

Trofická pojiva:

- 1. krev a krevetvorba**
- 2. lymfa,**
- 3. tkáňový mok**
- 4. lymfatické orgány**

Volné buňky pojivových tkání

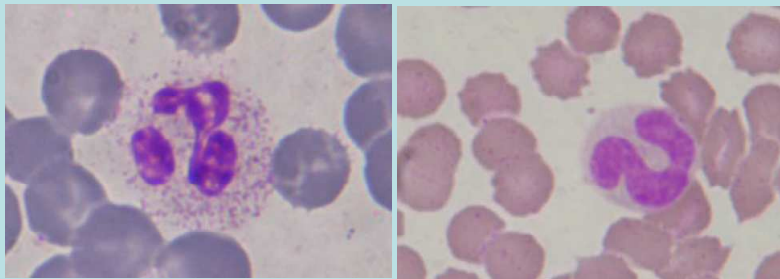
Leukocyty

Vycestovávají do vaziva přes stěny kapiár – diapedeze

Hlavní součást trofických pojiv – krve

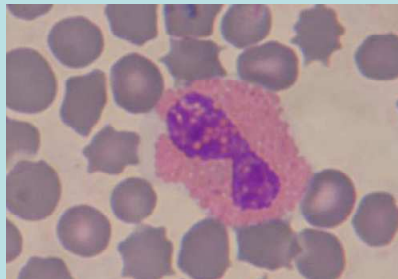
Granulocyty

Neutrofil

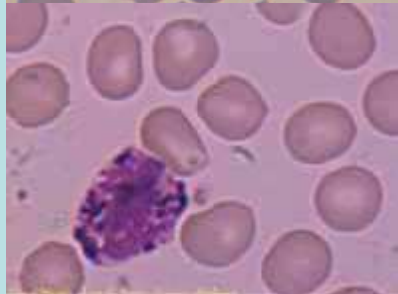


Nezralý neutrofil- tyčka

Eozinofil

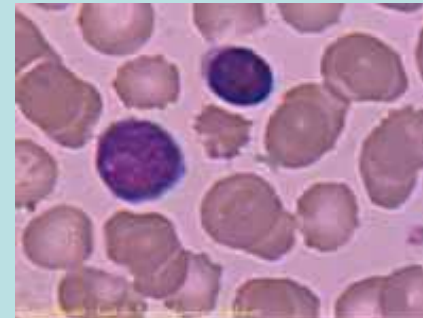


Bazofil

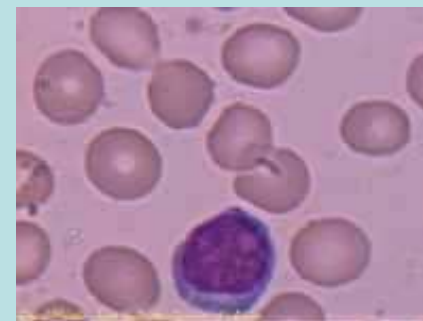


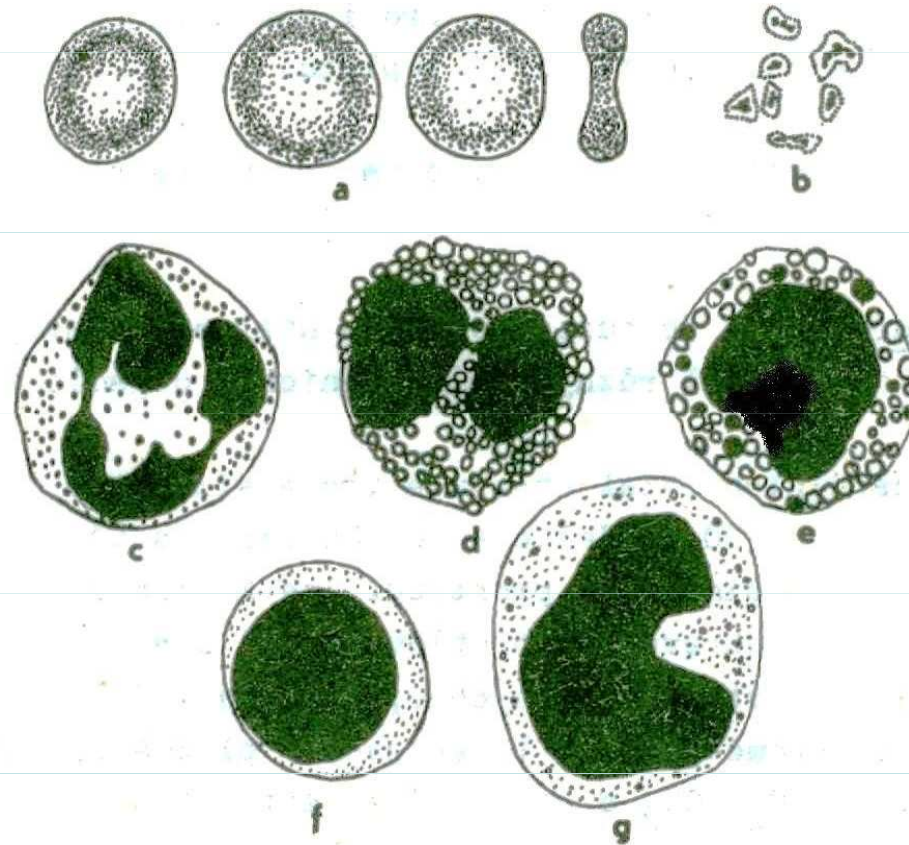
Agranulocyty

Lymfocyt



Monocyt





Obr. 120. Krvinky člověka

a = erythrocyty, b = trombocyty, c = neutrofilní granulocyt,
d = eosinofilní granulocyt, e = bazofilní granulocyt, f = lym-
focyt, g = monocyt.

Stanovení krevních skupin

Krátké ilustrativní video

<https://www.youtube.com/watch?v=J5xSUhyXyIE>

Aglutinace je imunitní děj, reaguje protilátka s korpuskulárním antigenem, která vede ke vzniku aglutinátu „vločkové konzistence“. U reakce zv. hemaglutinace jsou korpuskulárním antigenem erytrocyty. Výsledný shluk erytrocytů je dobře pozorovatelný pouhým okem a je dostatečně pevný při standardním způsobu třepání. Nevýhodou hemaglutinace je nízká citlivost a omezená životnost erytrocytů.

Aglutinační reakce se obvykle hodnotí vizuálně tzv. na čtyři křížky a jsou to metody jednoduché a levné, ale také málo citlivé. Používají se hlavně pro průkaz antigenů erytrocytů a celé řady bakteriálních antigenů.

Základem je reakce:

Aglutinogen (tj antigen) reaguje s aglutininem (tj protilátka) za vzniku aglutinátu – sraženiny (imunokomplexu).

krevní skupina	antigen	A	B	0	AB
v membráně erytrocytů		A	B	H	A i B

Pomůcky: podložní víčka na diagnostiku krevních skupin s kulovitými otvory, desinfekce, vatičky, pero na odebírání krve z prstů, bodce, tubičky s heparinem, epiny, stojánek, roztírací umělohmotné tyčky, pipeta s rozměrem 1 μ l - 10 μ l, rukavice;

1. červené krvinky všech skupin -
2. lahvičky s protilátkami proti krevním antigenům:

POUŽITÁ DIAGNOSTIKA

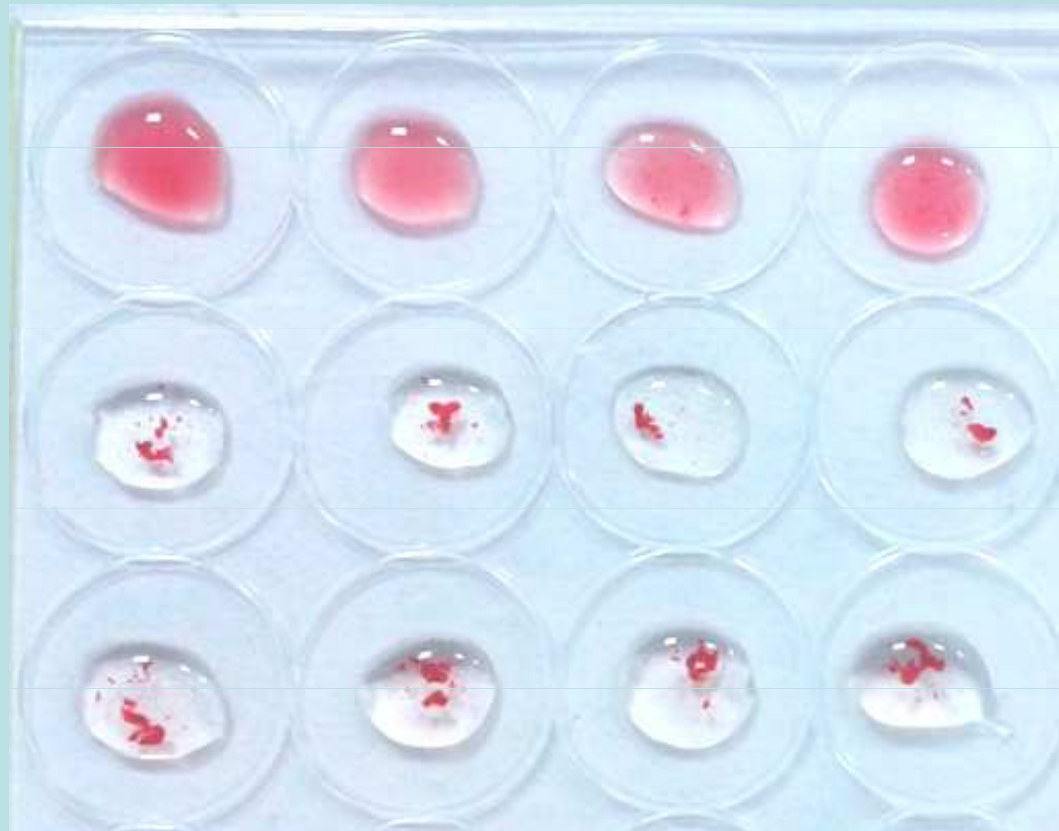
- Monoklonální diagnostikum anti-A (výrobce Sanquin, Holandsko; dodavatel EXBIO Olomouc s.r.o.), ředění 1:32
- Monoklonální diagnostikum anti-B (výrobce Sanquin, Holandsko; dodavatel EXBIO Olomouc s.r.o.), ředění 1:8
- Lektin anti-H (výrobce Sanquin, Holandsko; dodavatel EXBIO Olomouc s.r.o., ředění 1:2
 - Monoklonální diagnostikum anti-H (výrobce Immucor Gama, Německo; dodavatel APR Praha s.r.o.)

Postup:

- Odběrovým perem v rukavicích odebereme kapky krve z prstu do heparinové tyčinky
- kapku krve dáme na podložní sklíčko a okamžitě rozetřeme
- z heparinové tyčinky necháme krev stéci do epiny ve stojánku.
- z naředěných protilátek proti A,B,O krevním skupinám odebereme 5 μ l pipetou a nakapeme na podložní sklíčko s kulovitými prostory.
- pak z odebrané krve v epině vezmeme a dáme 5 μ l krve do 0,5ml fyziologického roztoku a zamícháme, odtud nabere 5 μ l zředěné krve a nakapeme na sklíčko do nakapaných protilátek. Vezmeme umělohmotné roztírátko a kapku krve s kapkou protilátek smícháme a čekáme na výsledek - srážení, který si prohlédneme v mikroskopu
- nachystáme kontrolní vzorky kr. skupin komerčně zakoupené k porovnání
- **Výsledek:** Pokud došlo k aglutinaci, tj ke srážení krvinky s protilátkami za vzniku aglutinátu, jde o danou krevní skupinu. Pokud nedošlo k tomuto ději, nejedná se o danou krevní skupinu.

- **Výsledek:** Pokud došlo k aglutinaci, tj srážení krvinky s protilátkami za vzniku aglutinátu, jde o danou krevní skupinu. Pokud nedošlo k tomuto ději, nejde o danou krevní skupinu. Při hodnocení brát v úvahu výskyt recesivních alel.
- Vyhodnocení:
- Vyhodnotíme citlivost reakce, tj. uvedeme, při kterém ředění byla reakce ještě pozitivní. Používáme hodnocení na čtyři křížky:
- +++++ (100% aglutinace) aglutinát se po protřepání vůbec nerozpadá +++ (75 %) ++ (50 %) + (25 %) 0 (bez aglutinace) lze snadno roztřepat až na původní erytrocytární suspenzi
- Krev patří do skupiny....

Vzorky krve s protilátkami a výsledky srážení



srážení

srážení

Vytvoření krevního roztěru:

Barvení krevních roztěrů Na podložní sklíčko nakápneme kapku nesražené krve a dalším sklíčkem s nenabroušenými hrany krev rozetřeme v úhlu asi 45°

V poslední době je na trhu několik typů tzv. souprav pro rychlé bavení, které jsou sice mnohem pohodlnější z hlediska vlastní manipulace i časové úspory, výsledky barvení však jsou zpravidla o něco horší (např. granula nejsou tolik výrazná, celkový odstín je našedlý apod.) Může tak snáze dojít k záměně např. neutrofilu za eozinofil apod. Ve cvičeních budeme používat sadu pro rychlé barvení Leukodif (Pliva Lachema a.s.). Barvení sestává ze 4 kroků a každý krok je tvořen sérií (v tabulce uvedena v závorce) několika ponoření do patřičného roztoku.

Nátěr vždy ponoříme jen na dobu 1 sekundy do patřičného roztoku podle následujícího předpisu:

1. Fixace v methanolu (5 x 1s)
2. Kyselá barvení v Eosinu (3 x 1s)
3. Zásadité barvení v Azuru (5 x 1s)
4. Opláchnutí ve stabilizačním pufru (PBS). Poté necháme usušit a hodnotíme.

TEORIE

Aglutinace (shlukování) krvinek

Reakce antigen-protilátka. Membrány erytrocytů – mohou mít antigen – **aglutinogen A nebo B** (mukopolysacharidy). Reaguje s protilátkou v plazmě – **aglutininem anti-A** (a.&) nebo aglutininem **anti-B** (a.β) (oba γ-globuliny). U jednoho jedince není nikdy stejný aglutinogen a antiaglutinin.

Krev člověka: 4 základní skupiny (podle aglutinogenu v membránách).

Krvinky 0 (bez antigenu) shlukují A,B

krvinky A shlukuje B a 0,

krvinky B shlukuje A a 0,

krvinky AB nemají protilátky.

Tab. 10. Krevní skupiny u člověka

Krevní skupina	Aglutinogen	Aglutinin	Četnost výskytu v populaci
O	žádný	anti-A, anti-B	45 %
A	A	anti-B	41 %
B	B	anti-A	10 %
AB	A a B	žádný	4 %

Podskupiny A₁ – A₆, další aglutinogeny D(Rh) – systém 13 a-genů (C,D,E aj.).
Nejvíce antigenní D. D přítomen = Rh⁺. Aglutininy anti-D normálně nejsou přítomny, tvoří se při setkání s krví Rh⁺.

Dědičnost krevních skupin.


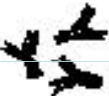







Krevní skupiny u zvířat: více než u lidí. Vznik antigenů před vývojem primátů.
Známy i u slepic, kachen, králíků, koz.

Neidentifikovány u morčat, myší, koček a poikilotermů.

Mezitonová aglutinace

Tab. 10. Krevní skupiny u člověka

Krevní skupina	Aglutinogen	Aglutinin	Četnost výskytu v populaci
O	žádný	anti-A, anti-B	45 %
A	A	anti-B	41 %
B	B	anti-A	10 %
AB	A a B	žádný	4 %

	fenotyp	genotyp	Antigeny erytrocytů	Aglutiny plazmy	% zastoupení v české populaci
Systém ABO	A	AA AO	 Antigen A	 anti - B	41,5
	B	BB BO	 Antigen B	 anti - A	14,1
	AB	AB	 Antigen A Antigen B	- žádné protilátky	6,6
	O	OO	 Žádný antigen	 anti - A anti - B	37,8
Systém Rh	Rh ⁺	DD Dd	 Antigen D	-	85
	Rh ⁻	dd	 Žádný antigen	Jen po imunizaci (anti - D)	15