



# Aglutinační metody

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

# Aglutinační metody

## **Aglutinace = shlukování**

- Sérologické
- Reakce protilátky s korpuskulárním antigenem (x precipitace)
- **Hemaglutinace**
- Důležitou roli má vzájemný poměr reagujících složek
- Hodnocení vizuálně tzv. na čtyři křížky
- Průkaz antigenů erytrocytů a celé řady bakteriálních antigenů



## VII. Úloha – Stanovení antigenů krevních skupin za použití bromelinu

# Princip

- Antigeny krevního systému AB0 jsou molekuly glykoproteinů vázané v membránách erytrocytů
- Podstatou sérologického stanovení těchto antigenů je **aglutinace – shlukování** erytrocytů
- **Bromelin** je proteolytický enzym z ananasu používaný pro usnadnění aglutinace erytrocytů
  - redukuje negativní náboj na povrchu erytrocytů a odštěpuje určité polypeptidové řetězce, které vyčnívají z membrány erytrocytů

# Chemikálie a roztoky

- 3% **suspenze erytrocytů krevních skupin A, B, 0** ve fyziologickém roztoku
- fyziologický roztok pro červené krvinky – 0,85% NaCl
- 0,5% **bromelin**
- zásobní roztok **protilátky anti A, anti B** (budou připraveny v ředění 1:16) a **lektinu** (anti H; bude připraven v ředění 1:2)

# Postup

1. Připravíme si 3% suspenze erytrocytů hydrolyzovaných (natrávených) **bromelinem**.
  - do tří eppendorfek s **20  $\mu$ l 0,5% bromelinu** přidáme **180  $\mu$ l** zásobní erytrocytární suspenze krevní skupiny **A, B a 0**
  - inkubujeme 10 – **15 minut při 37 °C**
  - centrifugujeme při **1000 rpm cca 30 s**
  - opatrně odsajeme supernatant a k sedimentu erytrocytů na dně eppendorfky přidáme **180  $\mu$ l fyziologického roztoku**
  - opět centrifugujeme a odsajeme – celkem 3x, čímž ze suspenze erytrocytů důkladně **vymyjeme bromelin**
  - po posledním promytí přidáme 180  $\mu$ l fyziologického roztoku a tímto máme připravenou 3% suspenzi natrávených erytrocytů

# Postup

2. Připravíme si zkumavky s protilátkami, ve kterých budeme provádět aglutinaci. *Protilátky **anti A** 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 si tedy připravíme **2 sady** (jedna bez a jedna s bromelinem) **po 15 aglutinačních zkumavkách:***
  - anti A (5 zkumavek), anti B (5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky bez bromelinu
  - to samé pro krvinky s bromelinem
  - *Zkumavky značíme vždy **A 1 až A 5, B 1 – B 5, H 1 – H5; jednotlivé sady **bez a s** bromelinem pak -/+.***

# Postup

Anti A/B	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 $\mu$ l zás. r.	200 $\mu$ l zás. r.	200 $\mu$ l r. 2	200 $\mu$ l r. 3	200 $\mu$ l r. 4
		+	+	+	+
		200 $\mu$ l fyz. r.	200 $\mu$ l fyz. r.	200 $\mu$ l fyz. r.	200 $\mu$ l fyz. r.

Lektin	1	2	3	4	5
Ředění	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Pipetovat	200 $\mu$ l zás. r.	200 $\mu$ l zás. r.	200 $\mu$ l r. 2	200 $\mu$ l r. 3	200 $\mu$ l r. 4
		+	+	+	+
		200 $\mu$ l fyz. r.	200 $\mu$ l fyz. r.	200 $\mu$ l fyz. r.	200 $\mu$ l fyz. r.

*Z páté zkumavky vždy odebereme 200  $\mu$ l, aby objem byl ve všech zkumavkách stejný a to 200  $\mu$ l.*



# Postup

3. Do naředěných protilátek přidáme vždy po 20  $\mu$ l příslušné erytrocytární suspenze. **Dáváme erytrocyty A do anti A, B do anti B, 0 do lektinu (anti H).** Do prvních tří řad (A, B, 0) přidáváme erytrocyty bez bromelinu, do druhých tří (A, B, 0) s bromelinem. *Pořádně promíchat!!!*
4. Zkumavky inkubujeme 10 min při 37 °C a poté centrifugujeme 30 s při 1000 rpm. 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. 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

# Výstup

**Tabulka** hodnocení na čtyři křížky pro jednotlivé skupiny a reakce s a bez bromelinu.

Zhodnoťte vliv bromelinu na citlivost reakce srovnáním míry aglutinace erytrocytů ošetřených bromelinem s aglutinací neovlivněných erytrocytů.