

Metoda: Sklíčková aglutinace u salmonel

Kristen Vopálková, ZL2

Školitel: Mgr. Monika Kohoutová

Ústav mikrobiologie FN Plzeň

Princip metody a její úskalí:

Sklíčková aglutinace je sérotypizační metoda, která nám pomáhá stanovit konkrétní antigenní složení stěny neznámého mikroba a tím ho podle schémat druhově či kmenově určit. Sérotypizace je nedílnou součástí charakteristiky salmonel. Je založena na reakci kmene s antisérou a vyhodnocení dle Kauffmann-White-Le Minor schématu. Vzhledem k tomu, že rod *Salmonella* zahrnuje 2579 sérotypů, může být někdy jejich typizace obtížná. Pokud je sérotypizováno velké množství kmenů, pak je tato metoda poměrně zdlouhavá a může být nevýhodou pro subjektivní hodnocení výsledku reakce.

Každý sérotyp *Salmonelly* má jedinečnou kombinaci O (polysacharidové tělové) a H (proteinové bičíkové) antigenních determinantů. Diagnostická laboratoř tyto antigenní znaky určuje u každého zachyceného kmene salmonely. Při confirmaci salmonel využívají běžné laboratoře obvykle pouze polyvalentní antiséra, díky velkému množství sérotypů salmonel jen pro běžně se vyskytující sérotypy. Pokud se nepodaří kmen aglutinovat těmito základními séry, kmen se zasílá k určení do Národní referenční laboratoře. Některé komerční latex-aglutinační soupravy umožňují nejen screening, ale i presumptivní identifikaci suspektních izolátů.

Uplatnění metody (změny při patologických stavech):

Aglutinační testy se řadí do skupin sérologických metod, které mají největší využití při sérologické confirmaci bakterií. Aglutinace je *in vitro* reakce antigenu se specifickou protilátkou, která se makroskopicky projevuje viditelným shlukováním. Reakce je obvykle velmi rychlá, vykazuje vysokou afinitu. Takto vzniklý aglutinát se nerozpadá.

Již řadu let se aglutinační testy využívají v klinické diagnostice infekcí či při sérologické klasifikaci bakterií a to především při sérotypizaci kmenů *Salmonella*. Pomocí MALDI-TOF, fungující na bázi hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem se určí *Salmonella* pouze rodově, kmenově ji nelze dourčit.

Aglutinační testy se také používají k určení povrchových antigenů většiny lékařsky důležitých bakterií, které dosahují diagnosticky významného polymorfismu (streptokoky, stafylokoky, hemofily a mnoho dalších). V potravinářské mikrobiologii je důraz kladen především na rychlou confirmaci suspektních izolátů.

Potřebné přístrojové vybavení:

Metoda se provádí pomocí specifických, komerčně vyráběných, zvířecích sér na mikroskopických podložních sklíčkách. Séra jsou získávána z krve králíků imonizovaných příslušnými antigeny. Běžně zvolí směsné sérum s protilátkami proti determinantům na nejčastěji se vyskytující sérotypy v daném místě či oblasti.

Při vzniku pozitivního výsledku, kdy je shoda sérotypu kmene s příslušným sérem, se projeví vznikem aglutinátu. K této metodě je potřeba podložní sklíčko, na které kápneme kapku protilátek

proti O antigenu a na druhé sklíčko protilátky proti H antigenu. V kapce rozmícháme pomocí bakteriologické kličky čistou kolonii mikroba sebranou z pevné kultivační půdy, až vznikne homogenní suspenze. Poté se kývavým pohybem snažíme vyvolat aglutinaci, kterou odečítáme proti tmavému pozadí, aby aglutinace byla dobře odlišená. Aglutinace se musí objevit do jedné minuty. Pokud se bakteriální buňky seskupují do více či méně oddělených shluků, tím se kompletuje známý antigen mikroba se známou protilátkou, toto je považováno za pozitivní průkaz.

Podmínky odběru a transportu materiálu:

U této metody se nejčastěji odebírá vzorek z rekta, ale například u salmonel ji lze diagnostikovat také z moči, hnisu nebo krve. Odběr z rekta se provádí odběrovým tamponem, který se zasune cca 5 cm do rekta. Poté se odběrový tampon vloží do transportní půdy. Transportní půdy simulují přirozené prostředí bakterií. Vzorky stolice se musí do laboratoře dopravit a zpracovat co nejdříve. Mnohé důležité patogeny (shigelly) nemusí takto přežít změny pH, k nimž dochází u vzorků stolice, pokud nejsou ihned dopraveny do laboratoře, a to dokonce i při zmrazení. Po dopravě do laboratoře se vzorek inokuluje na kultivační půdy.