

OBSAH

1.	ZÁSADY BEZPEČNOSTI PRÁCE V MIKROBIOLOGICKÉ LABORATOŘI	8
1.1.	Pracovníci	8
1.2.	Hygiena práce v laboratoři	8
2.	MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ	9
2.1.	Základní požadavky	9
2.2.	Základní terminologie	10
2.3.	Provozní místnosti	11
2.4.	Zásady aseptické práce	11
2.5.	Přístrojové vybavení	12
2.6.	Laboratorní pomůcky	13
2.7.	Sterilizační zařízení	14
2.7.1.	Autokláv	14
2.7.2.	Kochův parní sterilizátor	15
2.7.3.	Horkovzdušný sterilizátor	15
2.7.4.	Sterilizační filtry	15
2.7.5.	UV sterilizační lampa (germicidní zářivka)	15
3.	KULTIVAČNÍ MÉDIA	16
3.1.	Druhy kultivačních pūd	16
3.1.1.	Dělení kultivačních pūd podle konzistence	16
3.1.2.	Dělení kultivačních pūd podle složení	16
3.1.3.	Dělení kultivačních pūd podle účelu použití	17
3.2.	Příprava hotových dehydratovaných živných pūd	18
3.2.1.	Postup přípravy živných pūd	18
3.2.1.1.	Sterilizace pūd	18
3.2.2.	Rozlévání pūd a jejich uchovávání	19
4.	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	21
4.1.	Očkování	21
4.1.1.	Kvantitativní metody	21
4.1.1.1.	Očkování zaléváním do tuhých agarových pūd – metoda zalití	21
4.1.1.2.	Očkování roztěrem na povrch tuhých agarových pūd – metoda roztěru	22
4.1.1.3.	Očkování do tekutých pūd – metoda MPN	22
4.1.2.	Kvalitativní metody	22
4.1.2.1.	Jednostupňová kultivace	22
4.1.2.2.	Dvoustupňová kultivace	23
4.1.2.3.	Rozočkování	23
4.2.	Inkubace	24
4.2.1.	Teplota	24
4.2.2.	Vztah ke kyslíku	24
4.2.2.1.	Aerobní kultivace	24
4.2.2.2.	Anaerobní a mikroaerofilní kultivace	24
4.2.3.	Relativní vlhkost	25
4.2.4.	Doba kultivace	25
4.3.	Uchovávání a oživování mikrobiálních kultur	25
4.3.1.	Uchovávání na šikmých agarech	25
4.3.2.	Lyofilizace	26
4.3.3.	Uchovávání v zmrazeném stavu	26

5.	ZÁKLADY MIKROSKOPIE	27
5.1.	Základní principy	27
5.2.	Druhy mikroskopie	28
5.3.	Světelný mikroskop	29
5.3.1.	Objektiv	29
5.3.2.	Okulár	30
5.3.3.	Kondenzor	30
6.	MORFOLOGIE MIKROORGANISMŮ	31
6.1.	Makroskopické metody	31
6.1.1.	Růst mikroorganismů v tekutém médiu	31
6.1.2.	Vzhled kolonií na pevné půdě	31
6.2.	Mikroskopické metody	32
6.2.1.	Kvantitativní stanovení bakterií	32
6.2.1.1.	Zhotovení preparátu	32
6.2.1.2.	Barvení preparátu	32
6.2.1.3.	Odečítání výsledků	33
6.2.1.4.	Výpočet konstanty mikroskopu	33
6.2.1.5.	Výpočet počtu mikroorganismů	33
6.2.1.6.	Spolehlivost zkoušky	34
6.2.2.	Kvalitativní stanovení bakterií	34
6.2.2.1.	Morfologie bakteriálních buněk	34
6.2.2.2.	Zhotovení preparátu	35
6.2.2.3.	Barvení preparátu	35
6.2.3.	Vybrané barvicí postupy	35
6.2.3.1.	Barvení podle Grama	35
6.2.3.2.	Barvení spor	36
6.2.3.3.	Barvení pouzder	36
6.2.3.4.	Acidorezistentní barvení podle Ziehl-Neelsena	37
6.2.3.5.	Negativní barvení pro mikrometrii	37
6.2.4.	Měření velikosti mikroorganismů – mikrometrie	37
7.	FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ	38
7.1.	Stanovení pohyblivosti mikroorganismů	38
7.2.	Vztah mikroorganismů k volnému O₂	38
7.2.1.	Kultivace v anaerobním agaru s resazurinem	38
7.2.2.	Oxidačně-fermentační test (O-F test)	39
7.3.	Růstové schopnosti mikroorganismů	39
8.	BIOCHEMICKÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ	40
8.1.	Základní testované biochemické vlastnosti	40
8.1.1.	Průkaz tvorby sirovodíku	40
8.1.2.	Test na průkaz katalasy	40
8.1.3.	Průkaz tvorby indolu	40
8.1.4.	Průkaz oxidasy a cytochromoxidasy	41
8.1.5.	Testy zkvašování různých druhů cukrů – průkaz glykosidas	41
8.1.6.	TSI agar (Triple Sugar Iron agar, Hajnův agar)	41
8.1.7.	ONPG-test - průkaz β -galaktosidasy	41
8.1.8.	Test na přítomnost ureasy	42
8.1.9.	Test na redukci nitrátů	42
8.1.10.	Voges-Proskauerův test (VP test)	42
8.1.11.	Průkaz dekarboxylace lyzinu a ornitinu	42

8.2.	Standardizované testovací systémy	42
8.3.	Automatizované identifikační systémy	43
8.4.	Průkaz hemolyzinů – hemolytická činnost mikroorganismů	43
8.5.	Průkaz volné a vázané koagulasy	44
8.5.1.	Průkaz přítomnosti vázané koagulasy	44
8.5.2.	Průkaz přítomnosti volné koagulasy	44
9.	IMUNOLOGICKÉ METODY	45
9.1.	Serologické metody	45
9.1.1.	Aglutinační reakce	45
9.1.1.1.	Základní typy aglutinačních reakcí	45
9.1.2.	Precipitační reakce	46
9.2.	Imunochromatografické metody	46
9.3.	Imunochemické metody	47
9.3.1.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	47
9.3.2.	ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay)	48
9.4.	Imunomagnetická separace	49
10.	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM	50
10.1.	Metody stanovení citlivosti k AML	50
10.1.1.	Semikvantitativní metody	50
10.1.2.	Kvantitativní metody	50
10.1.3.	Kultivační půdy pro stanovení citlivosti	50
10.1.4.	Inokulum	51
10.2.	Disková difuzní metoda	51
10.2.1.	Provedení diskové difuzní metody	51
10.3.	Agarová diluční metoda	52
10.4.	Diluční mikrometoda	53
10.5.	Etest	53
11.	METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE	54
11.1.	Polymerázová řetězová reakce	54
11.1.1.	Princip metody PCR	54
11.1.2.	Základní pojmy	55
11.1.3.	Provedení metody PCR	56
11.1.3.1.	Izolace templátové DNA	56
11.1.3.2.	Příprava PCR reakční směsi	57
11.1.3.3.	System kontrol PCR reakce	57
11.1.4.	Horizontální gelová elektroforéza	57
11.1.4.1.	Příprava agarózového gelu	57
11.1.4.2.	Elektroforéza	58
11.1.5.	Vyhodnocení PCR	58
11.1.6.	Vybrané modifikace metody PCR	59
11.1.7.	Využití metody PCR v mikrobiologii potravin	59
11.2.	Pulzní gelová elektroforéza	60
11.2.1.	Provedení PFGE	60
12.	STANOVENÍ BAKTERIÁLNÍCH TOXINŮ	61
12.1.	Stanovení toxinů <i>Staphylococcus aureus</i>	61
12.1.1.	Přímé metody	62
12.1.1.1.	Reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA)	62
12.1.1.2.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	62

12.1.1.3. Imunofluorescenční metoda ELFA	62
12.1.2. Nepřímé metody	63
12.2. Stanovení toxinů <i>Bacillus cereus</i>	63
12.2.1. Přímé metody	63
12.2.2. Nepřímé metody	63
12.3. Stanovení toxinů <i>Clostridium botulinum</i>	64
12.4. Stanovení Shigatoxinů <i>Escherichia coli</i>	64
12.5. Stanovení toxinů <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	64
13. PŘÍLOHY	65
13.1. Morfologie mikroorganismů	65
13.1.1. Barvení podle Grama	65
13.1.1.1. Princip metody	65
13.1.1.2. Pracovní postup	65
13.1.1.3. Vyhodnocení	65
13.2. Biologické vlastnosti mikroorganismů	66
13.2.1. Stanovení pohyblivosti mikroorganismů	66
13.2.1.1. Princip metody	66
13.2.1.2. Pracovní postup	66
13.2.1.3. Vyhodnocení	66
13.3. Biochemické identifikační testy	66
13.3.1. Průkaz přítomnosti katalasy	66
13.3.1.1. Princip metody	66
13.3.1.2. Pracovní postup	66
13.3.1.3. Vyhodnocení	66
13.3.2. Průkaz glykosidas	67
13.3.2.1. Princip metody	67
13.3.2.2. Pracovní postup	67
13.3.2.3. Vyhodnocení	67
13.3.3. Růst na TSI agaru	67
13.3.3.1. Princip metody	67
13.3.3.2. Pracovní postup	67
13.3.3.3. Vyhodnocení	67
13.3.4. Průkaz přítomnosti cytochromoxidasy (OXI test)	68
13.3.4.1. Princip metody	68
13.3.4.2. Pracovní postup	68
13.3.4.3. Vyhodnocení	68
13.3.5. Průkaz přítomnosti β -galaktosidasy (ONPG test)	68
13.3.5.1. Princip metody	68
13.3.5.2. Pracovní postup	68
13.3.5.3. Vyhodnocení	68
13.3.6. Průkaz tvorby indolu a přítomnosti β -D-glukuronidasy (COLI test)	69
13.3.6.1. Princip metody	69
13.3.6.2. Pracovní postup	69
13.3.6.3. Vyhodnocení	69
13.3.7. Průkaz přítomnosti vázané koagulasy	69
13.3.7.1. Princip metody	69
13.3.7.2. Pracovní postup	69
13.3.7.3. Vyhodnocení	69
13.4. Imunologické metody	70
13.4.1. Rychlá sklíčková aglutinace – konfirmace <i>Salmonella</i> spp.	70

13.4.1.1.Princip metody	70
13.4.1.2.Pracovní postup	70
13.4.1.3.Vyhodnocení	70
13.4.2. Latexová aglutinace – Wellcolex [®] Colour <i>Salmonella</i> test	70
13.4.2.1.Princip metody	70
13.4.2.2.Pracovní postup	70
13.4.2.3.Vyhodnocení	70
13.4.3. Imunomagnetická separace	71
13.4.3.1.Princip metody	71
13.4.3.2.Pracovní postup	71
13.4.3.3.Vyhodnocení	71
Použitá literatura	72