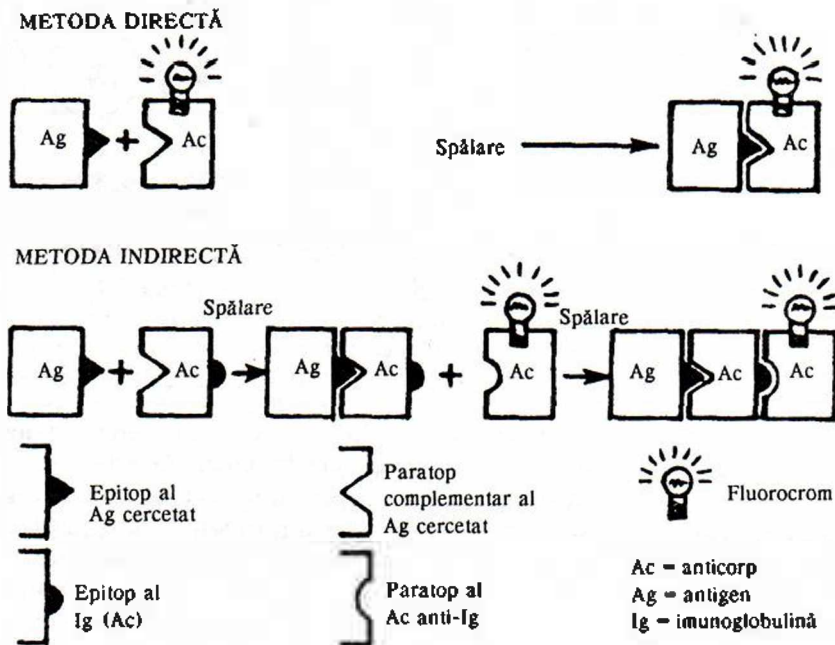


Fig. 10.11 Principiul colorăției imunofluorescente

■ *Metoda cu dublu sandwich* detectează antigenul. Anticorpul de referință fixat pe suprafața de polistiren este incubat, pe rând, cu materialul suspect a conține antigenul, apoi cu anticorpul de referință marcat cu enzimă. După fiecare etapă reactivii necuplați sunt îndepărtați prin spălarea suportului. În final este adăugat substratul cromogen și măsurată culoarea dezvoltată în intervalul de 30 minute (figura 10.12, c).

10.2.3. Depistarea imunodeficiențelor umorale: hipo- și agamaglobulinemia

Se testează cantitativ gamaglobulinele (e. g. electroforetic). Nivelul de 2 g% este considerat limita normală inferioară. Prin testul Mancini se pot cuantifica diferențiat clasele de imunoglobuline. Capacitatea de a elabora un răspuns imun umoral poate fi investigată prin:

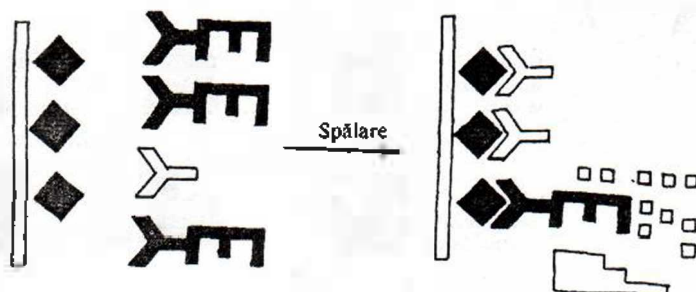
- căutarea unor anticorpi naturali ubiquitari cum sunt izohemaglutininele A, B; heteroanticorpii față de globulele roșii de oaie, anticorpii bactericizi anti-*E. coli*;
- testarea răspunsului imun față de o anatoxină (difterică, tetanică) sau față de un vaccin corpuscular omorât (niciodată viu atenuat).

10.3. REACȚIILE IMUNITĂȚII CELULARE

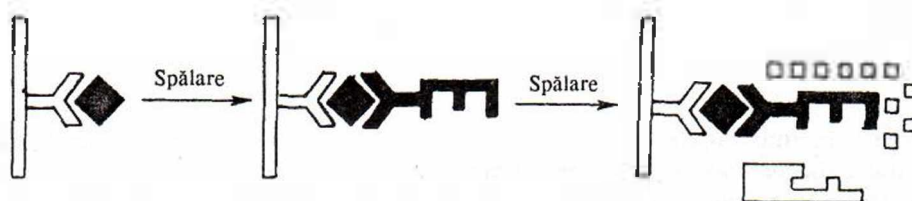
Numărul în creștere al persoanelor cu defecte ale imunității mediate celular — unele congenitale (aplazia timică — sindromul Di George, displazia timică — sindromul Nezelof



a) METODA INDIRECTĂ



b) METODA COMPETITIVĂ



c) METODA ÎN DUBLU SANDWICH



Fig. 10.12. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

etc.), altele dobândite (infecții cu virusuri limfotrope, tumori ale sistemului limfoid etc.) sau induse iatrogen (medicație antitumorală, imunosupresivă, corticoterapie) — explică interesul pentru testarea reactivității mediate celular. Pentru aceasta putem recurge la testări *in vivo* sau *in vitro*.

10.3.1. Testări *in vivo*

10.3.1.1. Intradermoreacții (i.d.r.)

Ca urmare a colonizărilor și frecvențelor infecții, aparente sau inaparente, cu microorganisme ubicuitare, majoritatea persoanelor normale răspund cu reacții de sen-

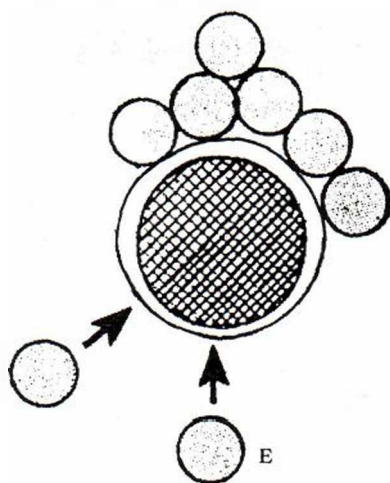


Fig. 10.13. Rozetarea limfocitelor umane cu hematii de oaie, care este o metodă simplă pentru identificarea limfocitelor T, dar fără posibilitatea diferențierii subpopulațiilor

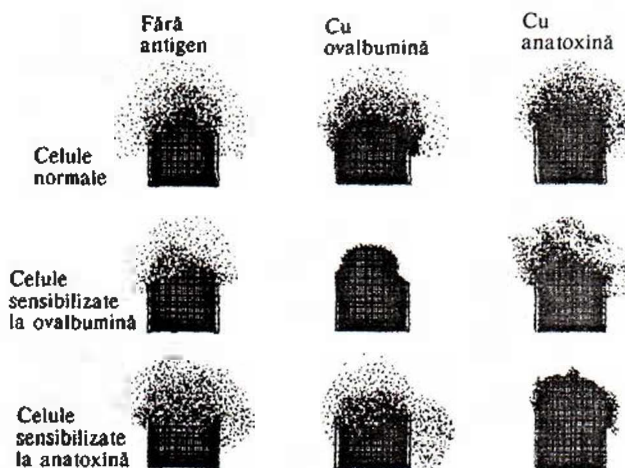


Fig. 10.14. Testul de inhibare a migrării macrofagelor

sibilizare de tip întârziat (vezi fig. 11.1) la injectarea intradermică a antigenilor de *Candida* (candidină), *Streptococcus pyogenes* (streptolizina O, streptokinază-streptodornază) sau *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculină) etc. (vezi 11.1). Răspunsul negativ la testul i.d.r. cu antigenii acestor microbi indică o deficiență a reactivității imune mediată celular.

10.3.1.2. Teste de inducere a sensibilității întârziate

Pe tegument se aplică în spot soluția 1% de dinitrocloro- sau dinitrofluorobenzen capabilă să inducă sensibilizare mediată celular. După 24 ore tegumentul este spălat, iar după 7—14 zile, exact în aceeași arie se aplică o picătură de soluție 0,03—0,1% a aceluiași derivat. Competența de a elabora un răspuns imun celular se traduce prin apariția unui infiltrat inflamator în aria cutanată testată.

10.3.2. Testări *in vitro*

10.3.2.1. Numărătoarea diferențiată a limfocitelor

Tehnologia modernă permite obținerea de anticorpi monoclonali de șoarece specifici pentru variați markeri limfocitari de suprafață: variatele clase de imunoglobuline ale limfocitelor B, markerii CD₄ ai limfocitelor T ajutătoare (T_H), CD₈ ai limfocitelor T supresoare (T_S) sau markeri ai altor celule. Acești valoroși reactivi permit numărătoarea diferențiată a populațiilor și subpopulațiilor limfocitare prin două metode: *imunofluorescență* și *citometria în flux (flow cytometry)*. În acest mod pot fi stabilite deficiențele congenitale de sinteză a unei anumite clase de imunoglobuline, raportul subpopulațiilor limfocitare CD₄ ajutătoare/CD₈ supresoare, care normal este de 1,5, dar ajunge sub 1 la pacienții cu deficiente imunitare (e. g. SIDA).

Laboratoarele fără acces la aceste tehnici moderne pot recurge la o tehnică mult mai modestă: *rozetarea limfocitelor T cu hematiile de oaie*. Rozeta este o grupare celulară experimentală, identificabilă microscopic, formată dintr-o celulă (celula formatoare de rozetă) pe suprafața căreia se leagă cel puțin 3 celule de un singur tip (celule indicatoare). Limfocitele T umane formează spontan rozete cu hematiile de oaie. Suspensia de limfocite umane, separată prin centrifugare în gradient de densitate, este incubată în prezența hematiilor de oaie. Celulele resuspensionate sunt examinate apoi microscopic pentru identificarea și cuantificarea rozetelor (figura 10.13). Normal proporția limfocitelor din sângele periferic uman care rozetează cu eritrocite de oaie este de 70%.

Transformarea blastică a limfocitelor. Sub acțiunea unui mitogen limfocitele se transformă în celule mari blastice, care se divid activ. Fenomenul poate fi cuantificat prin determinarea microscopică a numărului și proporției de celule blastice apărute într-o populație de limfocite sau prin măsurarea cantității de timidină tritiată incorporată de ADN. Prin acest test se poate aprecia:

- reactivitatea globală a limfocitelor T, dacă se utilizează un mitogen policlonal ca fitohemaglutinina sau concanavalina A;
- reactivitatea unei clone limfocitare la un antigen dat.

Inhibiția migrării macrofagelor. Limfocitele specific sensibilizate cultivate în prezența antigenului omolog eliberează factorul de inhibiție a migrării macrofagelor (MIF), care inhibă migrarea macrofagelor dintr-un tub capilar introdus în camera de cultivare (figura 10.14).