

1 Aglutinační metody

Aglutinace (shlukování) patří k nejstarším sérologickým metodám. Její 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 F_{ab} fragmenty protilátek. Nejlépe aglutinují protilátky IgM vytvářející pentamery. 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, z nichž 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, pouze 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, které 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 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.

Podobný princip jako při aglutinaci se uplatňuje také při **precipitaci**. 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 6: Stanovení antigenů krevních skupin za použití bromelinu

Princip

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 **aglutinát**. Reakci hodnotíme jako pozitivní, když je shluk krvinek 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 používaný pro ošetření erytrocytů před použitím 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 navíc odštěpují určité polypeptidové řetězce, které vyčnívají z membrány erytrocytů. Oba tyto procesy vedou ke vzájemnému přiblížení erytrocytů, což usnadňuje aglutinaci prostřednictvím protilátek. Aglutinace by se tedy měla projevovat i při větším zředění protilátek než u krvinek neošetřených bromelinem.

Pomůcky

Pracujeme v rukavicích!!! Dbáme na pečlivé značení všech zkumavek – označíme krevní skupinu i číslo zkumavky (ředění). Pro potřeby inkubace je nutno zkumavky navíc popisovat také značkou své pracovní skupiny.

- 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)
- polystyrenové zkumavky

Postup

1. Připravíme si 3% suspenze erytrocytů hydrolyzovaných (natrávených) bromelinem.
 - do tří eppendorfek s 20 μ l 0,5% bromelinu přidáme 180 μ 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 μ l fyziologického roztoku
 - opět centrifugujeme a odsajeme – celkem 3x, čímž ze suspenze erytrocytů důkladně vymyjeme bromelin
 - po posledním promytí přidáme 180 μ l fyziologického roztoku a tímto máme připravenou 3% suspenzi natrávených erytrocytů.
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
 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 zás. r.	200 μ l zás. r.	200 μ l r. 2	200 μ l r. 3	200 μ l r. 4
		+	+	+	+
		200 μ l fyz. r.	200 μ l fyz. r.	200 μ l fyz. r.	200 μ l fyz. r.

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

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

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

- Do naředěných protilátek přidáme vždy po 20 μ l příslušné erytrocytární suspenze. **Dáváme erythrocyty A do anti A, B do anti B, 0 do lektinu (anti H).** Do prvních tří řad (A, B, 0) přidáváme erythrocyty bez bromelinu, do druhých tří (A, B, 0) s bromelinem. Pořádně promíchat!!!
- 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 roztrpát až na původní erythrocytární suspenzi

Výstup

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