

Protokol

Vyšetření slin na přítomnost antigenů krevních skupin

Teorie: Antigeny systému ABO (H) se v lidském organismu vyskytují ve dvou formách: První – v alkoholu rozpustné Ag jsou vázány na membrány téměř všech buněk těla, včetně erytrocytů; druhou – tvoří metabolický produkt první skupiny-ve vodě rozpustné Ag přítomné přibližně u 77% lidské populace. Metabolická přeměna je řízena geny *Se/se*, zcela nezávislými na genech ABO určujících příslušnost ke krevní skupině. Dominantně recesivní kombinace *se/se* zajistí dokonalý rozklad vázaných Ag a tedy nepřítomnosti Ag v tělních tekutinách. Tito jedinci se označují jako nevylučovatelé (nonsekretoři). Jedinci s dominantní alelou *Se* v genotypu mají Ag přítomny v tělních tekutinách a označují se vylučovatelé (sekretoři).

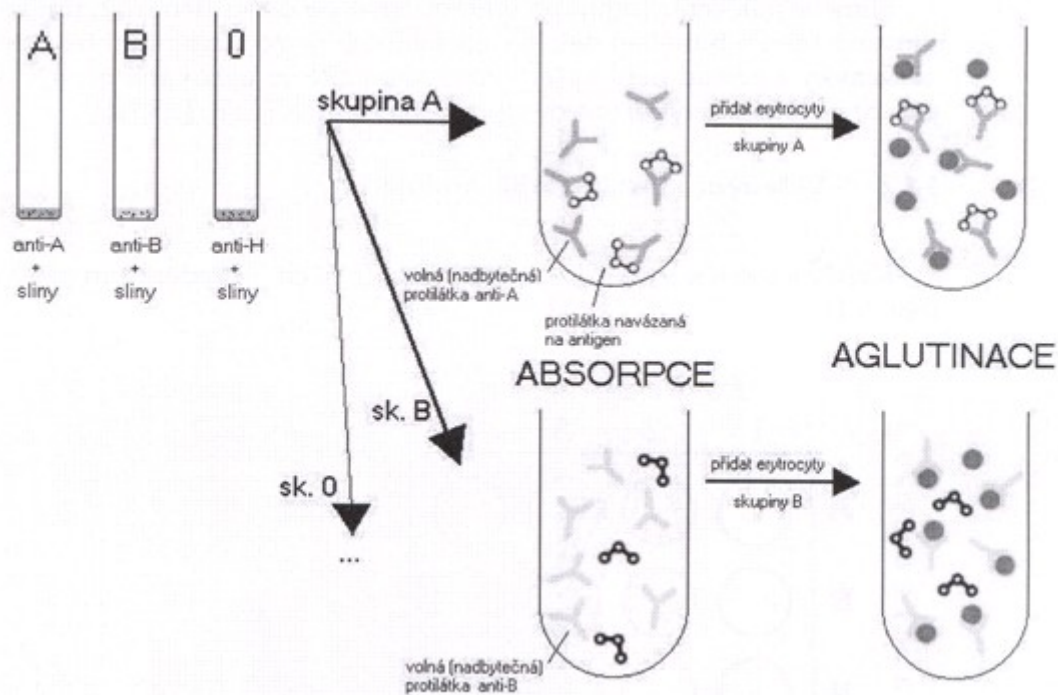
Cíl: Zhodnocení výskytu vylučovatelů a nevylučovatelů ve skupině studentů

Metoda: Adsorpčně inhibiční metoda (AI) jejímž principem je **inhibice hemaglutinace**, je založena na vysycení vazeb míst na Ag přítomných ve slinách přidaným aglutinačním sérem vhodného titru a následným stanovením množství nenavázaných Ab přidáním určitého množství (20μl) 5% suspenze odpovídajících erytrocytů. Intenzita aglutinace je nepřímo úměrná množství skupinových substancí ve slinách.

Absorpčně inhibiční metoda je složena ze dvou fází:

- 1. absorpce.** K vyšetřovanému vzorku (antigenu) se dodá známé množství protilátky, dojde k vazbě antigen-protilátka.
- 2. aglutinace.** V této fázi je zjišťována kvantita nenavázaných protilátek poklesem jejich titru. Pokles se projeví inhibicí aglutinace přidaným náplavem známých krvinek o známém objemu a koncentraci.

Použití: Hemaglutinačně inhibičního testu se hojně užívá k průkazu slabých A a B aglutinogenů a při zjišťování ABO substancí v buňkách lidských tkání, ve spermiích, na leukocytech, trombocytech a v krevních skvrnách.



Materiál:

Komerční séra (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoklonální, anti-B (IgM) monoklonální, lektin anti-H; náplav diagnostických erytrocytů A,B,O; destičky s otvory, fyziol. roztok 0,85% (0,15 mmol/l) NaCl, vodní lázeň na 100°C

Postup: Příprava sér: Jako vhodná ředění sér byla experimentálně vybrána 1:8 pro anti-A, 1:32 pro antiB a 1:2 pro lektin anti-H.

Příprava 5% suspenze (náplavu) diagnostických erytrocytů (čisté krvinky bez bílkovin plazmy a séra): připravená kapilární krev skupin A, B, O. 100 µl krve (krevní masy je oboženo v 50%) se v označených zkumavkách dvakrát promyje fyziologickým roztokem a zcentrifuguje do 1500 ot/min. Po odstranění supernatantu se přidá 900 µl fyziologického roztoku.

Bromelin hydrolyzuje peptidické vazby v membránách erytrocytů a tímto způsobem membránu „natráví“. Z fyzikálního hlediska se jedná o snížení povrchového napětí membrány. Důsledkem je zesílení některých interakcí antigen – protilátka, v našem případě by se účinkem bromelinu měla zvýšit intenzita aglutinace erytrocytů. Krvinky natrávené bromelinem by tedy měly být citlivější k působení příslušných protilátek, tj. aglutinace by se měla projevovat i při větším zředění protilátek, než tomu bude u krvinek neovlivněných bromelinem.

Postup jen pro krevní skupinu 0

1.)fyziologický roztok pro červené krvinky – 0,85% NaCl

2.) 5% suspenze erytrocytů krevních skupin A, B, O ve fyziologickém roztoku – již připraveno

3.) 5% suspenze erytrocytů hydrolyzovaných (natrávených) bromelinem – nutno připravit:

- do eppendorfk s 20 μ l 0,5% bromelinu přidáme 180 μ l erytrocytární suspenze (z bodu 2), tj. 10x zř.

- 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.

Zpracování slin: Sliny vyšetřovaných osob se zahřívají v čisté skleněné nádobce v množství asi 1 ml při teplotě 100 °C ve vodní lázni po dobu 10 minut z důvodu inaktivace enzymů, aby nedošlo k natrávení, a tím snížení množství skupinových substancí. Varem ztratí sliny svou vazkost, stanou se tekutějšími a lépe se zpracovávají. Sliny se pak centrifugují při 2000ot./min po dobu 10 minut, tím se odstraní koagulovaný hlen a buněčný detrit. Čirá tekutina se ze supernatantu pipetuje do sterilní zkumavky.

Samotný pracovní postup:

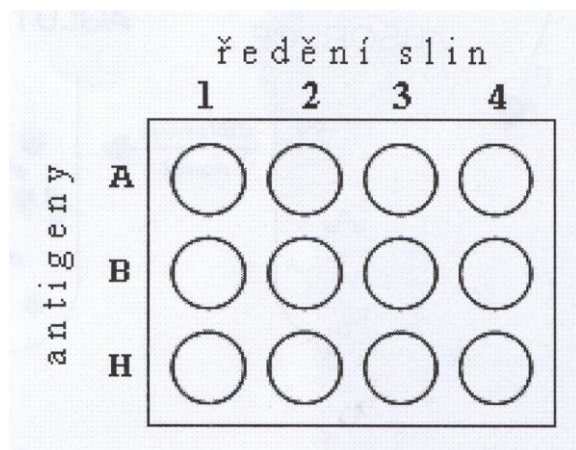
Sliny naředíme fyziologickým roztokem na základní ředění 1:100. Do první a druhé zkumavky v každé řadě (A, B, H) dáme po 30 μ l naředěných slin. Do všech zkumavek kromě prvních (tzn. do 2., 3. a 4.) pipetujeme 30 μ l fyziologického roztoku a provedeme titraci 30 μ l s ředicím koeficientem 2, tzn. obsah 2. zkumavky promícháme a přeneseme 30 μ l do 3. zkumavky, promícháme, přeneseme 30 μ l do 4. zkumavky, promícháme a odebereme 30 μ l i z této poslední zkumavky. Totéž provedeme pro řady B a H. Výsledná ředění slin ve zkumavkách jsou 1:100, 1:200, 1:400 a 1:800.

Do 4 zkumavek řady A přidáme po 20 μ l séra anti-A 1:8, do zkumavek řady B po 20 μ l séra anti-B 1:32, do zkumavek řady H po 20 μ l séra anti-H 1:2. Směs promícháme a ponecháme při laboratorní teplotě po dobu 20 minut.

Poté přidáme 20 μ l 5% suspenze erytrocytů, vždy příslušných danému séru, tzn. do zkumavek řady A erytrocyty skupiny A, do zkumavek řady B erytrocyty B, do zkumavek řady H erytrocyty O. Zkumavky jemně promícháme a necháme 10 minut odstát při laboratorní teplotě.

V jednotlivých řadách skupin A, B a H je tedy množství sér i erytrocytů konstantní, liší se pouze množství slin, a to sestupně.

Dalším krokem je centrifugace všech zkumavek při 1000 ot./min po dobu jedné minuty. Anti-A a anti-B jsou absorbovány snadno, centrifugace je dostatečná. Protilátky anti-H nereagují tak dobře, proto je třeba zkumavky řady H protřepat a znovu centrifugovat 1 minutu při 1000 ot./min.



Obr: Schéma vyšetření: pro každý antigen čtyři ředění slin

30μl slin 1:100 20μl antiA 1:8 20μl ery A 5%	30μl slin 1:200 20μl antiA 1:8 20μl ery A 5%	30μl slin 1:400 20μl antiA 1:8 20μl ery A 5%	30μl slin 1:800 20μl antiA 1:8 20μl ery A 5%
30μl slin 1:100 20μl antiB 1:32 20μl ery B 5%	30μl slin 1:200 20μl antiB 1:32 20μl ery B 5%	30μl slin 1:400 20μl antiB 1:32 20μl ery B 5%	30μl slin 1:800 20μl antiB 1:32 20μl ery B 5%
30μl slin 1:100 20μl antiH 1:2 20μl ery 0 5%	30μl slin 1:200 20μl antiH 1:2 20μl ery 0 5%	30μl slin 1:400 20μl antiH 1:2 20μl ery 0 5%	30μl slin 1:800 20μl antiH 1:2 20μl ery 0 5%

Tab.: Schematicky znázorněné obsahy 12 zkumavek při popsaném postupu vyšetření slin

Po centrifugaci jsou zkumavky připraveny k hodnocení (odečítání).

Výhodou aglutinačně inhibičního testu je, že negativní výsledek je dán přítomností aglutinace, a tudíž máme kontrolu, že jsme umístili do zkumavek sérum a erytrocyty stejné specifčnosti.

Odečítání a hodnocení výsledků: Je-li ve vyšetřovaných slinách vyšetřovaný antigen a přidané erytrocyty se neshlukují, značí to, že antigen slin vysytil diagnostický titr aglutininu a

můžeme s určitostí říci, že jde o sliny vylučovatele. Jde-li o sliny nevylučovatele, přidané krvinky jsou diagnostickým sérem aglutinovány. Při vizuálním hodnocení se zaznamená pro každou zkumavku stupeň aglutinace podle následujících pravidel

++++ kompletně shluklý kompaktní sediment

+++ sedimentované erythrocyty se po jemném poklepání na dno zkumavky rozdělí na 2-4 nepravidelné hrudky

++ sediment se rozpadne na víc drobných částí

+ sediment zůstane po poklepání na dno zkumavky ve tvaru jemně zrnitého písku

- negativní reakce, sedimentované erythrocyty se volně zvíří ve fyziologickém roztok

Průběh reakce:

$Ag(\text{sliny})+Ab+Ag(\text{ery}) = Ag-Ab+Ag-Ab$ pokud je člověk vylučovatel, výsledkem je náplava červených krvinek, slabá nebo žádná aglutinace

$Ab+Ag(\text{ery}) \rightarrow Ab-Ag =$ pokud je člověk nevylučovatel, Ab reagují jen s erythrocyty a vznikne aglutinace silná