



# **Vyšetření slin na přítomnost antigenů krevních skupin, stanovení statusu sekretora**

**Helena Nejezchlebová (helanej@sci.muni.cz)**

**Alena Žáková**

**Ústav experimentální biologie PŘF MU**

# Cíle cvičení

- **student si zopakuje/naučí se základní informace o krevním systému AB0**
- **student prakticky provede stanovení antigenů krevního systému AB0 na biologickém materiálu a určí status sekretora**
- **studenti zhodnotí výskyt sekretorů (vylučovatelů) a neseekretorů (nevylučovatelů) ve skupině studentů**

# Teorie

Antigeny systému AB0 (H) se v lidském organismu vyskytují ve dvou formách:

- a) Ag jsou vázány na membrány téměř všech buněk těla, včetně erytrocytů;
- b) tvoří metabolický produkt první skupiny: ve vodě (tělních tekutinách) rozpustné Ag přítomné přibližně u 77% lidské populace.

Metabolická přeměna je řízena geny *Se/se*, zcela nezávislými na genech AB0 určujících příslušnost ke krevní skupině.

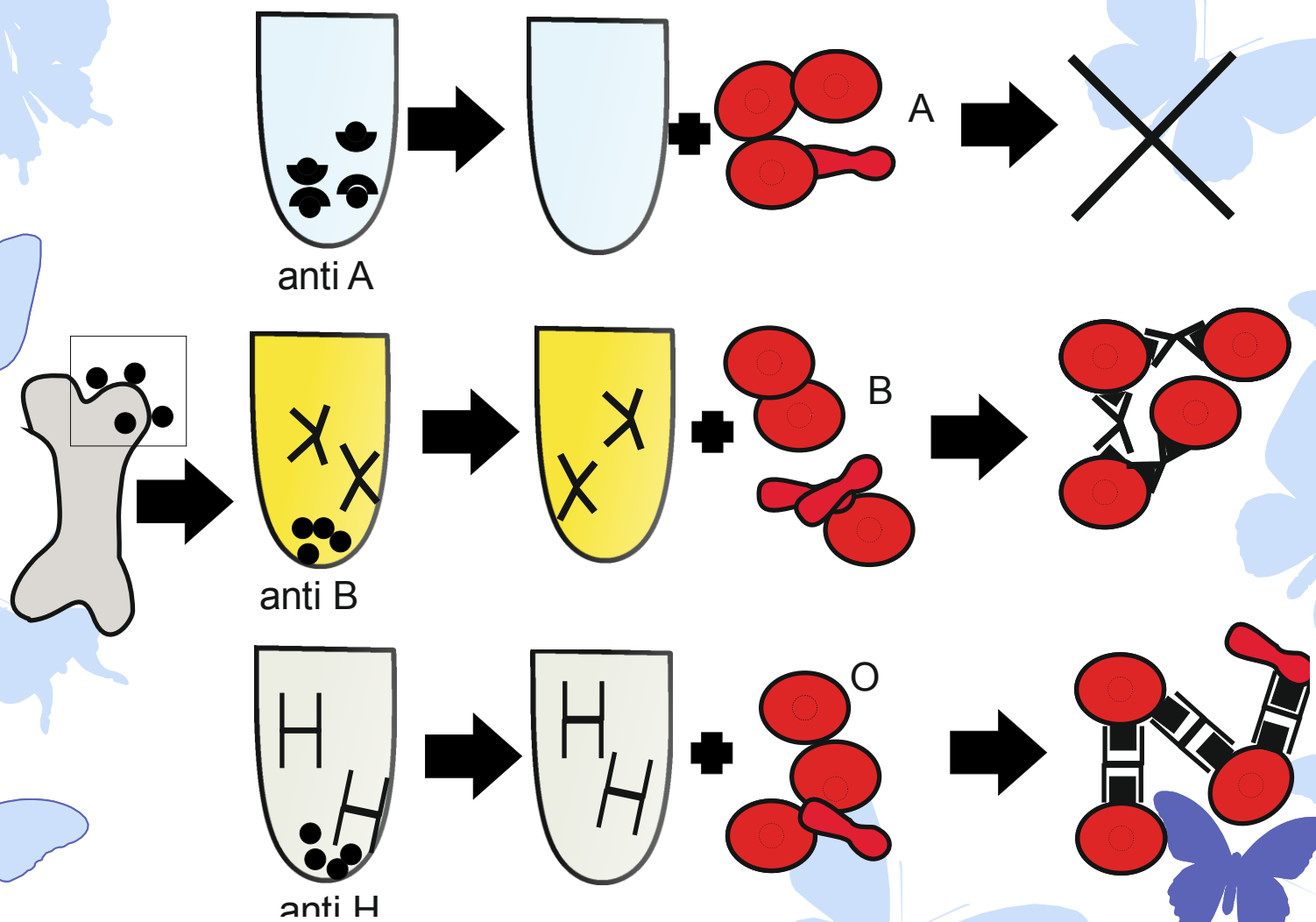
Kombinace alel *sese* zajistí dokonalý rozklad vázaných Ag a tedy nepřítomnosti Ag v tělních tekutinách. Tito jedinci se označují jako nevylučovatelé (nonsekretoři).

Jedinci s dominantní alelou *Se* v genotypu mají Ag přítomny v tělních tekutinách a označují se vylučovatelé (sekretoři).

# Metodika adsorpčně inhibiční metoda (AI)

- založená na **inhibice hemaglutinace**
- vysycení vazebných míst na Ag ve slinách přidáním Ab/diagnostika vhodného titru a následné stanovení množství nenavázaných Ab přidáním suspenze odpovídajících erytrocytů. Intenzita aglutinace je nepřímo úměrná množství skupinových substancí ve slinách.
- AI má 2 fáze:
  - **1. absorpce:** k vyšetřovanému vzorku (antigenu) se dodá známé množství Ab, dojde k vazbě Ab-Ag.
  - **2. aglutinace:** v této fázi je zjišťována kvantita nenavázaných Ab 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 AB0 antigenů v buňkách lidských tkání (i např. u historického kostního materiálu), ve spermiích, na leukocytech, trombocytech a v krevních skvrnách.

# Adsorpčně inhibiční metoda: principem je **inhibice hemaglutinace**



# Materiál, postup

- monoklonální diagnostika (EXBIO Olomouc): anti-A (IgM, 1:8), anti-B (IgM, 1:32), anti H (IgM, 1:20)
- 5% suspenze diagnostických erytrocytů A,B,O ve FR; v případě stanovení KS 0 upravených bromelinem
- FR 0,85% (0,15 mmol/l) NaCl
- vodní lázeň na 100 °C, centrifuga, zkumavky (typu EPPENDORF = EPP, aglutinační = AGLU), **rukavice!**, destičky pro odečítání výsledků, ...

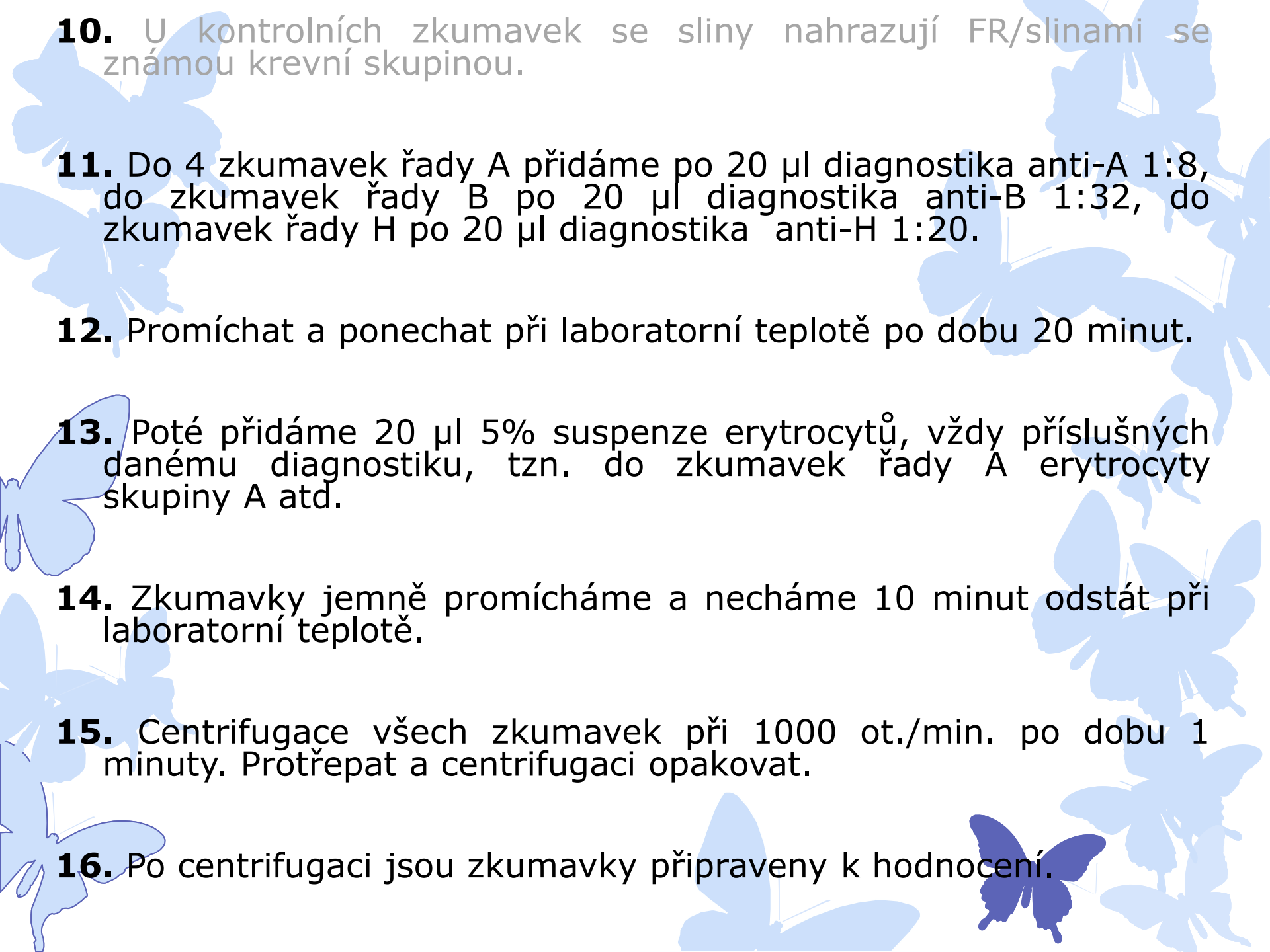
## ○ Zpracování slin:

**1.** Sliny ve skleněné zkumavce (asi 2 ml) **zahřejeme** 10 minut ve vodní lázni při 100 °C (inaktivace enzymů, aby nedošlo k natrávení, a tím snížení množství skupinových substancí. Varem ztratí sliny svou vazkost, stávají se tekutějšími a lépe se zpracovávají)

**2. Centrifugace** slin při 2000 ot./min po dobu 5 minut (tím se odstraní koagulovaný hlen a buněčný detrit, EPP).

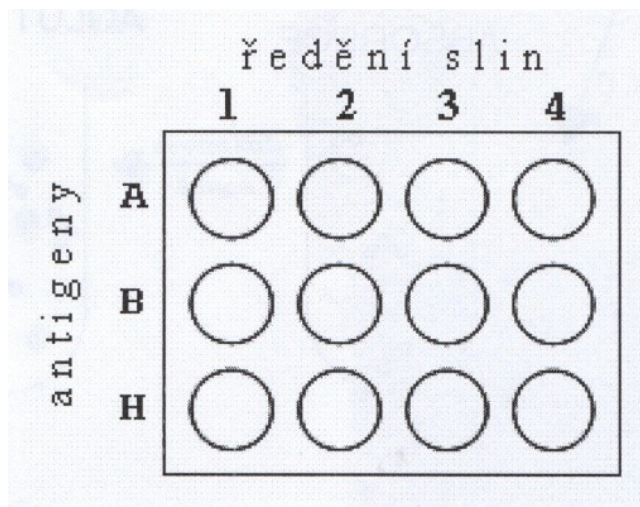
**3.** Čirá tekutina se ze supernatantu **pipetuje** do zkumavky (EPP).

- 4.** Sliny naředíme fyziologickým roztokem 1:100 (EPP).
- 5.** Připravíme 3 řady AGLU zkumavek (A, B, H) po 4 zkumavkách.
- 6.** Do první a druhé zkumavky v každé řadě dáme po 30  $\mu$ l naředěných slin.
- 7.** Do všech zkumavek kromě prvních (tzn. do 2., 3. a 4.) pipetujeme 30  $\mu$ l FR.
- 8.** V řadě A provedeme titraci 30  $\mu$ l s ředícím koeficientem 2:
  - a)** obsah 2. zkumavky promícháme, přeneseme 30  $\mu$ l do 3. zkumavky, promícháme,
  - b)** přeneseme 30  $\mu$ l do 4. zkumavky, promícháme a odebereme 30  $\mu$ l i z této poslední zkumavky.
- 9.** Totéž provedeme pro řady B a H. Výsledná ředění slin ve zkumavkách jsou 1:100, 1:200, 1:400 a 1:800.

- 
- 10.** U kontrolních zkumavek se sliny nahrazují FR/slinami se známou krevní skupinou.
- 11.** Do 4 zkumavek řady A přidáme po 20  $\mu$ l diagnostika anti-A 1:8, do zkumavek řady B po 20  $\mu$ l diagnostika anti-B 1:32, do zkumavek řady H po 20  $\mu$ l diagnostika anti-H 1:20.
- 12.** Promíchat a ponechat při laboratorní teplotě po dobu 20 minut.
- 13.** Poté přidáme 20  $\mu$ l 5% suspenze erytrocytů, vždy příslušných danému diagnostiku, tzn. do zkumavek řady A erytrocyty skupiny A atd.
- 14.** Zkumavky jemně promícháme a necháme 10 minut odstát při laboratorní teplotě.
- 15.** Centrifugace všech zkumavek při 1000 ot./min. po dobu 1 minuty. Protřepat a centrifugaci opakovat.
- 16.** Po centrifugaci jsou zkumavky připraveny k hodnocení.



# Schéma vyšetření: pro každý antigen 4 ředění slin



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

# Hodnocení výsledků

- Výhodou AI testu je, že **negativní výsledek je dán přítomností aglutinace**, a tudíž máme kontrolu, že jsme umístili do zkumavek sérum a erythrocyty stejné specifčnosti.
- Je-li ve vyšetřovaných slinách vyšetřovaný antigen a přidané **erythrocyty se neshlukují**, značí to, že antigen slin vysytil diagnostický titr aglutininu → jde o sliny **vylučovatele**.
- Jde-li o sliny **nevylučovatele**, přidané krvinky jsou diagnostikem **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 roztoku