

1 Aglutinační metody

Aglutinace (shlukování) patří k nejstarším sérologickým metodám. Podstata spočívá v reakci protilátky s korpuskulárním antigenem, která vede ke vzniku aglutinátu „vločkové konzistence“. Korpuskulární antigen musí na svém povrchu nést větší počet antigenních determinant. Může to být např. bakteriální buňka nebo erytrocyt. Při aglutinaci dochází vlastně k provázání antigenních determinant a tím i antigenních částic přes Fab fragmenty protilátek. Nejlépe aglutinují protilátky IgM. Důležitou roli má vzájemný poměr reagujících složek. V přebytku antigenu aglutinát nevzniká, protože není dostatek protilátek na provázání molekul antigenu. Stejně tak nevzniká aglutinát při přebytku protilátky, protože hodně vazebných míst na protilátkách zůstává volných a nemůže dojít k provázání molekul antigenu.

Rozlišuje se aglutinace **přímá** (výše popsaný proces) a **nepřímá**, kdy se reakce účastní tzv. inkompletní protilátky. Tyto protilátky sice obsadí vazebná místa na antigenu, ale nedojde k aglutinaci. Na průkaz inkompletních protilátek bylo vyvinuto několik metod. Nejčastější je tzv. Coombsův test: inkompletní protilátky navázané na povrchu antigenních částic (např. erytrocytů) se prokazují pomocí antiglobulinového séra, tedy protilátek proti protilátkám. Přídavek tohoto antiglobulinového séra způsobí aglutinaci, pokud jsou ve vzorku inkompletní protilátky přítomny. Coombsův test je důležitá metoda, neboť mezi inkompletní protilátky patří např. některé typy protilátek proti erytrocytům s jiným povrchovým antigenem. Ty mohou způsobovat komplikace při transfúzích.

Někdy se při aglutinaci používají latexové částice, na jejichž povrch se váže původně solubilní antigen a výsledná aglutinace je potom dobře pozorovatelná.

Další modifikací je tzv. **hemaglutinace**, kdy korpuskulárním antigenem jsou 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 4 křížky a jsou to metody jednoduché a levné, ale málo citlivé. Používají se hlavně pro průkaz erytrocytárních antigenů a celé řady bakteriálních antigenů.

Podobný princip jako při aglutinaci se uplatňuje také při *precipitaci*. Mezi těmito procesy je však třeba rozlišovat: Rozdíl mezi aglutinací a precipitací spočívá v tom, že při precipitaci není antigen korpuskulární, ale solubilní a výsledkem je vznik precipitátu, tedy zákalu. Stejně jako při aglutinaci vzniká precipitát pouze při optimálním vzájemném poměru reagujících složek.

ÚLOHA 10: Stanovení antigenů krevních skupin za použití bromelinu

Antigeny krevního systému ABO jsou molekuly glykoproteinů vázané v membránách červených krvinek.

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

Podstatou sérologického stanovení těchto antigenů je **aglutinace – shlukování** erytrocytů, kdy reaguje antigen v membráně erytrocytů s příslušnou protilátkou označovanou jako *anti A*, *anti B* nebo *lektin* v případě antigenu H.

Výsledkem vzájemné reakce erytrocytárního antigenu a příslušné protilátky je **aglutinace** a reakci hodnotíme jako pozitivní, když shluk krvinek je pevný a nelze ho roztřepat.

Často se zde setkáme s termíny jako aglutinogen či aglutinin. Jako aglutinogen se označuje antigen a jako aglutinin protilátka, která se váže na povrch erytrocytů přes aglutinogen.

Bromelin je proteolytický enzym z ananasu, vhodný pro enzymové ošetření erytrocytů při screeningu

protilátek. Negativní náboj na povrchu erytrocytů vede ke vzájemnému elektrickému odpuzování erytrocytů a zabránění aglutinace protilátkami. Enzymy, jako např. bromelin, redukují tento negativní náboj a odštěpují navíc určité polypeptidové řetězce, které vyčnívají z membrány erytrocytů. Oba tyto procesy vedou ke vzájemnému přiblížení erytrocytů a zároveň k aglutinaci protilátek. Aglutinace by se tedy měla projevit i při větším zředění protilátek, než tomu bude u krvinek neovlivněných bromelinem.

Postup, pomůcky:

Pracujeme v rukavicích!!! *Dbáme na pečlivé značení všech zkumavek – krevní skupinu i číslo zkumavky (ředění), pro potřeby inkubace je nutno zkumavky značit navíc také vlastní značkou své pracovní skupiny.*

1. Fyziologický roztok pro červené krvinky – 0,85% NaCl
2. 3% suspenze erytrocytů krevních skupin A, B, 0 ve fyziologickém roztoku – již připraveno
3. 3% suspenze erytrocytů hydrolyzovaných (natrávených) bromelinem – nutno připravit:
 - do eppendorfek s 20 μ l 0,5% bromelinu přidáme 180 μ l erytrocytární suspenze (z bodu 2).
 - zkumavky inkubujeme 10 – 15 minut při 37 °C.
 - centrifugujeme při 1000 ot., cca 30 sec, opatrně odsajeme supernatant, k sedimentu erytrocytů na dně eppendorfky přidáme 180 μ l fyziologického roztoku, opět centrifugujeme a odsajeme, celkem 3 x, čímž ze suspenze erytrocytů důkladně vymyjeme bromelin. Po posledním promytí přidáme 180 μ l fyz. roztoku a tímto máme připravenou 3% suspenzi natrávených erytrocytů.
4. připravíme si zkumavky s protilátkami, ve kterých budeme provádět aglutinaci.
 Protilátky anti A, anti B ředíme geometrickou řadou 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256
 Lektin ředíme 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

celkem připravíme 2 sady po 15 aglutinačních zkumavkách:
 anti A (5 zkumavek), anti B(5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky bez bromelinu
 anti A (5 zkumavek), anti B(5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky s bromelinem
Zkumavky značíme vždy A 1 až A 5, B 1 – B 5, H 1 – H5.

Zásobní roztoky pro anti A, anti B i lektin (anti H) jsou již připraveny,
 způsob ředění protilátek pro krvinky s bromelinem i bez bromelinu je stejný.

Anti A	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Anti B	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Lektin	1	2	3	4	5
Ředění	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Pipetovat	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+

200 μ l 200 μ l 200 μ l 200 μ l
fyz. r. fyz. r. fyz. r. fyz.r.

Z 5. zkumavky vždy odebereme 200 μ l, aby objem byl ve všech zkumavkách stejný a to 200 μ l,

5. do takto naředěných protilátek přidáme vždy po 20 μ l příslušné erytrocytární suspenze: do prvních tří řad bez bromelinu, do druhých tří řad s bromelinem. Pořádně promíchat !!!!!

Dáváme erytrocyty A do anti A, B do anti B, 0 do lektinu (anti H)

6. zkumavky inkubujeme 10 minut při 37 °C, poté centrifugujeme půl minuty při 1000 ot. Po lehkém protřepání odečítáme aglutinaci. Zde třepat velmi citlivě a hlavně stejně ve všech zkumavkách – zajímá nás, zda aglutinace „drží“ či nikoli.

Hodnocení

Vyhodnotíme citlivost reakce, tj. uvedeme při kterém ředění byla reakce ještě pozitivní.

Výstup

Zhodnotíme vliv bromelinu na citlivost reakce srovnáním míry aglutinace erytrocytů ovlivněných bromelinem s aglutinací neovlivněných erytrocytů.