

PROTOKOL Z ...

Téma	VYŠETŘENÍ SLIN NA PŘÍTOMNOST ANTIGENŮ KREVNÍCH SKUPIN
Jméno	
Datum	

TEORIE

Antigeny (Ag) 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. Kombinace recesivních alel „*se*“ zajistí dokonalý rozklad vázaných Ag a tedy nepřítomnosti Ag v tělních tekutinách. Tito jedinci se označují jako nevyučovatelé (nonsekretoři). Jedinci s dominantní alelou *Se* v genotypu mají Ag přítomny v tělních tekutinách a označují se vyučovatelé (sekretoři).

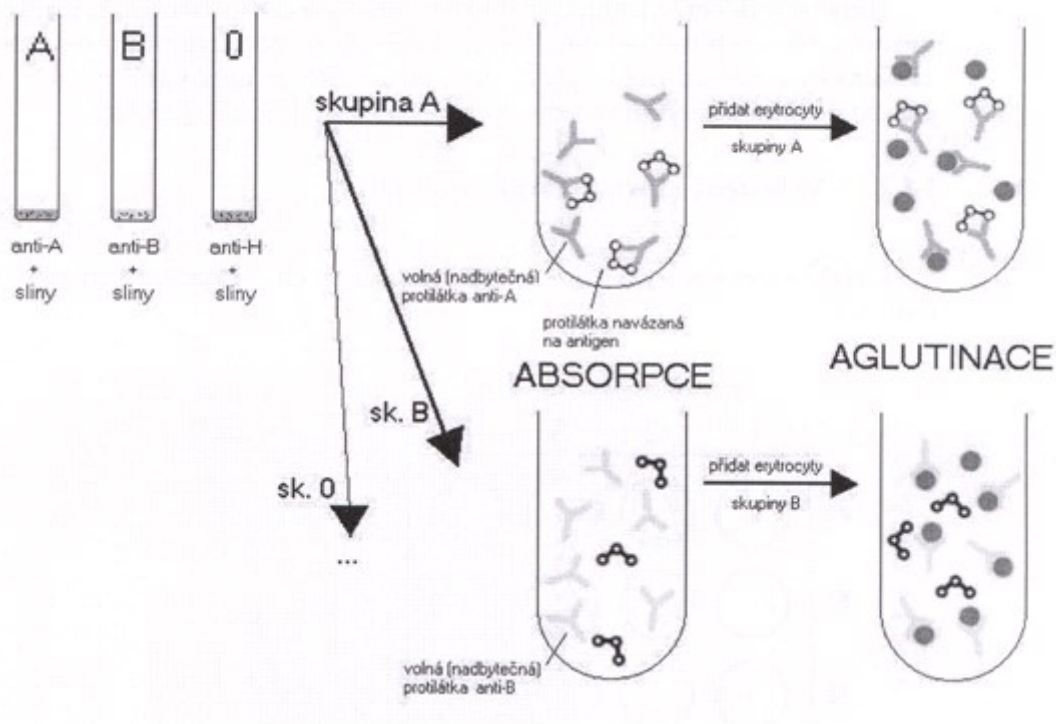
Cíl: Zhodnocení výskytu vyučovatelů a nevyučovatelů ve skupině studentů

Metoda: Absorpčně inhibiční metoda (AI), jejímž principem je **inhibice hemaglutinace**, je založena na vysycení vazebných míst na Ag přítomných ve slinách přidáním diagnostikem vhodného titru a následným stanovením množství nenavázaných Ab přidáním určitého množství 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 přidáním 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 spermích, na leukocytech, trombocytech a v krevních skvrnách.



PRAKTICKÁ ČÁST

Materiál:

Komerční diagnostika (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoklonální, anti-B (IgM) monoklonální, anti-H (monoklonální); fyziol. roztok 0,85% NaCl, náplav diagnostických erytrocytů A,B,0; bromelin (0,5%), zkumavky, pipety, špičky, stojany na zkumavky, rukavice (!!!), centrifuga, destičky k odečítání výsledků, vodní lázeň (100 °C), nádoby na odpad

Dbáme na pečlivé značení zkumavek!

Postup:

a) Ředění diagnostik: Jako vhodná ředění sér byla experimentálně vybrána 1:8 pro anti-A, 1:32 pro anti-B a 1:20 pro anti-H. Ředíme fyziologickým roztokem.

b) Příprava 3 % suspenze (náplavu) diagnostických erytrocytů (promyté krvinky bez plazmy): 60 µl periferní krve (krevní masa tvoří 50 %) v označených zkumavkách se rozsuspenduje v 940 µl fyziologického roztoku (FR), zcentrifuguje 1 min. při 1500 ot./min., supernatant odstraníme, promyjeme 970 µl FR, zcentrifuguje, supernatant odstraníme, rozsuspendujeme v 970 µl FR a uložíme v chladničce.

c) Příprava 3 % suspenze diagnostických erytrocytů ošetřených bromelinem

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.

- do zkumavek typu Eppendorf (EPP) s 20 μ l 0,5% bromelinu přidáme 180 μ l erytrocytární suspenze (viz bod b), tj. 10x zř.

- zkumavky inkubujeme 10-15 minut při 37 °C.

- centrifugujeme 1 min. při 1000 ot., opatrně odsajeme supernatant, k sedimentu erytrocytů na dně zkumavky 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.

d) Zpracování slin: Sliny vyšetřovaných osob se zahřívají v skleněné nádobce (asi 1 ml) při 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 2000 ot./min po dobu 10 min., tím se odstraní koagulovaný hlen a buněčný detrit. Čirá tekutina se ze supernatantu pipetuje do zkumavky typu EPP. Pro účely experimentu sliny ředíme v EPP zkumavce fyziologickým roztokem na základní ředění 1:100.

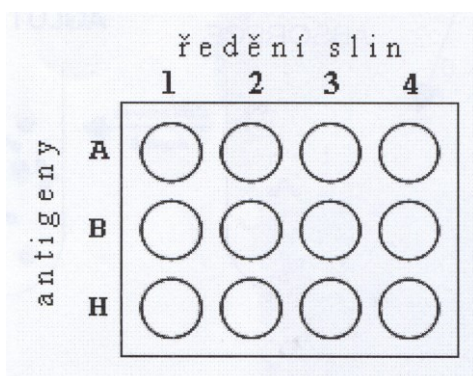
e) AI metoda: Připravíme 3 řady označených **aglutinačních zkumavek** po 4 zkumavkách.

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 FR 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. 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 diagnostika anti-A **naředěného** 1:8, do zkumavek řady B po 20 μ l diagnostika **naředěného** anti-B 1:32, do zkumavek řady H po 20 μ l diagnostika anti-H **naředěného** 1:20. Směs promícháme a ponecháme při laboratorní teplotě 20 minut, občas lehce protřepat.

Poté přidáme 20 μ l 3% 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 (**netřepat!**). Vše přehledně ilustruje tabulka níže.

Dalším krokem je centrifugace všech zkumavek při 1000 ot./min po dobu jedné minuty. Zkumavky poté dobře protřepeme a znovu centrifugujeme 1 minutu při 1000 ot./min.



Obr 1: Schéma vyšetření: pro každý antigen čtyři ředění slin, používáme aglutinační zkumavky

30μl slin 1:100 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%	30μl slin 1:200 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%	30μl slin 1:400 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%	30μl slin 1:800 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%
30μl slin 1:100 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%	30μl slin 1:200 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%	30μl slin 1:400 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%	30μl slin 1:800 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%
30μl slin 1:100 20μl antiH 1:20 20μl ery 3 %	30μl slin 1:200 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%	30μl slin 1:400 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%	30μl slin 1:800 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%

Tab. 1: Schematicky znázorněné obsahy 12 zkumavek při popsáném postupu vyšetření slin

Po centrifugaci jsou zkumavky připraveny k hodnocení - obsah zkumavek vyléváme na destičky.

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.

f) 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 erytrocyty 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 erytrocyty se volně zvíří ve fyziologickém roztok