

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav hygieny a technologie mléka

MIKROBIOLOGIE POTRAVIN –
PRAKTICKÁ CVIČENÍ I.
OBECNÁ MIKROBIOLOGIE

Revidované vydání

MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.
Mgr. Marta Dušková, Ph.D.
MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.

Tato skripta jsou spolufinancována z Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost:

**„Inovace bakalářského a navazujícího magisterského studijního programu v oboru Bezpečnost a
kvalita potravin“**

(reg. č. CZ.1.07/2.2.00/28.0287)

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 půd	16
3.1.1.	Dělení kultivačních půd podle konzistence	16
3.1.2.	Dělení kultivačních půd podle složení	16
3.1.3.	Dělení kultivačních půd podle účelu použití	17
3.2.	Příprava hotových dehydratovaných živných půd	18
3.2.1.	Postup přípravy živných půd	18
3.2.1.1.	Sterilizace půd	18
3.2.2.	Rozlévání půd 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 půd – metoda zalití	21
4.1.1.2.	Očkování roztěrem na povrch tuhých agarových půd – metoda roztěru	22
4.1.1.3.	Očkování do tekutých půd – 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 rezazurinem	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 hemolysinů – 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.	Systém 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

PŘEDMLUVA

Mikrobiologie potravin je na Fakultě veterinární hygieny a ekologie VFU Brno vyučována v rámci bakalářského i magisterského studijního programu. Je samozřejmé, že v obou případech jsou na studenty kladeny rozdílné nároky vyplývající z různého zaměření uvedených studijních oborů. Na druhou stranu odlišnost praktické výuky mikrobiologie potravin není natolik významná, aby vyžadovala samostatné studijní materiály, zvláště pro bakalářský a zvláště pro magisterský studijní program. Z tohoto důvodu jsme považovaly za účelnější vytvořit jednotný studijní materiál rozdělený do dvou dílů určený primárně pro bakalářský studijní program, ale využitelný i pro studenty magisterského studijního programu.

První díl – *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie* je určen především studentům bakalářského studijního programu, kteří se s mikrobiologií setkávají poprvé a je nezbytné je alespoň v krátkosti seznámit s úplnými základy. Studenti magisterského studijního programu mohou tento díl využít jako doplňkovou literaturu k osvěžení či doplnění dříve získaných znalostí. Náplní prvního dílu jsou tedy základy obecné mikrobiologie, počínaje chodem mikrobiologické laboratoře, dále problematika kultivace mikroorganismů, jejich morfologie a biologické vlastnosti, dále biochemické a imunologické metody používané při identifikaci, konfirmaci či typizaci bakterií a metody stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám. V samostatné kapitole je zpracována problematika molekulárně biologických metod, zejména polymerázové řetězové reakce, jejichž znalost je pro dnešní mikrobiologii naprostou nezbytností. Závěrečná kapitola je věnována stanovení bakteriálních toxinů. Nově byly do skript v příloze zařazeny detailní návody a protokoly pro vybraná praktická cvičení.

Závěrem bychom rády poděkovaly recenzentkám Mgr. Andree Vávrové a MVDr. Evě Klímové za jejich kritické a konstruktivní připomínky.

Autorky

1. ZÁSADY BEZPEČNOSTI PRÁCE V MIKROBIOLOGICKÉ LABORATOŘI

Práce v mikrobiologické laboratoři se řídí pravidly „Správné laboratorní praxe“ a souborem mezinárodně platných norem ČSN ISO. Jejich podstatou je zabezpečit dostatečnou ochranu zdraví pracovníků při práci a současně zabránit vnější kontaminaci vyšetřovaných vzorků.

1.1. Pracovníci

Všichni pracovníci mikrobiologické laboratoře musí být předem zaškoleni v přiměřeném rozsahu tak, aby mohli bezpečně provádět všechny pracovní operace. Při neopatrné nebo nesprávné manipulaci s mikroorganismy může dojít k infekci pracovníků nebo kontaminaci prostředí. Nebezpečí pak není vystavena pouze osoba, která porušila pravidla bezpečnosti práce, ale i ostatní pracovníci v laboratoři. Platí, že při práci s bakteriálními kulturami dodržujeme zásady aseptické práce tak, abychom zabránili rozptýlení bakterií z kultur do prostředí a se všemi kulturami pracujeme stejně opatrně jako s patogenními mikroorganismy.

1.2. Hygiena práce v laboratoři

Pro zábranu kontaminace vzorků a kultivačních půd a také rizika infekce pracovníků musí být dodržována následující pravidla:

- Přístup do laboratoře je určen jen pro omezený počet proškolených studentů a pedagogický dozor.
- V laboratoři nosíme oblečen čistý bílý pracovní plášť, vyrobený z tkanin s omezenou hořlavostí. V tomto oděvu nesmíme pobývat mimo pracovní prostory a šatny. Pracovní oděv musí být čištěn použitím vysokých teplot (vyváření, žehlení).
- Před zahájením práce je nutné z rukou odložit šperky a hodinky. Nehty udržujeme dokonale čisté, pečlivě ošetřené a přednostně krátké. Vlasy upravíme tak, aby při práci nepadaly do tváře, popř. na pracovní plochu, a nehrozilo jejich ožehnutí kahanem.
- V prostorách laboratoře **je zakázáno jíst, pít, kouřit a používat mobilní telefon.**
- Ruce si umýváme vlažnou vodou a desinfekčním mýdlem vždy před započítím i po ukončení práce v laboratoři a dále před i po každém použití toalety. K osušení rukou používáme jednorázové papírové ručníky. Před odchodem z laboratoře použijeme na ruce desinfekční přípravek, příp. i ochranný krém.
- Na pracovní místo odkládáme jen nejnnutnější věci, při zahájení laboratorní práce nepoužíváme stůl k odkládání osobních věcí.
- Nikdy **nepipetujeme ústy**, nic si nevkládáme do úst (tužky, prsty apod.), nedotýkáme se obličeje, zejména očí.
- Při inokulaci se vyhýbáme mluvení, kašlání, kýchání apod.
- Zabraňujeme tvorbě aerosolů při práci (pipetování, používání bakteriologických kliček).
- Při práci s bakteriálními kulturami pracujeme vždy v blízkosti hořícího kahanu, kultivační nádoby necháváme otevřeny pouze na nezbytnou dobu.
- Při práci s obzvláště nebezpečnými mikroorganismy provádíme veškeré rizikové činnosti v pracovním boxu s laminárním prouděním třídy Biohazard.



Obrázek 1: Laminární box.

- Při zahájení, po ukončení práce v laboratoři a při jakékoli kontaminaci pracovní plochy je nutné desinfikovat pracovní stůl vhodným desinfekčním roztokem (např. 70% ethanol) a následně setřít buničitou vatou. Kontaminované pomůcky a nástroje ukládáme do zvláštních nádob. Při rozsáhlejší kontaminaci pracovních ploch informujeme vyučujícího.
- Veškeré roztoky a pevný odpad pocházející z mikrobiologické laboratoře musí být před vlastní likvidací dekontaminovány působením vysokých teplot v Kochově parním sterilizátoru (teploty do 100 °C) nebo v autoklávu (teploty nad 100 °C).
- Pracovníci s projevy infekce musí dodržovat zvláštní bezpečnostní opatření (používají ochranné roušky a rukavice).
- Během praktických cvičení dbáme pokynů pedagogů a přesně dodržujeme zadanou metodiku práce.

2. MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ

Provoz mikrobiologické laboratoře zahrnuje nejen provádění vlastních mikrobiologických analýz, ale je spojen i s řadou dalších nezbytností vycházejících z požadavků legislativy případně norem a souvisejících s typy prováděných analýz, na které je laboratoř zaměřena. Mikrobiologická laboratoř se v mnohém značně liší od laboratoře chemické, a to nejen charakterem prováděné práce, nároky na personál, uspořádáním místností, ale i svým vybavením.

2.1. Základní požadavky

Každodenní laboratorní práce zahrnuje činnosti spojené s možným ohrožením zdraví pracovníků, proto je nezbytné důsledně dodržovat zásady bezpečnosti práce. Pracovníci mikrobiologických laboratoří bývají při své práci vystaveni vlivu biologických činitelů. Podle zařazení těchto činitelů do příslušných skupin dle platné legislativy a hodnocení míry rizika jsou pracovníci zařazeni do příslušných **pracovních kategorií** se všemi náležitostmi s tím spojenými (pravidelné lékařské preventivní prohlídky, používání ochranných pomůcek, každodenní evidence rizikových činností, atd.). Problematiku kategorizace prací řeší Krajské hygienické stanice ČR.

Bezpečnost práce se týká také manipulace s materiálem obsahujícím zdraví škodlivé složky. Nákup materiálu pro mikrobiologické analýzy (bujonů, agarů, vyšetřovacích souprav, činidel a dalších reagensů) je automaticky spojen s dodáním **bezpečnostních listů**, které upozorňují na základní fyzikálně-chemické parametry, zdravotní rizika a první pomoc v případě ohrožení zdraví. Tyto dokumenty musí laboratoř evidovat a podle informací v nich uvedených a závažnosti obsahu zdraví škodlivých látek musí s materiálem náležitě manipulovat během jeho uskladnění (např. uzamykatelná skřín), při jeho používání (ochranné rukavice, ochrana očí, roušky, první pomoc) a při jeho likvidaci.

Bezpečnost práce a nakládání s nebezpečnými látkami jsou legislativně ošetřeny nařízením (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, zákonem č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, zákonem č. 350/2011 Sb. o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon), a vyhláškou č. 402/2011 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí.

Legislativní předpisy dále požadují povinné pravidelné **technické prohlídky tlakových nádob autoklávů** zajišťujících sterilitu používaného materiálu a kultivačních médií včetně dekontaminace odpadů laboratoře. Pracovníci mikrobiologické laboratoře obsluhující autoklávy musí absolvovat odborné školení a být držiteli **Osvědčení o odborné způsobilosti** k práci s tlakovými zařízeními.

Provádění některých laboratorních analýz podléhá dle platné legislativy (zákon č. 281/2002 Sb.) dozoru ze strany Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB). Jde o práci s **vysoce rizikovými a rizikovými biologickými agens a toxiny** (např. *Clostridium botulinum*, Shigatoxigenní kmeny *E. coli*, stafylokokové enterotoxiny, aflatoxiny, botulinové toxiny, Shigatoxiny 1 a 2 a mnoho dalších bakterií, virů a biologických toxinů). Jedná se o povinné opatření související se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a možnosti jejich případného zneužití. Pracoviště, které s těmito agens manipulují, mají povinnost žádat SÚJB o udělení povolení nakládat s výše uvedenými agens a toxiny. Pracoviště jsou vedena v evidenci, podléhají dozorové činnosti SÚJB a musí plnit povinnosti držitelů povolení v souladu s platnou legislativou.

Akreditované laboratoře podstupují pravidelné posuzování své způsobilosti k provádění odborné činnosti nezávislými auditory s cílem získat Osvědčení o akreditaci u Českého institutu pro akreditaci, o.p.s. Akreditace laboratoře znamená formální uznání odborné a organizační způsobilosti laboratoře k provedení konkrétní služby, jak bývá popsáno v rozsahu akreditace laboratoře. Způsobilost je klíčem k transparentnosti, spolehlivosti a srovnatelnosti činnosti laboratoře.

Akreditace zkušebních laboratoří (včetně laboratoří mikrobiologických) je prováděna podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří.

Laboratoře pověřené odbornou garancí v daném okruhu činnosti pro ČR se označují jako **národní referenční laboratoře** a jsou schvalovány na úrovni ministerstev ČR (národní referenční laboratoře schválené Ministerstvem zemědělství ČR jsou publikovány ve Věstníku MZe). **Referenční laboratoře** pro danou nákazu nebo veterinární problematiku vyhláší Státní veterinární správa ČR.

*Jako příklad lze uvést laboratoře Státního veterinárního ústavu Jihlava, které jsou národní referenční laboratoří pro maso a masné výrobky nebo pro *Listeria monocytogenes* a dále pro mykotoxiny a další přírodní toxiny, barviva, antibakteriální (inhibiční) látky a rezidua veterinárních léčiv.*

2.2. Základní terminologie

S prací v mikrobiologické laboratoři souvisí následující základní terminologie:

- **kultivace** – pěstování mikroorganismů na speciálních půdách (agarech, médiích) k tomu určených;
- **inkubace** – proces, při němž se množí mikroorganismus;
- **inokulace (očkování)** – aseptické přenesení inokula (živých buněk žádaného druhu) do sterilní živné půdy;
- **izolace mikroorganismu** – získání čisté kultury určitého mikroorganismu z mikrobiální směsi;
- **desinfekce** – zničení (devitalizace) vegetativních buněk a méně stabilních klidových stadií patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů účinky vnějšího prostředí;
- **asepse** – dodržování opatření, které zabraňují kontaminaci a infekci;
- **sterilizace** – zničení a odstranění všech mikroorganismů (včetně spor) z prostředí např. působením vlhkého nebo suchého tepla;
- **kontaminace** – znečištění určitého prostředí nežádoucími mikroorganismy.

2.3. Provozní místnosti

Základní pravidlo stanoví, že umístění a vybavení provozních místností nesmí ovlivnit spolehlivost mikrobiologického zkoušení. Provoz mikrobiologické laboratoře vyžaduje oddělené zóny pro:

- příjem, úchovu, úpravu a zpracování vzorků;
- přípravu a sterilizaci kultivačních půd a pomůcek;
- vlastní analýzu, tj. vážení, ředění, inokulaci, inkubaci, subkultivaci, úchovu mikrobiálních kmenů, atd.;
- dekontaminaci, čištění pomůcek a ošetření odpadů vzniklých při mikrobiologickém zkoušení;
- mimo těchto zón doplňují mikrobiologické pracoviště ještě zóny další, např. vstupy, chodby, výtah pro materiál, administrativa, šatny, toalety, sklady.

Z hlediska umístění provozních místností musí být zabráněno vzniku křížové kontaminace. Prakticky to znamená, že některé zóny (např. příjem a úchova vzorků, laboratoř pro manipulaci s patogenními mikroorganismy, varna půd, umývárna laboratorního skla, atd.) musí být prostorově zcela oddělené od ostatních místností.

Aby se redukovalo riziko kontaminace provozních místností prachem a tím i mikroorganismy, musí být stěny, stropy a podlahy hladké, ze snadno čistitelných materiálů odolných vůči detergentům a dezinfekčním prostředkům, okna a dveře vzduchotěsně uzavíratelné a výměna vzduchu prováděna přes bakteriologické filtry. Vybavovat místnosti záclonami, květinami nebo obrazy je nepřipustné.

Laboratorní stoly a nábytek musí být vyrobeny z hladkého nepropustného materiálu, který je snadno čistitelný a dezinfikovatelný.

Některé speciální mikrobiologické práce (např. práce s patogenními mikroorganismy) vyžadují **pracovní boxy** (laminární box, flow-box), tj. pracovní stanoviště vybavené horizontálním nebo vertikálním laminárním prouděním vzduchu. Pracovník je oddělen od pracovní části boxu skleněnou přepážkou, do vnitřního prostoru vsune pouze ruce. Laminární box je dále vybaven přívodem plynu, elektřiny a germicidní zářivkou.

V provozních místnostech je pravidelně monitorována mikrobiologická kvalita povrchů a vzduchu, a to např. otiskovou metodou (povrchy) nebo metodou spadovou (ovzduší).

2.4. Zásady aseptické práce

Na samotnou práci v mikrobiologické laboratoři jsou kladeny vysoké požadavky. Vlastní práce musí probíhat blízko plamene. Je nutné plamenem **ožehnout hrdla nádob a zkumavek při jejich otevření a před zavřením** a otevírat je jen po nezbytně nutnou dobu. Kovové zátky zkumavek se zásadně nepokládají na stůl, ale drží se mezi dlaní a malíkem pravé (příp. levé) ruky (obrázek 2).

Všechny použité laboratorní pomůcky musí být před mytím nebo konečnou likvidací dekontaminovány, a to následujícím způsobem:

- ihned po použití odkládáme **drobné pomůcky** (pipety, špičky k automatickým pipetám, hokejky, plastové kličky, nástroje, atd.) do nádob s dezinfekčním roztokem (např. 70% ethanol, alkoholové desinfekční prostředky či prostředky na bázi chloru);



Obrázek 2: Manipulace se zkumavkou.

- kontaminované **laboratorní sklo** včetně skleněných Petriho misek ukládáme zvlášť do označené kovové nádoby a dekontaminujeme sterilizací parou v autoklávu nebo v Kochově sterilizátoru;
- naočkované **plastové Petriho misky** či další kontaminovaný **jednorázový plastový materiál** ukládáme zvlášť do označené kovové nádoby a dekontaminujeme sterilizací parou v autoklávu nebo v Kochově sterilizátoru a jako odpad je dále předáme k odstranění příslušným způsobem.

2.5. Přístrojové vybavení

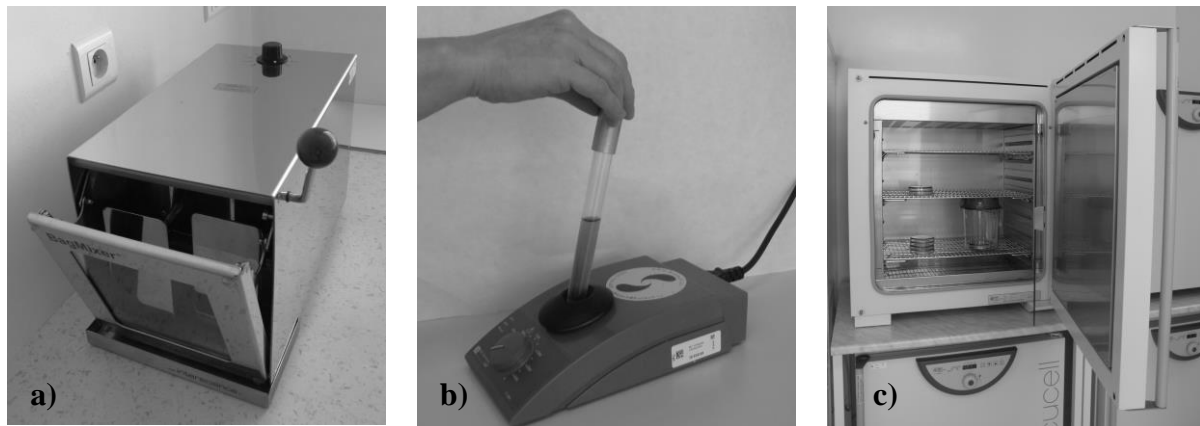
Přístroje určené pro mikrobiologické pracoviště slouží výhradně pro provádění mikrobiologických rozborů.

K základnímu vybavení laboratoře patří:

- **váhy** s přesností $\pm 0,01$ g sloužící k odvažování zkušebního vzorku nebo k vážení složek kultivačních půd a reagensů;
- **přístroj k měření pH**, který je určen k měření pH u každé várky kultivačních půd a reagensů, příp. vzorku potravin;
- **vodní lázeň** s teplotou řízenou termostatem, která se používá zejména pro udržování rozehrátých agarových půd, inkubaci inokulovaných tekutých kultivačních půd při konstantní teplotě nebo k tepelnému ošetření vzorků (např. stanovení pasteračního efektu, stanovení spor);
- **homogenizátor**, který se používá k přípravě výchozí suspenze ze vzorků jiné než tekuté konzistence, nejčastěji se používá homogenizátor peristaltického typu se sterilními sáčky z plastu (tzv. stomacher nebo mastikátor), nebo rotační homogenizátor vybavený sterilizovatelnými skleněnými nebo kovovými nádobami s víčkem;
- **mikrovlnná trouba** je v některých případech určená k rozehrívání agarových půd;
- **rozplňovač kultivačních půd**, jedná se o přístroj k aseptickému a přesnému rozplňování kultivačních půd a reagensů do zkumavek, lahví, baněk nebo Petriho misek;
- **mechanické míchadlo (vortex)**, zařízení umožňující homogenní mísení různých tekutin nebo vytvoření suspenze bakteriálních buněk v tekutině, jeho princip je založen na excentrickém rotačním pohybu obsahu zkumavky;
- **optický mikroskop**, pro účely pozorování morfologie mikroorganismů vybavený objektivem s vysokým zvětšením (100 \times) a olejovou imerzí, popř. vybavený objektivem pro fázový kontrast a posuvným kondenzorem;
- **plynový kahan** se používá k vytvoření a udržení ochranné zóny v okolí hořáku, dále ke sterilizaci kovových očkovacích klíčků či jehel žiháním do červeného žáru a k opalování hrdel skleněných zkumavek a nádob;
- **autokláv, horkovzdušný sterilizátor, Kochův parní sterilizátor** jsou zařízení používaná k rozvážení a sterilizaci kultivačních půd, ke sterilizaci laboratorních pomůcek nebo k dekontaminaci použitých pomůcek, naočkovaných kultivačních půd v Petriho miskách či zkumavkách;
- **sterilizační filtry** představují speciální filtrační zařízení s filtry s póry o velikosti 0,22 μm , které zadrží bakteriální buňky; zařízení se používá ke sterilizaci zejména chemických reagensů, které nelze autoklávat;
- **inkubátory (termostaty)**, skříňové zařízení používající se pro kultivaci mikroorganismů při normou stanovených teplotách. Inkubátor musí být vybaven regulačním systémem umožňujícím udržení rovnoměrné a stabilní teploty v celém jeho objemu.

- **vybavení pro kultivaci v upravené atmosféře (anaerostat)**, je hermeticky uzavíratelná nádoba umožňující udržet upravenou atmosféru (mikroaerofilní či anaerobní podmínky) po celou dobu inkubace mikroorganismů;
- **zařízení k počítání kolonií** vybavené osvětlovacím systémem s temným pozadím, lupou a mechanickým nebo digitálním počítadlem;
- **chladničky**, a to odděleně pro uchovávání: a) neinokulovaných kultivačních půd a reagensů, b) vzorků ke zkoušení, c) mikrobiálních kmenů a naočkovaných půd;
- **mraznička** je určena k uchovávání testovaných vzorků, některých antibiotik, enzymů a některých testů či přípravků určených ke skladování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a to opět odděleně dle jejich povahy. K dlouhodobému uchovávání mikrobiálních kultur se používají tzv. **hlubokomrazicí boxy**, v nichž je dosaženo teploty cca $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, příp. i vyšší.
- **UV germicidní lampa** se používá ke sterilizaci prostorů a k likvidaci vzniklých aerosolů v ovzduší laboratoře.

Mezi další přístroje používané v mikrobiologické laboratoři patří např. vývěva pro membránovou filtraci (vyšetření pitné vody), odstředivka, třepačka (vyšetření oplachovou metodou), transiluminátor (vyhodnocení fluorescence při 360 nm) a řada dalších.



Obrázek 3: Přístroje používané v mikrobiologii – a) stomacher, b) vortex, c) termostat.

2.6. Laboratorní pomůcky

Mezi základní, běžně používané laboratorní pomůcky patří zejména:

- **bakteriologická klička**, která je pro běžné použití vyrobena z ocelového drátu o tloušťce 0,6 až 0,8 mm, na jehož konci je vytvořeno asi 2 až 3 mm velké očko, délka kličky je obvykle 5 – 6 cm, klička se upevňuje do speciálního držátka. Na některá přeočkování se doporučuje používat kličku z platiny. Kovové kličky se musí před použitím vyžít v plameni. Vhodnou alternativou jsou jednorázové sterilní kličky z plastu s přesně definovanou velikostí oka.
- **bakteriologická očkovací jehla** se liší od kličky tím, že na konci nemá očko, popř. je i mírně zašpičatělá, používá se k očkování vpichem do hloubky kultivačního média;
- **nástroje k odběru vzorků** (pinzety, skalpely, nůžky, lžice či lžičky) volíme podle druhu vyšetřované potraviny. Obecně platí, že musí být vyrobeny z odolného, sterilizovatelného materiálu, optimálně z nerez oceli.
- **hokejky** (roztírací tyčinky) jsou skleněné nebo plastové tyčinky ohnuté do tvaru písmene „L“, používají se k roztírání inokula po povrchu pevného kultivačního média;

- **skleněné tyčinky** používáme obvykle k rozočkování bakteriální suspenze na povrch pevného média;
- **mikrobiologické zkumavky** musí být odolné vůči vysokým teplotám (např. typ Simax). Dále musí mít mikrobiologické zkumavky silnější stěnu než zkumavky chemické, aby nedošlo k praskání skla při opalování hrdla nad plamenem. Nejčastěji se používají zkumavky s rovným okrajem, které jsou kryty vhodným kovovým víčkem, v některých případech se používají i zkumavky se zahnutým okrajem uzavřené vatovou zátkou (např. pro přípravu šikmých agarů). Pro provádění některých biochemických testů (např. kvasná zkouška) se do zkumavek přidává tzv. plynovka, což je skleněná trubička s jedním zataveným koncem sloužící k jímání vznikajícího plynu.
- **laboratorní sklo** je v mikrobiologii reprezentováno zejména odměrnými válci, Erlenmayerovými baňkami, láhvemi pro přípravu kultivačních médií či ředících roztoků, kádinkami, pipetami a skleněnými Petriho miskami. Na jakost skla jsou kladeny stejné nároky jako v případě mikrobiologických zkumavek.
- **automatické pipety** se v mikrobiologických laboratořích stávají vhodnou alternativou pipetám skleněným. Používají se pipety částečně nebo plně autoklávovatelné o různém rozsahu, doplněné vhodnými sterilními plastovými špičkami v autoklávovatelných zásobnících. Při použití automatických pipet dbáme zejména na *aseptické nasazování špiček* a správnou manipulaci s pipetou při nasávání vzorku.

Mezi další laboratorní pomůcky patří mikroskopická podložní sklíčka, nádobky na barvící roztoky, filtrační aparatura, membránové filtry, šablony, vatové tampony, abrazivní houbičky, skleněné perly, homogenizační sáčky, nádobky na homogenáty, nádobky s desinfekcí na odkládání kontaminovaných pomůcek, nádoby na odpad určený k dekontaminaci, atd.

2.7. Sterilizační zařízení

Všechny pomůcky určené pro mikrobiologické účely musí být připraveny tak, aby byla až do doby použití zajištěna jejich **sterilita**. Laboratorní sklo (zkumavky, baňky, láhve, odměrné válce, atd.) musí být před sterilizací uzavřeno víčkem nebo překryto alobalem. Pinzety, skalpely, nůžky, odběrové tampony, šablony, skleněné pipety, tyčinky, hokejky a další pomůcky sterilizujeme umístěné v odpovídajících nádobách nebo zabalené v alobalu s vyznačením místa otevření. Totéž platí pro jednorázové pomůcky z plastu. Sterilizaci provádíme různými sterilizačními způsoby a v různých typech sterilizátorů.

2.7.1. Autokláv

Jedná se o hermeticky uzavíratelnou kovovou nádobu, v níž při zahřívání dochází ke vzniku zvětšeného tlaku páry a přehřátí vnitřního prostoru na vyšší teplotu než 100 °C. Ve většině případů se ke sterilizaci používá *přetlaku 0,1 MPa*, což odpovídá teplotě 121 °C. Autokláv je vybaven regulačním zařízením, kterým lze nařídit předepsanou teplotu i dobu sterilizace. Používá se ke sterilizaci většiny kultivačních médií, roztoků a laboratorních pomůcek nebo k dekontaminaci použitých pomůcek a infekčního materiálu při výše zmíněné *teplotě 121 °C po dobu 15 – 30 minut*. Autoklávy smí obsluhovat pouze proškolení pracovníci. Jsou to zařízení, která dle legislativních předpisů podléhají povinným pravidelným technickým prohlídkám tlakových nádob.



Obrázek 4: Stolní autokláv.

2.7.2. Kochův parní sterilizátor

Slouží ke sterilizaci v proudící páře. Dosahuje se zde *teploty maximálně 100 °C*, která usmrcuje pouze vegetativní buňky, nikoli spory (v jejich případě je nezbytné opakované ošetření). Lze ho použít k rozvážení agarových půd nebo k tzv. frakcionované sterilizaci kultivačních médií, která obsahuje ingredience nesnášející vyšší teplotu. V Kochově parním sterilizátoru se sterilizují média jako např. VČŽL, VČŽG či XLD. Dále se používá k dekontaminaci naočkovanych kultivačních půd v Petriho miskách či zkumavkách.

2.7.3. Horkovzdušný sterilizátor

Je to skříňové zařízení umožňující dosažení vysokých teplot potřebných k destrukci mikroorganismů suchým teplem. Běžně se toto speciální zařízení nahrazuje horkovzdušnou sušárnou. Podmínkou správné funkce je schopnost spolehlivě udržovat *teplotu 170 – 180 °C po dobu nejméně 1 hodiny*. Regulačním zařízením se nastavuje předepsaná teplota a čas.

Tímto zařízením se sterilizuje především laboratorní sklo a pomůcky ze skla či kovu. Lze jej použít také ke sterilizaci vysokovroucích kapalin nemísitelných s vodou (např. parafinový olej), které nelze sterilizovat vodní parou. V žádném případě nelze horkovzdušný sterilizátor používat ke sterilizaci kultivačních médií, membránových filtrů či pomůcek z plastů.

2.7.4. Sterilizační filtry

Principem tohoto způsobu sterilizace je mechanické odstranění mikroorganismů z kultivačních médií nebo roztoků. Používají se speciální filtrační zařízení s filtry obsahujícími velmi malé póry (0,22 μm), které zadrží bakteriální buňky obsažené v médiích. Tento způsob sterilizace se používá především v těch případech, kdy kultivační média nebo některé roztoky používané jako suplementy pro přípravu kultivačních médií obsahují termolabilní látky jako vitaminy, proteiny, séra, antibiotika, apod.

2.7.5. UV sterilizační lampa (germicidní zářivka)

Používá se především ke sterilizaci ovzduší a pracovních ploch a k likvidaci aerosolů v laboratořích. Je nezbytnou součástí laminárních boxů (flow-boxů). Nejvyšší účinnosti je dosaženo při použití UV záření o vlnové délce 200 až 280 nm (optimum 260 nm). UV lampy produkující UV záření o vlnové délce 360 nm, používané pro vyhodnocování fluorescence, jsou prakticky neúčinné. Proto nelze tyto dva typy UV záření zaměňovat. Účinnost sterilizačních lamp je možné testovat kultivačně.

Tento způsob sterilace prostředí se zásadně používá při nepřítomnosti pracovníků v místnosti (nejčastěji v noci). UV záření může u pracovníků vyvolat různá závažná poškození oční rohovky nebo pokožky. Je důležité dodržovat bezpečnostní opatření (upozornění na zákaz vstupu do místnosti v době působení germicidních zářivek).

3. KULTIVAČNÍ MÉDIA

Kultivační – živná – média jsou koncipována tak, aby vyhovovala všem nárokům daného mikroorganismu na výživu (dostatek živin a zdrojů energie), pH, osmotický tlak, redox potenciál a další. Některé živné půdy obsahují specifické růstové faktory (vitaminy, aminokyseliny, atd.).

Kultivační půda představuje různě definovanou směs látek tekuté, polotuhé nebo tuhé povahy, která obsahuje přírodní a/nebo syntetické součásti určené k pomnožení nebo zachování životaschopnosti mikroorganismů.

3.1. Druhy kultivačních půd

Obecně dělíme kultivační půdy na půdy *přírozené* (komplexní, chemicky nedefinované), jejichž základem je živný bujon, a *syntetické* (chemicky definované), které jsou složeny z chemicky definovaných sloučenin. Mezistupeň tvoří kultivační půdy *neúplně chemicky definované*, které jsou částečně složeny z přírodních surovin a částečně z chemických látek, tyto mají v mikrobiologii potravin největší zastoupení.

Dále rozlišujeme *půdy k přímému použití* (angl. *ready-to-use medium*), které jsou výrobcem dodávány v Petriho miskách nebo zkumavkách, a *půdy připravené v laboratoři*, a to z komerčních dehydrovaných směsí nebo z jednotlivých složek podle receptury.

3.1.1. Dělení kultivačních půd podle konzistence

Podle konzistence rozeznáváme *půdy tekuté* (bujony) a *půdy pevné* (agary). Pevné půdy se připravují ztužením bujonového základu přidáním 1 – 2 % agaru, což je směs polysacharidů extrahovaných z rudých mořských řas – agarofytů. V některých případech (např. stanovení pohyblivosti, serologické určení bičíkových antigenů) se používají i *půdy polotuhé* (semisolidní) s přísadkou agaru do 0,5 %.

3.1.2. Dělení kultivačních půd podle složení

Podle složení dělíme kultivační půdy do následujících skupin:

- *základní půda* je tvořena pouze neobohaceným jednoduchým živným základem. Rozlišujeme půdy tekuté (živný bujon, peptonová voda) a pevné (živný agar).
- *obohacená půda* – základ půdy se připravuje z kvalitnějších extraktů (např. mozkosrdcová infuze) a obohacuje se bílkovinnými koncentráty a hydrolyzáty, peptony, dále např. škrobem, vejci, krví či cukry. Rozlišujeme půdy tekuté (např. mozkosrdcová infuze) a pevné (např. krevní agar, čokoládový agar, agar s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem).
- *elektivní (výběrová) půda* je svým složením podobná základním médiím, obsahuje však některé komponenty vztahující se k určité charakteristické společné vlastnosti taxonomicky odlišných druhů. Elektivní půdy se používají pro stanovení proteolytických (např. agar s odstředěným mlékem, agar s želatinou), lipolytických (např. agar s tweenem, agar s želatinou a tweenem) či sacharolytických bakterií (např. agar obohacený škrobem).
- *selektivní půda* slouží pro kultivaci úzké taxonomické skupiny mikroorganismů, růst původní nežádoucí mikroflóry je zde potlačen. Obecně se skládá ze živného základu a *inhibitoru růstu* nežádoucích mikroorganismů. Rozlišujeme tekuté půdy (např. půda s malachitovou zelení – pro záchyt salmonel, alkalická peptonová voda) a půdy pevné (např. agar s 10 % NaCl pro záchyt stafylokoků).

- **diagnostická půda** – diagnostika určitého druhu mikroorganismu je založena na jeho vybraných biochemických vlastnostech podmíněných přítomností nebo tvorbou určitých enzymů. Půda obsahuje mimo živného základu i vhodný *substrát* (např. sacharidy, aminokyseliny) a *indikátor biochemické aktivity* (např. indikátor změny pH). Rozlišujeme půdy tekuté (např. cukrové půdy, půdy pro průkaz tvorby indolu, H₂S) a pevné (např. Triple Sugar Iron agar).
- **selektivně diagnostická půda** kombinuje principy půd selektivních a diagnostických. Ze směsi mikroorganismů vyselektuje hledaný druh a současně potlačí nežádoucí mikroflóru, v důsledku utilizace přidaného substrátu rostou hledané mikroorganismy v morfologicky zřetelně odlišitelných koloniích. Pro gramnegativní bakterie jsou to např. Endův agar, MacConkey agar, XLD agar, pro grampozitivní bakterie např. Baird-Parker agar, Slanetz-Bartley agar, MYP agar.
- **chromogenní půda** představuje zvláštní typ diagnostických půd. Obsahuje tzv. *chromogen*, což je běžný substrát (např. cukr) s navázanou barevnou molekulou – *chromoforem*, samotný chromogen je bezbarvý. Mikroorganismus absorbuje a pokud obsahuje enzym katalyzující štěpení vazby mezi substrátem a chromoforem je schopen chromogen rozštěpit a substrát zužitkovat. Uvolněný nerozpustný chromofor se hromadí v bakteriální buňce a způsobuje její typické zbarvení. Chromogenní média jsou vyvinuta pro průkaz *Escherichia coli* O157, salmonel, *Listeria monocytogenes*, enterokoků, atd.
- **fluorogenní půda** pracuje na podobném principu jako půda chromogenní. Na vhodný substrát je navázáno fluorescenční barvivo, které způsobuje typickou fluorescenci bakteriálních kolonií v UV světle při 360 nm. Tento typ půd se využívá např. při stanovení *E. coli* v pitné vodě.

Tabulka 1: Obecné složení některých typů kultivačních půd.

Typ média	Základ	Inhibitor	Substrát	Indikátor
základní	+	-	-	-
selektivní	+	+	-	-
diagnostické	+	-	+	+
selektivně diagnostické	+	+	+	+

3.1.3. Dělení kultivačních půd podle účelu použití

V mikrobiologii potravin se nejčastěji setkáváme s následujícími typy kultivačních médií:

- **transportní půda** je půda určená k zachování životaschopnosti mikroorganismů během přepravy vzorku do laboratoře. Pro udržení dostatečné vlhkosti bývají transportní média tekutá nebo polotuhá, místo živin obsahují látky omezující množení bakterií a látky absorbující toxické produkty jejich metabolismu (např. aktivní uhlí).
- **konzervační půda**, někdy též udržovací půda, slouží k zachování životaschopnosti mikroorganismů po delší dobu a jejich ochraně před nepříznivými vlivy. Většinou se jedná o nutričně chudé půdy, optimálně bez přítomnosti sacharidů.
- **resuscitační půda** umožňuje mikroorganismům oslabeným technologickými procesy při výrobě potravin reparaci a schopnost obvyklého růstu. Jedná se o tekuté půdy, které se v mikrobiologii potravin používají při průkazu bakteriálních původců onemocnění člověka (např. pufrovaná peptonová voda při průkazu salmonel v potravinách).
- **pomnožovací půda** je tekutá kultivační půda, která svým složením poskytuje zvláště vhodné podmínky pro množení mikroorganismů. Pomnožovací půda může být *selektivní* – potom podporuje množení určité skupiny nebo druhu mikroorganismů a částečně nebo

zcela inhibuje růst doprovodné mikroflóry (např. Rappaport Vassiliadis Soya médium, bujon podle Fräsera), nebo *neselektivní* (např. živný bujon).

- **izolační půda** je obecně tuhá nebo polotuhá kultivační půda podporující růst mikroorganismů, opět může být *selektivní* (např. PALCAM agar) nebo *neselektivní* (agar s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem).

K dalším patří půdy diferenciační, identifikační, půdy k anaerobní kultivaci, půdy ke stanovení rezistence mikroorganismů k antibiotikům, atd.

3.2. Příprava hotových dehydratovaných živných půd

Tradiční příprava médií spočívá ve využití ingrediencí jako např. bujonu (ve vodě rozpustné komponenty masa), masového extraktu, peptonu, kvasniční vody nebo kvasničního extraktu, krve, mléka, sójové mouky, žlučových derivátů a mnoha dalších. V současnosti však většina mikrobiologických laboratoří využívá možnost nákupu komerčně vyrobených hotových dehydratovaných půd. Jejich příprava bývá mylně podceňovaným úsekem práce v mikrobiologické laboratoři. Půdy se nejčastěji dodávají v podobě prášku (příp. tablet), ale také ve ztužené podobě přímo v lahvičkách.

Nádoby obsahující dehydratované složky nebo dehydratované kompletní půdy musí být skladovány v suchu a temnu při teplotě uváděné výrobcem, běžně při laboratorní teplotě. Všechna dehydratovaná média jsou hygroskopická a musí být uchovávána v hermeticky uzavřených obalech (ochrana před vzdušnou vlhkostí). Při přípravě živného média proto dbáme na jejich rychlé a pečlivé uzavření. Vykazuje-li půda známky slepení nebo tuhnutí, příp. pokud došlo k překročení doby expirace uvedené výrobcem, nesmí se už používat.

3.2.1. Postup přípravy živných půd

Při přípravě jednotlivých půd se postupuje dle konkrétní normy nebo podle doporučení výrobce. K rehydrataci půd se používá destilovaná, případně deionizovaná voda. Předepsané množství dehydratované půdy se **odváží** a nasype se do poloviny potřebného objemu destilované vody ve vhodné nádobě. Zbytek vody se lije po stěnách nádoby, aby došlo k dokonalému spláchnutí prášku. Po promíchání se agarové půdy nechají asi 15 minut **bobtnat**, nabobtnání agaru umožní jeho snadnější rozpuštění. V případě půd připravovaných z jednotlivých složek je třeba každou složku přidat samostatně, nechat ji rozpustit a teprve poté doplnit vodou na konečný objem. Každou láhev je vždy *nutno řádně označit* názvem kultivační půdy, datem přípravy a podpisem osoby, která půdu připravila.

Po nabobtnání se směs dobře protřepe a **rozpouští** se ve vroucí vodní lázni, mikrovlnné troubě či v proudící páře. Obsah průběžně promícháváme, aby nedošlo k sedimentaci částic na dno nádoby. Po dokonalém rozpuštění (na stěnách nejsou viditelné částice agarů) se médium vychladí (teplota se volí dle použitého pH-metru) a provede se **úprava pH** na hodnotu stanovenou normou či výrobcem. K úpravě pH se používá roztok o koncentraci 1 mol/l NaOH nebo 1 mol/l HCl. Při úpravě pH bereme v úvahu, že sterilizací v autoklávu hodnota pH poklesne zpravidla o 0,1 – 0,2. Posledním krokem je **sterilizace**. Z důvodu změny hodnoty pH následkem sterilizace, provádí některé laboratoře úpravu pH až po sterilizaci. V tomto případě je však nezbytné zajistit, aby nedošlo ke kontaminaci již sterilního živného média.

3.2.1.1. Sterilizace půd

Živné půdy se sterilizují autoklávováním nebo filtrací. Některé druhy půd nevyžadují sterilizaci autoklávováním, ale pouze se rozvářejí (např. Slanetz-Bartley agar), podobně některé reagenty lze použít přímo bez sterilizace. Živná média se sterilizují buď přímo v nádobách v nichž byla připravena nebo po rozplnění do zkumavek (! *nikoli Petriho misek*).

Sterilizace *autoklávováním* se provádí v autoklávu nebo přístroji pro přípravu a rozplňování pūd. Obecně trvá autoklávování 15 minut při 121 °C za tlaku 0,1 MPa, přičemž do doby sterilizace se nepočítá čas potřebný k docílení teploty 121 °C a následné zchlazení. Při sterilizaci objemů větších než 1 000 ml nebo při použití tlustostěnného skla se sterilizační cyklus upraví dle potřeby. Živná média lze také sterilizovat *filtrací* za podmínek vakua nebo přetlaku. Používají se sterilní membrány nebo filtry s póry o průměru 0,22 μm a sterilní filtrační zařízení.

3.2.2. Rozlívání pūd a jejich uchovávání

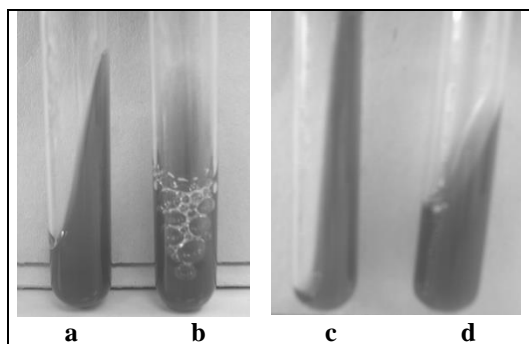
Hotová živná média se po sterilizaci rozplňují do příslušných kultivačních nádob nebo se uchovávají přímo v lahvích a před použitím se rozehtívají (ve vodní lázni, mikrovlnné troubě či proudící páře) a temperují na teplotu 45 – 50 °C, přičemž je třeba zabránit jejich přehřátí. Rozehřátá půda by měla být spotřebována nejdéle do 4 hodin. Většinou jsou půdy v pevném stavu skladovatelné při teplotě místnosti a v temnu 1 – 2 týdny, v chladničce několik týdnů, nesmí však zmrznout. Pro delší skladování je nutno nádoby hermeticky uzavřít, Petriho misky se uchovávají obrácené dnem vzhůru a zabalené do hliníkové fólie.

U některých typů pūd se před rozplněním či vlastním použitím přidávají tzv. *suplementy* (např. antibiotika, některé chemické látky, vaječný žloutek, beraní krev). Tyto látky jsou vesměs termolabilní a sterilizací by došlo k jejich znehodnocení. Živné médium se před přidáním suplementů zchladí asi na 47 ± 2 °C. Suplementy uchovávané při chladničkových teplotách a přidávané do živného média ve větším množství (např. žloutková emulze) je nutno před vlastním přidáním vytemperovat na teplotu přibližně 50 °C. Všechny suplementy je třeba s ostatní půdou opatrně, ale řádně promíchat a následně co nejrychleji rozplnit do Petriho misek či zkumavek. U některých pūd (např. pro kultivaci anaerobních bakterií) je žádoucí *odstranit z půdy vzduch*, což se provádí zahříváním ve vroucí vodní lázni nebo proudící páře s uvolněnými víčky nebo uzávěry nádob, které se poté opět těsně uzavřou a půda se zchladí na příslušnou teplotu.

Tekuté nebo polotuhé živné půdy plníme sterilní pipetou nebo dávkovacím zařízením do sterilních baněk nebo zkumavek opatřených vatovými zátkami nebo víčkem. Dáváme pozor, aby nedošlo k pořísnění okraje nádoby či zátky, vzniklá agarová vrstvička je vhodným médiem pro pomnožení kontaminujících mikroorganismů ze vzduchu. Některé půdy se po rozplnění opět sterilizují.

Šikmé agary se připravují tak, že se sterilní zkumavky naplní rozpuštěnou sterilní půdou asi do 1/3 objemu, uzavřou, případně opět vysterilizují a nechají ztuhnout v šikmé poloze, přičemž horní okraj agaru se nesmí dotýkat zátky zkumavky. K přípravě šikmých agarů se běžně používají skleněné zkumavky uzavřené kovovým kloboučkem či šroubovacím víčkem. Lze použít také autoklávovatelné plastové zkumavky se šroubovacím víčkem, jejichž výhodou je menší objem spotřebované živné půdy.

Nalévání agarových ploten se provádí asepticky až po sterilizaci půdy. Půda se předem vytemperuje na 45 – 55 °C, aby po nalití do Petriho misek nedošlo ke kondenzaci vodní páry na víčku. Do sterilní Petriho misky naléváme takové množství půdy, aby vznikla vrstva nejméně 2 mm vysoká (tj. asi 15 – 20 ml na misku o průměru 9 cm). Vzniknou-li



Obrázek 5: Šikmé agary.

Legenda:

a – správně připravený šikmý agar

b – bubliny (rychlé vypuštění agaru z pipety)

c – nízký klín (vodorovné položení zkumavky)

d – vysoký klín (svislé položení zkumavky)

v agarové půdě vzduchové bubliny, odstraní se vyžíhanou bakteriologickou kličkou či sterilní plastovou špičkou. Připravené Petriho misky či zkumavky je *nutno řádně označit* názvem kultivační půdy (obvykle se používá zkratka nebo laboratorní zvolený číselný kód) a datem přípravy. Na skupinový obal (např. alobal, kterým jsou Petriho misky zabalené) uvádíme název půdy, datum a jméno pracovníka, který půdy připravil.

Před vlastním očkovaním je nutno čerstvě připravené agarové plotny **předsušit**, aby nedošlo na povrchu misky k tvorbě pohyblivého vodního filmu a tím ke znehodnocení vlastního vyšetření. Při předsušení se Petriho misky v termostatu opatrně otevřou a dna i víka se položí vnitřní stranou obrácenou dolů. Tím se zamezí kontaminaci sedimentujícími mikroorganismy. Termostaty a sušárny používané k předsušení misek je třeba pravidelně čistit a dezinfikovat.

Tabulka 2: Příklady kultivačních půd používaných při mikrobiologickém vyšetření potravin.

Základní média	Obohacená média
Pufrovaná peptonová voda (PPV)	Krevní agar (KA) Agar s glukosou, tryptonem a kvasničním extraktem (GTK agar)
Elektivní média	
Agar s odstředěným mlékem (MO agar) – <i>proteolytické mikroorganismy</i> Agar s želatinou a Tweenem (Tw agar) – <i>proteolytické a lipolytické mikroorganismy</i>	
Selektivní média	
De Man, Rogosa a Sharpe agar (MRS agar) – <i>bakterie mléčného kvašení</i> Dichloran glycerolový agar (DG 18) – <i>kvasinky a plísně</i> Chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení (DRBC agar) – <i>kvasinky a plísně</i> Rappaport Vassiliadis sója médium (RVS) – <i>salmonely</i> Mueller-Kauffman tetracyclín novobiocin médium (MKTTn) – <i>salmonely</i> <i>Salmonella/Shigella</i> agar s desoxycholátem sodným a chloridem vápenatým (SSDC) – <i>Y. enterocolitica</i> Modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (mCCDA agar) – <i>Campylobacter</i> spp. Karmali agar – <i>Campylobacter</i> spp. Fraser bujón (FB) – <i>listerie</i>	
Selektivně-diagnostická média	
Agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukosou (VČŽG) – <i>Enterobacteriaceae</i> Agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a laktosou (VČŽL) – <i>koliformní bakterie</i> Agar s xylosou, lyzinem a deoxycholátem (XLD agar) – <i>salmonely</i> Agar s fenolovou červení a brilantovou zelení (BR agar) – <i>salmonely</i> MacConkey agar s cefiximem, teluričitanem draselným a sorbitolem (CT-SMAC) – <i>E. coli</i> O157 Agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (CIN) – <i>Yersinia enterocolitica</i> MacConkeyův agar – <i>laktosapozitivní gramnegativní tyčinky, využití při stanovení Shigella</i> spp. Hektoen enteric agar – <i>Shigella</i> spp. Slanetz-Bartley agar (S-B agar) – <i>enterokoky</i> Baird-Parker agar (B-P agar) – <i>koagulasopozitivní stafylokoky</i> Manitol Yolk Polymyxine B agar (MYP agar) – <i>Bacillus cereus</i> PALCAM agar – <i>Listeria</i> spp. Tryptózový agar s metabisulfitem a cykloserinem (TSC agar) – <i>sulfitredukující klostridia</i> Agar s tergitolem (TTC agar) – <i>koliformní bakterie a Escherichia coli</i> v pitné vodě	
Chromogenní média	
Agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem (TBX agar) – <i>Escherichia coli</i> Rambach agar – <i>salmonely</i> SMAC s BCIG – <i>Escherichia coli</i> O157 <i>Enterobacter sakazakii</i> izolační agar (ESIA agar) – <i>Cronobacter</i> spp. Agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA agar) – <i>Listeria monocytogenes</i> Rapid L.mono – <i>Listeria monocytogenes</i>	

4. KULTIVACE MIKROORGANISMŮ

Kultivace je důležitým krokem kvantitativního i kvalitativního průkazu mikroorganismů v potravinách či jiných vzorcích. Některé kultivační techniky se používají při pomnožování mikroorganismů, jehož cílem je získat dostatečné množství buněk pro mikrobiologické, biochemické, genetické či biotechnologické studie nebo pro uchovávání mikroorganismů. Pro kultivaci potřebujeme vhodné sterilní živné půdy, kultivační nádoby, očkovací pomůcky, termostat či temperovaný box, v některých případech i kultivační nádoby umožňující udržování řízené atmosféry. Pro kultivaci potravinářsky významných psychrofilních či psychrotrofních mikroorganismů (např. aeromonády, listerie) lze použít chladničku, zvláště v těch případech, kde temperovaný box neumožňuje kultivaci při teplotách 4 – 5 °C.

4.1. Očkování

Podstatou kultivace (pěstování) mikroorganismů je přenesení mikroorganismů přítomných v testovaném vzorku (tzv. *inokulum*) do sterilní živné půdy. Tento postup se označuje jako očkování – *inokulace*. Při vlastní práci musíme postupovat zcela asepticky, do kultury ani půdy nesmí vniknout žádné nežádoucí mikroorganismy ze vzduchu, pracovních pomůcek či mikroflóry pracovníka.

Tabulka 3: Přehled základních kultivačních metod.

Kvantitativní metody	Kvalitativní metody	Speciální metody
<i>Metoda</i>	<i>Kultivace</i>	<i>Očkování</i>
<ul style="list-style-type: none"> zalití roztěru MPN* 	<ul style="list-style-type: none"> jednostupňová dvoustupňová <i>Rozočkování</i>	<ul style="list-style-type: none"> do tekutých půd do polotuhých půd do/na tuhé půdy

Pozn. * MPN = *Most Probable Number*, tj. nejpravděpodobnější počet mikroorganismů

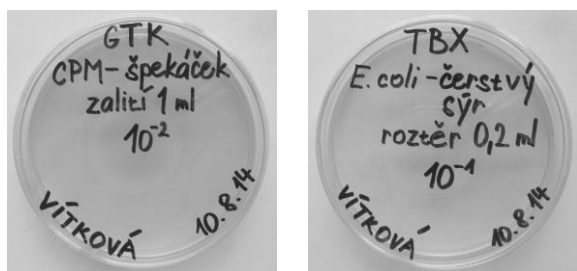
4.1.1. Kvantitativní metody

Cílem kvantitativních metod kultivace je co nejpřesnější **stanovení počtu mikroorganismů** (všech mikroorganismů, vybraných skupin či určitého druhu) ve vyšetřovaném vzorku. Výsledkem je při použití plotnových metod konkrétní hodnota vyjádřená jako **počet KTJ v 1 ml či 1 g vzorku** (KTJ = kolonie tvořících jednotek, angl. *CFU = Colony Forming Unit*).

4.1.1.1. Očkování zaléváním do tuhých agarových půd – metoda zalití

V rutinní potravinářské praxi se tento způsob inokulace používá nejčastěji. Postupuje se tak, že se každé zvolené ředění vzorku napipetuje sterilní pipetou souběžně do dvou prázdných, řádně označených Petriho misek, a to v množství 1 ml. Při očkování více ředění za sebou, musí být každé naočkováno jinou sterilní pipetou, totéž platí při očkování více vzorků. Inokulum v Petriho miskách se do 15 minut přelije rozpuštěnou agarovou půdou vytemperovanou na 45 ± 2 °C v takovém množství, aby se vytvořila vrstva agaru o tloušťce asi 2 – 3 mm. Bezprostředně poté se rozehřátá půda s inokulem pečlivě promíchá krouživými pohyby, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení mikroorganismů ve hmotě půdy. Po promíchání se Petriho misky umístí na chladnou vodorovnou plochu, kde se půda ponechá zchladnout a ztuhnout. Ztuhlé misky ukládáme do termostatu dnem vzhůru.

*Je-li ve zkoušeném vzorku očekávána přítomnost bakterií, jejichž kolonie rostou plazivě (např. bakterie rodu *Proteus*, či některé druhy rodu *Bacillus*), hrozí nebezpečí, že na vlhkém povrchu vyrostou rozlézavé kolonie a povlaky znemožňující počítání kolonií. V takovém případě se přelije utuhlá první vrstva půdy malým množstvím (asi 5 ml) téže sterilní půdy nebo sterilního agaru, opět o teplotě 45 ± 2 °C. Tím se vytvoří tenká vrstva pokrývající původní povrch a povrchové povlaky se nevytvoří. Opakované přelítí se provádí např. v případě zalévání agary VČŽG nebo VČŽL.*



Obrázek 6: Popis misek – kvantitativní stanovení.

Při kvantitativním stanovení uvádíme všechny potřebné údaje (živné médium, druh stanovení, vyšetřovaný vzorek, použitá metoda kultivace, datum vyšetření a jméno osoby, která vyšetření provedla) na víčko Petriho misky.

minut při běžné teplotě v laboratoři, tím dojde k vsáknutí inokula do půdy. Poté se uloží do termostatu dnem vzhůru. Výjimkou jsou misky s agary určenými pro kultivaci plísní, které se ukládají víčkem vzhůru. Každé ředění vzorku se dává samostatnou sterilní pipetou souběžně na dvě řádně označené agarové plotny, při roztírání se použije pro každé ředění či vzorek jiná sterilní hokejka.

4.1.1.3. Očkování do tekutých půd – metoda MPN

Tento způsob očkování se používá při stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (metoda MPN – angl. *Most Probable Number*). Metoda MPN se používá pro stanovení počtu mikroorganismů ve vzorcích, kde se očekává jejich velmi nízký počet (méně než 10 bakterií v 1 ml nebo 100 bakterií v 1 g). Série zkumavek naplněných 10 ml živného bujónu se zaočkují 1 ml příslušného ředění vzorku. Podle počtu zkumavek v každé sérii rozlišujeme test třízkumavkový, pětizkumavkový nebo desetizkumavkový. Po inkubaci se u jednotlivých sad spočítají počty zkumavek s viditelným růstem bakterií (zákal, změna barvy média, tvorba plynu apod.), a to se vyhodnotí pomocí statistických tabulek. Výsledkem je stanovení *pravděpodobného počtu mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vyšetřovaného vzorku*.

Detailní postup provedení metody MPN uvádí skriptu Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. Metody stanovení mikroorganismů v potravinách.

4.1.2. Kvalitativní metody

Kvalitativní metody kultivace slouží k **průkazu přítomnosti či absence konkrétních druhů mikroorganismů** ve vyšetřovaných vzorcích. Kvalitativní průkaz se skládá z *pomnožení vzorku* v tekutém pomnožovacím médiu a jeho následném *vyočkování* na pevné selektivní nebo selektivně diagnostické půdy. Výsledkem vyšetření je *nárůst charakteristických (suspektních) kolonií*, tj. kolonií s morfologií typickou pro daný druh či skupinu mikroorganismů. Posledním krokem kvalitativního vyšetření je *konfirmace*, neboli potvrzení přítomnosti hledaného mikroorganismu, při které se používají některé speciální kultivační techniky.

4.1.2.1. Jednostupňová kultivace

Při jednostupňové kultivaci se příslušné množství vyšetřovaného vzorku (obvykle 25 g nebo 25 ml) sterilně vloží do vhodné kultivační nádoby (pevné vzorky do sterilního homogenizačního sáčku, tekuté vzorky do skleněných vzorkovnic). Vzorek se zalije sterilním pomnožovacím médiem v poměru 1:9; pevné vzorky homogenizujeme, tekuté důkladně

4.1.1.2. Očkování roztěrem na povrch tuhých agarových půd – metoda roztěru

V tomto případě se k očkování používají Petriho misky naplněné příslušnou živnou půdou. Vlastní očkování se provádí tak, že se inokulum nanese sterilní pipetou v množství 0,1 ml nebo 0,2 ml (dle použité metodiky) příslušného ředění vzorku nebo přímo tekutého vzorku a co nejrychleji se roztírá pomocí sterilní zahnuté tyčinky ze skla nebo plastu (hokejky) po povrchu předsušeného agaru, až není tekutina na povrchu půdy viditelná. Zavřené misky se nechají stát asi 15



Obrázek 7: Popis misek – kvalitativní stanovení.

Při kvalitativním stanovení uvádíme všechny potřebné údaje na **dno** Petriho misky.

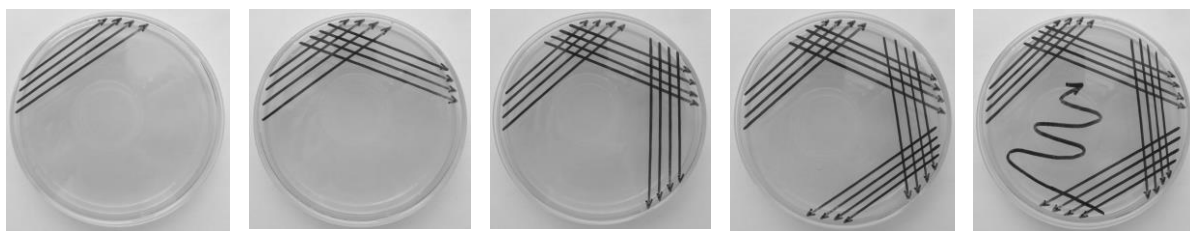
promícháme. Množství odebíraného vzorku, kultivačního média i podmínky inkubace (tj. teplota, doba a složení atmosféry) jsou dány příslušnou metodikou. Po inkubaci provedeme vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou nebo skleněnou tyčinkou na povrch vhodné selektivní či selektivně diagnostické pevné půdy a sledujeme nárůst suspektních kolonií.

Příkladem jednostupňové kultivace je pomnožení vzorků v selektivních bujonech při průkazu bakterií r. Campylobacter (bujon podle Boltona), E. coli O157 (modifikovaný bujon TSB + N) či Yersinia enterocolitica.

4.1.2.2. Dvoustupňová kultivace

Při průkazu některých významných patogenních mikroorganismů (např. salmonel či *Listeria monocytogenes*) se používá kultivace dvoustupňová. V prvním stupni se kultivace vzorku provádí v neselektivní půdě (tzv. *předpomnožení*, např. pufrovaná peptonová voda) nebo půdě se sníženým obsahem inhibitorů (*primární pomnožení*, např. poloviční bujon podle Fräsera). Tento stupeň se zařazuje z důvodů oživení – *resuscitace* – mikroorganismů, které mohou být částečně poškozeny vlivem technologických procesů při výrobě potravin (subletální poškození bakterií). Následuje druhý stupeň, který představuje *sekundární pomnožení* v tekuté selektivní půdě, kam sterilní pipetou přenášíme předepsané množství předpomnoženého vzorku. Vyočkování na selektivně diagnostické půdy se provádí ze druhého, případně prvního i druhého stupně.

V případě průkazu salmonel se vzorek pomnožuje nejprve v neselektivním bujonu (pufrovaná peptonová voda), poté v bujonech selektivních (Rappaport Vassiliadis sója médium a Mueller-Kauffman tetratiónát novobiocin médium). Při průkazu Listeria monocytogenes se v primárním pomnožení používá poloviční bujon podle Fräsera, v sekundárním pak bujon podle Fräsera s plným obsahem všech jeho složek. Dále se dvoustupňová kultivace používá např. při průkazu Cronobacter sakazakii a dalších.

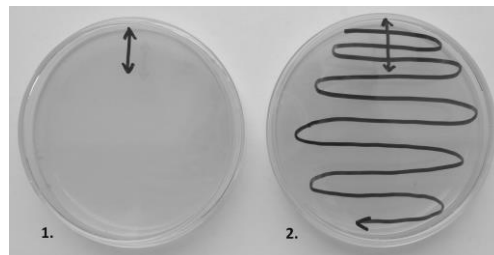


Obrázek 8: Postup rozočkování bakteriologickou kličkou (tzv. křížový roztěr).

4.1.2.3. Rozočkování

Principem rozočkování (nebo též vyočkování) je zředování mikrobiální směsi postupným čárkováním po povrchu agarové plotny, čímž získáme jednotlivé kolonie mikroorganismů. Je to univerzální metoda použitelná pro bakterie, kvasinky i plísně. Vlastní rozočkování se provádí sterilní bakteriologickou kličkou, přičemž každý krok vyžaduje její opětovnou sterilizaci vyžháním, popř. novou sterilní kličku použijeme-li kličky plastové. Jako inokulum lze použít vybranou kolonii ze selektivní či neselektivní agarové půdy či suspenzi mikrobiální kultury z půdy tekuté. Kličkou se inokulum přenese na povrch agaru a provedou se první čáry. Poté se klička vyžhne, ochladí, miska se pootočí a rozočkování pokračuje další sérií čar. Celý postup se opakuje 3 – 4× (obrázek 8).

V mikrobiologii potravin se často k vyočkování z pomnožovacího média používá sterilní skleněná tyčinka. Postup rozředování mikrobiální směsi po povrchu pevného média je jednodušší než při křížovém roztěru (obrázek 9).



Obrázek 9: Postup vyočkování skleněnou tyčinkou.

4.2. Inkubace

Růst mikroorganismů v živném médiu je ovlivněn především teplotou, složením kultivační atmosféry, vlhkostí a dobou kultivace.

4.2.1. Teplota

Po zaočkování půdy musíme nechat mikroorganismy inkubovat v termostatech při jejich optimální teplotě růstu. Naočkované Petriho misky kultivujeme převrácené dnem vzhůru, tj. s víčkem na podložce, abychom se vyhnuli stékání zkondenzovaných par z víčka na kulturu. Zkumavky se staví do košíků či stojánků.

Teplota je v termostatu udržována automaticky na zvolené hodnotě odpovídající potřebám stanovované skupiny mikroorganismů, obecně se jedná o následující hodnoty:

- kvasinky 26 – 30 °C (některé rody 18 – 20 °C)
- plísně 25 ± 1 °C
- mezofilní bakterie 30 – 37 °C
- psychofilní bakterie 20 °C, ale i méně (např. 6 °C)
- termofilní bakterie 50 – 55 °C.

Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení mikroorganismů v potravinách je pro *každý druh normativně stanovena příslušná teplota kultivace*, která se nemusí shodovat s optimální teplotou růstu pro daný mikroorganismus.

4.2.2. Vztah ke kyslíku

Mikroorganismy se značně liší svými nároky na přítomnost nebo nepřítomnost kyslíku. V závislosti na stupni tolerance vůči molekulárnímu kyslíku je možno mikroorganismy klasifikovat do následujících skupin:

- **aerobní mikroorganismy** vyžadují pro svůj metabolismus jako konečný akceptor elektronů kyslík (např. rody *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Mycobacterium*);
- **fakultativně anaerobní mikroorganismy** mohou růst v aerobních i anaerobních podmínkách (např. rody *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*);
- **mikroaerofilní mikroorganismy** nerostou dobře za přítomnosti vzdušného kyslíku, vyžadují specifické složení atmosféry (např. rody *Campylobacter*, *Lactobacillus*);
- **anaerobní mikroorganismy** vyžadují absenci kyslíku v prostředí, kyslík na ně působí toxicky a v jeho přítomnosti odumírají (např. rod *Clostridium*).

4.2.2.1. Aerobní kultivace

Ve většině případů probíhá kultivace za aerobních podmínek, vhodných jak pro aerobní, tak i fakultativně anaerobní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy kultivujeme na agarových plotnách či ve zkumavkách, přičemž způsob očkování zalitím nebo roztěrem není rozhodující, protože kyslík difuzí proniká tenkou vrstvou agarové půdy až ke dnu Petriho misky. Při pomnožování mikroorganismů ve větším objemu tekutého živného média je potřeba sytit půdu kyslíkem, což se prakticky provádí *třepáním* na automatických třepačkách nebo *aerací*.

4.2.2.2. Anaerobní a mikroaerofilní kultivace

Mikroaerofilní a anaerobní mikroorganismy rostou za nepřítomnosti nebo snížení tenze vzdušného kyslíku. Toho lze docílit různými způsoby:

- *očkováním* mikroorganismů vpichem nebo rozmícháním do svislých agarů nebo do vysokých vrstev kapalin o malém povrchu;
- odstraněním kyslíku *povařením* (tzv. *regenerace půdy*), půda se těsně před použitím zahřívá 20 min. ve vroucí vodní lázni, ochladí se a zaočkuje. Pro omezení dalšího přístupu

vzduchu se půda převrství sterilním parafinovým olejem. Při očkování sporotvorných mikroorganismů není potřeba vyvařenou půdu před očkováním zchlazovat, zchladíme ji až po ukončení celého postupu.

- nejčastěji se používá kultivace ve vzduchotěsně uzavřených nádobách s řízenou atmosférou – *anaerostatech* či *anaerobních komorách*. Kyslík je z těchto zařízení odstraňován např. chemickou reakcí, kdy snadno oxidovatelné látky rychle spotřebují přítomný kyslík, odčerpáním vývěvou či nahrazením kyslíku jinými plyny (N_2 , CO_2 , H_2).



Obrázek 10: Anaerostat s vyvíječem plynů.

Vyvíječ je sáček, ve kterém je po aplikaci vody zahájena chemická reakce spotřebovávající kyslík (O_2) z atmosféry.

4.2.3. Relativní vlhkost

Relativní vlhkost má význam zejména při dlouhodobé kultivaci, případně při kultivaci termofilních druhů nebo některých speciálních kultivačních metodách. Nadměrnému vysychání lze předcházet vložením odpařovací misky s vodou do termostatu, dále obalením Petriho misek parafilmem a jejich ukládáním do vlhkých komůrek (uzavřená nádoba, na jejímž dně je kádinka s vodou) nebo zabalením kultivačních nádob do polyetylenových sáčků či fólií.

4.2.4. Doba kultivace

Doba kultivace závisí na stanovované skupině mikroorganismů a použitém druhu živné půdy. Jestliže je nedostatečná, bývají kolonie příliš malé a mohou být přehlédnuty, často také postrádají morfologické vlastnosti typické pro daný druh. V případě diagnostických půd se při zkrácené kultivaci nestačí rozvinout charakteristické indikátorové reakce. Naopak příliš dlouhá kultivace může vést k přerůstání a srůstání kolonií, vysychání půdy a k nežádoucím změnám indikátorových reakcí v diagnostických půdách.

4.3. Uchovávání a ožiování mikrobiálních kultur

4.3.1. Uchovávání na šikmých agarrech

Pro běžnou potřebu uchováváme mikroorganismy ve zkumavkách na šikmých agarrech, které ukládáme ve stojancích či úchovných boxech v chladničkách při teplotě 4 – 6 °C. Mikrobiální kultura na šikmém agaru si zachovává životaschopnost asi po dobu 2 – 6 měsíců, poté dochází k vysychání půdy, postupnému odumírání mikroorganismů a kultury je nutné přeočkovat. Pro přípravu šikmých agarů pro uchovávání bakterií se běžně používají základní půdy (GTK agar, živný agar), v případě kvasinek a plísní např. Sabouradův agar.

Aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy očkujeme hadovitým pohybem **na povrch** šikmého agaru. U anaerobních nebo mikroaerofilních bakterií používáme místo očkování na šikmý agar **vpich** do vysoké vrstvy agarové půdy ve zkumavce. Zátky zkumavek je nutné zaparafinovat či převrstvit narostlé kultury na šikmém agaru sterilním parafinovým olejem tak, aby olej o 1 cm převyšoval horní okraj agaru.

U kultur dlouhodobě uchovávaných na šikmých agarrech je vhodné nejdříve provést **oživení** pasážováním přes neselektivní živné bujóny (masopeptonový bujon, GTK bujon, peptonová voda) a teprve potom vyočkovat kulturu na pevnou půdu.

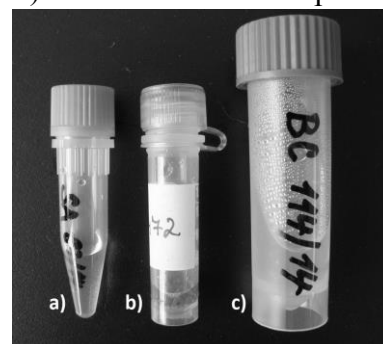
4.3.2. Lyofilizace

K dlouhodobému uchovávání lze použít také metodu lyofilizace. Suspenze buněk nebo spor v ochranné kapalině bohaté na bílkoviny (bujon, krevní sérum, syrovátka, atd.) se přenesou do sterilních ampulek, zmrazí se v lyofilizačním přístroji na -30 až -80 °C a vysuší za vysokého vakua. Pro zachování vakua se ampulky zataví. Během lyofilizace sice dochází k odumření části bakteriálních buněk, avšak přežívající buňky jsou životaschopné po řadu let. Před použitím je nutno lyofilizované kultury oživit pasážováním v tekuté živné půdě za optimálních podmínek.

4.3.3. Uchovávání v zmrazeném stavu

Nejvhodnějším způsobem dlouhodobého uchovávání mikroorganismů je uchovávání v uzavřených mikrozkušavkách v zmrazeném stavu v hlubokomrazících boxech nebo v prostředí tekutého dusíku (-80 °C, respektive -150 až -200 °C). K zamrazování lze použít buď komerčně vyráběné **úchovné kryobanky** s porézními kuličkami a živným médiem (např. ITEST kryobanka) nebo lze přímo v laboratoři připravit **uchovávací půdu s glycerolem** (20 – 50%) a tu rozplnit do mikrozkušavek se šroubovacím víčkem a sterilizovat.

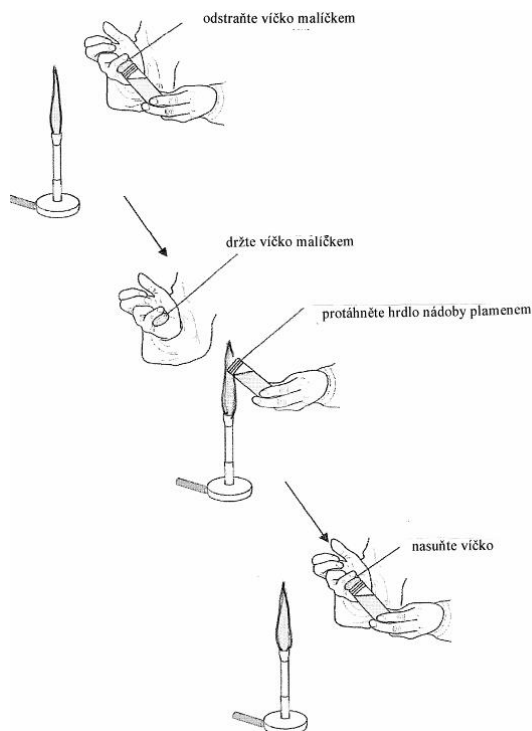
Sterilní kličkou se nabere 18 – 24hodinová kultura bakterií a opatrně se resuspenduje (o stěnu) v živném médiu v mikrozkušavce. Hustota suspenze by měla odpovídat 3. – 4. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. V závislosti od použitého způsobu zamrazení a teploty úchovy mohou bakteriální kultury přežít až několik let. Vyočkování se opět provádí sterilní kličkou, kulička či malé množství glycerinového média se přenesou do vhodného tekutého média nebo na pevnou půdu a kultivuje se běžným způsobem.



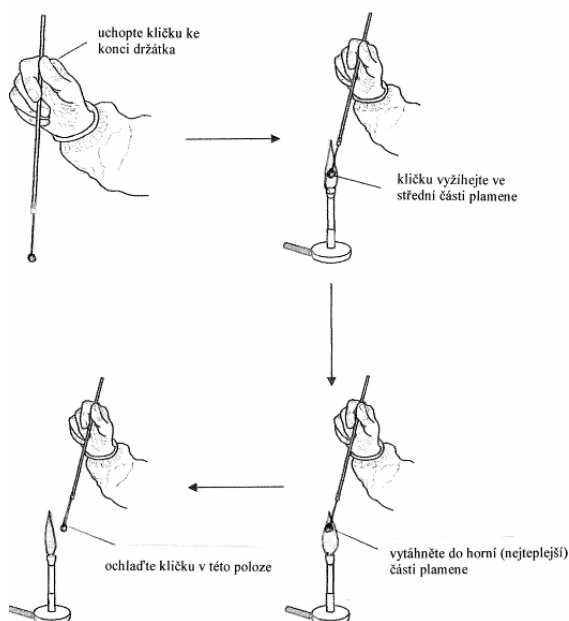
Obrázek 11: Způsoby uchovávání mikroorganismů.

Legenda:

- a – uchovávací půda s glycerolem
- b – kryobanka s porézními kuličkami
- c – šikný agar v plastové zkumavce



Obrázek 12: Opalování zkumavek při kultivaci bakterií.



Obrázek 13: Sterilizace kovové bakteriologické kličky.

Pozn.: V současnosti laboratoře upřednostňují používání sterilních plastových jednorázových kliček, které se neopalují.

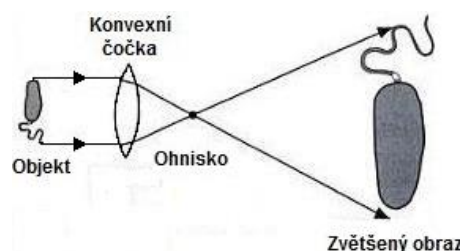
5. ZÁKLADY MIKROSKOPIE

Mikroskopie je technologie umožňující zviditelnit velmi malé předměty lidskému oku. Je jednou z hlavních pomůcek využívaných mikrobiologií při analýze mikroorganismů. Mikroskopické hodnocení hraje důležitou roli i v mikrobiologii potravin.

Velikost mikroorganismů určuje potřebný stupeň zvětšení nezbytný pro jejich pozorování. Většina mikroorganismů (bakterie, kvasinky, plísně) je viditelná při zvětšení 1000× a může být pozorována v optickém mikroskopu. Při pozorování virů je potřeba větší zvětšení a také vyšší rozlišení, proto se k jejich vizualizaci používají mikroskopy elektronové.

5.1. Základní principy

Bez ohledu na typ mikroskopu, závisí vznik jasného obrazu na třech faktorech – zvětšení, kontrastu a rozlišení. Primární funkcí mikroskopu je **zvětšení** obrazu daného objektu. Každá konvexní čočka může zvětšit obraz objektu lomem (refrakcí), kdy ohýbá rovnoběžné paprsky světla z objektu tak, že se setkávají v jednom bodě, tzv. *ohnisku*. Za ohniskem se vytváří zvětšený a převrácený obraz objektu (obrázek 14). Úroveň zvětšení lze zvýšit použitím více konvexní čočky nebo přiblížením objektu k čočce.



Obrázek 14: Zvětšení obrazu objektu konvexní čočkou.

(Mehrotra and Sumbali, 2009 – upraveno)

Kontrast se vztahuje k rozdílu intenzity světla. Aby mohl být objekt pozorován mikroskopem, musí mít určitý stupeň kontrastu s okolním médiem. S výjimkou intenzivně pigmentovaných buněčných struktur, absorbují biologické objekty pouze velmi malé množství viditelného světla a proto jsou obvykle velmi málo kontrastní. Abychom získali dostatečný obraz, je nezbytné jejich obarvení vhodnými barvivy, které se váží selektivně buď na celé buňky nebo na jejich struktury. Kontrast je tedy vlastnost studovaného objektu.

Oproti tomu **rozlišení** je vlastnost systému čoček používaných k zobrazení objektu. Za účelem vytvoření jasného zvětšeného obrazu, musí mít mikroskop takovou rozlišovací schopnost, aby



Obrázek 15: Rozlišení mikroskopu.

byl schopen odlišit od sebe dva body v obraze, které jsou velmi blízko sebe. Při nízkém rozlišení splývají dva body dohromady, při vyšší rozlišovací schopnosti mikroskopu můžeme ve vzorku pozorovat více detailů (obrázek 15).

Rozlišovací schopnost mikroskopu je určena třemi faktory:

1. *velikost čočky objektivu* – větší čočky mají větší rozlišení (prostupuje větší kužel světla)
2. *vlnová délka světla procházejícího vzorkem* – při průchodu vzorkem se světlo ohýbá, tato difrakce je závislá na vlnové délce, při kratších vlnových délkách je rozlišovací schopnost mikroskopu lepší. Při použití modrého světla (vlnová délka cca 400 nm) je rozlišení světelného mikroskopu lepší než při použití světla červeného (cca 700 nm). V elektronové mikroskopii se používá elektromagnetické záření o výrazně kratší vlnové délce než má viditelné světlo. Proto má elektronový mikroskop tak velkou rozlišovací schopnost.
3. *index lomu materiálu mezi objektivem a vzorkem* – čím vyšší je index lomu, tím vyšší je rozlišení. Obvykle je prostor mezi vzorkem a přední částí objektivu vyplněn vzduchem. Index lomu vzduchu je asi 1,0. V případě imerzních objektivů se do prostoru mezi vzorkem a objektivem aplikuje imerzní olej, jehož index lomu je asi 1,5.

5.2. Druhy mikroskopie

Volba konkrétního mikroskopu závisí na velikosti pozorovaného objektu, množství detailů, které chceme zobrazit, povaze vzorku a účelu mikroskopického pozorování. Přehled základních typů mikroskopie je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Základní druhy mikroskopie – charakteristika a rozdíly.

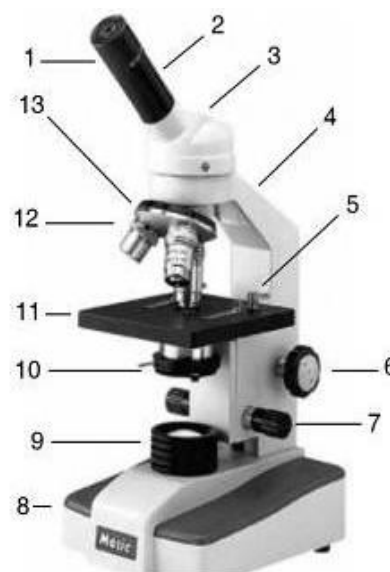
Typ mikroskopie	Maximální zvětšení	Rozlišení	Rozdíly	Zobrazení	Hlavní použití
<i>Světelná mikroskopie</i>	1 500×	100-200 nm	jako zdroj slouží viditelné světlo	obarvené mikroorganismy jsou pozorovány proti světlému pozadí	hodnocení morfologie mikroorganismů
<i>Mikroskopie v temném poli (v zástinu)</i>	1 500×	100-200 nm	speciální kondenzor nepropouští středové paprsky, objekt je osvětlen pouze ze stran, do objektivu vstupují paprsky odražené či rozptýlené objektem	pozorujeme světlý vzorek proti tmavému pozadí	hodnocení živých, pohyblivých mikroorganismů, které se obtížně barví
<i>Fluorescenční mikroskopie</i>	1 500×	100-200 nm	jako zdroj slouží UV světlo vyvolávající emisi světla z fluorescenčních látek ve vzorku	mikroorganismy fluoreskují proti tmavému pozadí	detekce mikroorganismů za použití fluorescenčních barviv nebo fluorescenčně znač. protilátek
<i>Mikroskopie s fázovým kontrastem</i>	1 500×	100-200 nm	pomocí speciálních kondenzorů a prstencových clon se posune fáze přímého a difrakčního vlnění	vzorek se zobrazí v různých stupních jasu a kontrastu (světlé a tmavé části)	hodnocení buněčných struktur v živých buňkách větších mikroorganismů bez obarvení
<i>Transmisní elektronová mikroskopie</i>	500 000× až 1 000 000×	1-2 nm	elektronový paprsek o krátké vlnové délce proniká ultra tenkým řezem	střídání světlých a tmavých oblastí odráží vnitřní struktury buňky	hodnocení virů a vnitřní detailní struktury buněk; vzniklý obraz není trojrozměrný
<i>Skenovací elektronová mikroskopie</i>	10 000× až 1 000 000×	1-10 nm	elektronový paprsek o krátké vlnové délce postupně projíždí (rastruje) vzorkem	pozorujeme povrch mikroorganismu	hodnocení vlastností povrchu virů a dalších mikrobů; obraz je trojrozměrný

5.3. Světelný mikroskop

První světelné mikroskopy, tzv. *jednoduché mikroskopy*, obsahovaly pouze jedinou čočku. Běžně používané *složené mikroskopy*, obsahují tři soustavy čoček – objektiv (umístěný těsně nad vzorkem), okulár (umístěný těsně před okem) a kondenzor (umístěný pod vzorkem). Složené mikroskopy mohou být monokulární či binokulární.

Každý mikroskop se skládá z mechanické a optické části. **Mechanickou část** tvoří pevný stativ (noha mikroskopu a nosič tubusu), tubus, stolek se svorkami na přichycení preparátu, mikrometrický a makrometrický šroub (umožňující posun tubusu či stolku ve směru optické osy) a revolverové zařízení (umožňující výměnu objektivů).

Optická část je tvořena objektivem (zajišťujícím zvětšení a rozlišení), okulárem (zajišťujícím zvětšení) a kondenzorem (zajišťujícím maximální osvětlení vzorku). Dále je doplněna osvětlovacím zařízením, které tvoří světelný zdroj a zrcátko. Světelným zdrojem je obvykle nízkovoltová žárovka s transformátorem (regulace intenzity světla). Světlo je ze zdroje přes kolektor a kolektorovou clonu usměrňováno buď na zrcadlo mikroskopu nebo přímo na kondenzor. Cílem je soustředění světelného zdroje a clon doprostřed zorného pole mikroskopu (seřízení optické osy).



Obrázek 16: Světelný mikroskop.
(Rosina *et al.*, 2013 – upraveno)

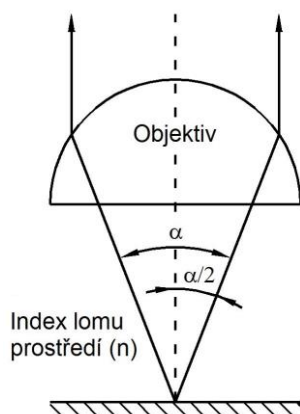
Legenda:

1 okulár, 2 tubus okuláru, 3 hlavice, 4 rameno mikroskopu, 5 držák preparátu, 6 makrometrický šroub, 7 mikrometrický šroub, 8 noha mikroskopu, 9 kolektor osvětlení, 10 kondenzor, 11 pracovní stolek, 12 objektivy, 13 otočná hlavice pro objektivy (revolverové zařízení)

5.3.1. Objektiv

Volbou objektivu ovlivníme kvalitu obrazu a rozlišovací schopnost mikroskopu. Nejdůležitější parametry každého objektivu jsou uvedeny na jeho plášti, a to:

- zvětšení / numerická apertura (např. 100/1,4)
- korekce pro délku tubusu / hodnota pro přípustnou tloušťku krycího skla (např. 160/0,1)



Obrázek 17: Numerická apertura.
(Vytřasová a Bílková, 1998 – upraveno)

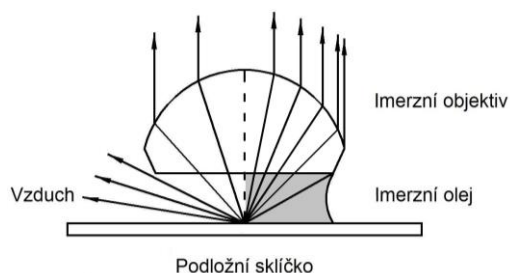
Numerická apertura (A) vyjadřuje schopnost objektivu zachytit co nejširší kužel paprsků světla, které prochází objektem. Významně ovlivňuje rozlišovací schopnost mikroskopu. Vztah mezi numerickou aperturou a indexem lomu prostředí (obrázek 17) lze vyjádřit takto:

$$A = n \cdot \sin \alpha/2$$

a je úhel svíraný paprsky vycházejícími z objektu, které jsou zachyceny objektivem

n je index lomu prostředí

U většiny objektivů nepřesahují hodnoty numerické apertury 1,0. Jedná se o tzv. **suché objektivy**, kde prostředí mezi objektivem a preparátem tvoří vzduch (index lomu je 1,0).



Obrázek 18: Imerzní objektiv „s“ a „bez“ použití imerzního oleje.
(Mehrotra and Sumbali, 2009 – upraveno)

Objekty menší než $0,22 \mu\text{m}$ mohou být pozorovány pouze **imerzním objektivem** za použití imerzního oleje. Imerzní objektiv je velmi úzký, bez imerzního oleje se většina světla ohýbá mimo něj (obrázek 18).

Imerzní olej nejen že zabraňuje ztrátě světla, současně zvyšuje numerickou aperturu objektivu, protože index lomu imerzích olejů dosahuje hodnot až 1,5. Mezi nejpoužívanější imerzní oleje patří olej z cedrového dřeva či různé minerální oleje.

Pomocí numerické apertury lze vypočítat i tzv. **užitečné zvětšení mikroskopu**, které je rovno 1 000-násobné hodnotě apertury (např. $A = 1,4$ proto užitečné zvětšení je 1 400×).

Rozlišovací schopnost objektivu (a) – tedy nejmenší rozměr, který lze daným objektivem rozlišit, je určena numerickou aperturou objektivu a vlnovou délkou použitého světla (λ):

$$a = \lambda / A$$

5.3.2. Okulár

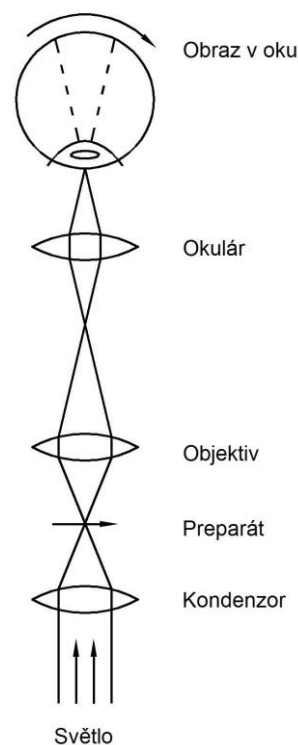
Úkolem okuláru je zvětšit obraz vytvořený objektivem pro pozorování okem. Okuláry se skládají z několika čoček a mohou mít různou konstrukci. Na plášti okuláru je uvedeno jeho zvětšení (5× až 20×), index zorného pole S a typ. Objektiv vždy používáme s odpovídajícím okulárem.

Vynásobíme-li zvětšení použitého objektivu a zvětšení okuláru, získáme tzv. **celkové zvětšení mikroskopu**. Při výběru vhodného okuláru musíme dbát na to, aby nedošlo k překročení užitečného zvětšení mikroskopu. Např. použijeme-li imerzní objektiv se zvětšením 100× a hodnotou $A = 1,25$ (užitečné zvětšení je 1 250×), volíme k němu okulár se zvětšením 12,5× (celkové zvětšení je opět 1 250×). Slabší okulár neumožní plně využít rozlišovací schopnost objektivu. Silnější okulár poskytuje „prázdné“ zvětšení, které nezobrazí více detailů, naopak může snižovat ostrost obrazu.

5.3.3. Kondenzor

Kondenzor tvoří soustava dvou nebo tří čoček. Jeho úkolem je soustředit co největší část světelných paprsků ze světelného zdroje na preparát. Kondenzor má tzv. **aperturní (irisovou) clonu**, která společně s vertikálním posunem kondenzoru slouží k nastavení apertury kondenzoru na stejnou hodnotu, jako je apertura použitého objektivu. Obecně platí, že při použití slabšího objektivu je kondenzor snížen a irisová clona stažena. Naopak u silnějšího objektivu má kondenzor vyšší polohu a clona je rozevřená.

Při práci s imerzním objektivem se někdy aplikuje imerzní olej i mezi podložní sklíčko a kondenzor (hodnota A kondenzoru je maximálně 0,9).



Obrázek 19: Dráha světla v optickém mikroskopu.
(Kumar, 2012 – upraveno)

6. MORFOLOGIE MIKROORGANISMŮ

Morfologické znaky mikroorganismů dělíme podle použitých metod na **makroskopické** (pozorování kolonií mikroorganismů narostlých na kultivačních médiích pouhým okem) a **mikroskopické**, které jsou viditelné při pozorování mikroorganismů ve světelném nebo elektronovém mikroskopu.

6.1. Makroskopické metody

Makroskopické pozorování kolonií mikroorganismů na agarových půdách nám přináší cenné informace o povaze mikroorganismů i čistotě kultury. Pečlivým pozorováním kolonií můžeme podle jejich vzhledu, pigmentace, konzistence a interakce s kultivačním médiem orientačně identifikovat rod, v některých případech i druh bakterií.

6.1.1. Růst mikroorganismů v tekutém médiu

Při růstu mikroorganismů v tekutém médiu si všímáme následujících znaků:

- **vzhled povrchu** – růst plísni se projeví vytvořením kožovitého povlaku (může být vláknitý či sametový), kvasinky rostou ve formě křísu (bílé zvrásnělé blanky), povrchovou blanku podobnou křísu mohou tvořit i některé bakterie (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.);
- **tvorba zákalu** – zákal může být difuzní (koky či drobné tyčinkovité bakterie), vločkovitý (*Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp.) nebo se tvoří sedlina, která poměrně dobře lpí na dně kultivační nádoby (*Lactobacillus* spp., kvasinky);
- **tvorba sedimentu** – vytvořený sediment může být zrnitý, vločkovitý, hlenovitý, roztřepatelný, neroztřepatelný; některé kvasinky tvoří po delší době kultivace kašovitý sediment (tzv. mázdra) nebo kašovitý prstenec podél stěn zkumavky či baňky;
- **vůně či zápach** – může být fekální, nasládlý, amoniakální, kvasničný, atd.

Povrchový růst mikroorganismů v tekutém médiu lze ovlivnit přidávkou neionogenních povrchově aktivních látek (např. Tweenu 80), které zlepšují smáčitelnost buněk. Tuto skutečnost je nutno brát při hodnocení růstu na zřetel.













6.1.2. Vzhled kolonií na pevné půdě

Při posuzování vzhledu kolonií pozorujeme následující ukazatele:

- **profil, tvar a okraje** kolonie (viz obrázek 20);
- **velikost** – kolonie mohou mít různou velikost od drobných (např. enterokoků) až po tzv. obrovské (např. kolonie *Bacillus cereus*, kvasinek a plísni);
- **barva** – sledujeme barvu kolonií, které mohou být např. bílé, žluté, krémové, oranžové, černé, průhledné; je třeba odlišit barvu kolonie (ta je obvykle dána chemickými změnami složek živného média) od produkce pigmentu (přirozená vlastnost některých bakterií, např. *S. aureus*), kterou můžeme pozorovat pouze při růstu mikroorganismů na základních a obohacených médiích, pigmentace se zvýrazní nabráním bakteriální kultury kličkou;
- **konzistence kolonií** – hladká, slizovitá, moučnatá, kožovitá, atd.;
- **interakce s kultivačním médiem** – hemolýza, biochemické reakce v okolí kolonií (např. precipitace, projasnění), zbarvení okolí kolonií, atd.;
- **rychlost růstu** – některé mikroorganismy rostou pomalu, až několik týdnů (mykobakterie), jiné naopak rychle do 18 hodin (např. většina střevních bakterií).

Obecně platí, že vzhled kolonie je také výrazně ovlivněn stářím kultury a kultivačními podmínkami. Mladší kolonie bývají hladší s rovnějšími okraji a teprve později se může objevit rýhování, zdrsnění, propadlý střed a různé nerovnosti. Také složení živného média

silně ovlivňuje vzhled kolonií, současně může docházet k již zmíněným interakcím mezi kolonií a živnou půdou. Proto je při makroskopickém pozorování kolonií vždy nezbytně *nutné uvést podmínky kultivace* (teplota a především doba kultivace) a *použité kultivační médium*.

profil	tvar	okraj	
			
ploché	okrouhlý	vroubkovaný	nepravidelný <i>caput medusae</i>
			
zvýšený			
			
vypouklý	laločnatý	koncentrická stavba	vláknitý
			
pupkovitý			
			
knoflíkovitý	sektorový	svraštělý	rhizoidní
			
bradavčitý			

Obrázek 20: Základní morfologické znaky kolonií – příklady. (Havlová *et al.*, 1993 – upraveno)

6.2. Mikroskopické metody

Mikroskopickými metodami zjišťujeme tvar, velikost, uspořádání a barvitelnost bakterií v preparátu. Dále lze mikroskopickým pozorováním posoudit přítomnost některých buněčných struktur či pohyblivost buněk. Podle těchto morfologických znaků můžeme orientačně určit čeleď, rod nebo skupinu, do které barvené bakteriální kultury náleží. Mikroskopickou metodu lze použít pro *kvantitativní* nebo *kvalitativní* stanovení bakterií.

6.2.1. Kvantitativní stanovení bakterií

Metoda je používána pro rychlé orientační zjištění počtu mikroorganismů v tekutých, rozpuštěných nebo, v případě pevných matric, homogenizovaných vzorcích obsahujících větší množství mikroorganismů. Tekuté vzorky se vyšetřují přímo, ostatní se homogenizují v přesně odměřeném množství sterilního fyziologického roztoku v poměru 1:9 nebo 1:99 (tj. 1 + 9 nebo 1 + 99) tak, aby se počet mikroorganismů v zorném poli pohyboval od 10 do 100.

Praktické využití při kvantitativním hodnocení čistých mlékařských kultur - viz skriptu Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. Metody stanovení mikroorganismů v potravinách, kapitola 5.2.

6.2.1.1. Zhotovení preparátu

Na šablonu s vyznačenými čtverci o straně 1 cm se položí čisté odmaštěné podložní sklíčko, případně lze čtverce namalovat přímo na sklíčko. Mikropipetou se na každý čtverec nanese 0,01 ml vzorku nebo jeho ředění a rovnoměrně se rozetře kličkou na celou plochu čtverce. Takto připravené nátěry se suší při laboratorní teplotě na bezprašném místě. Po úplném zaschnutí se preparáty fixují trojnásobným protažením podložního sklíčka v plameni.

K přímému mikroskopickému počítání buněk lze využít také tzv. počítací komůrky (např. Bürkerova či Thomova komůrka), které mají určitou hloubku (0,02 – 0,1 mm) a dno rozdělené na čtverečky o známé velikosti, takže počítáme buňky ve známém objemu. Počítací komůrky se používají při hodnocení počtu bakterií, kvasinek a spor plísň. Pokud pozorujeme nativní preparát, je nezbytné pro dobrou rozlišitelnost buněk použít fázový kontrast.

6.2.1.2. Barvení preparátu

Připravené preparáty se barví 1 – 3 minuty roztokem barviva (např. roztokem malachitové zeleně nebo Löfflerovy methylenové modři). Poté se barvivo opláchne pod tekoucí vodou tak, aby proud vody nedopadal přímo na preparát. Oplachuje se tak dlouho, dokud z preparátu

odtéká barvivo. Zbytky vody se z okrajů sklička odstraní filtračním papírem a preparát se nechá zaschnout.

6.2.1.3. Odečítání výsledků

Preparát se prohlíží v mikroskopu imerzním objektivem (objektiv 100×, obvykle označený bílým pruhem) za použití imerzního oleje, počítá se počet bakterií v předepsaném počtu zorných polí. Mikrobiální shluky, řetízky a dvojice se pokládají za jednu jednotku. Aby se minimalizovaly rozdíly v tloušťce preparátu, prohlíží se preparát systematicky na různých místech (meandrovitý pohyb).

6.2.1.4. Výpočet konstanty mikroskopu

Nejdříve pomocí mikrometru změříme průměr zorného pole (d) a pak podle vzorce vypočteme plochu zorného pole (P).

$$P = \frac{\pi \cdot d^2}{4}$$

Dále zjistíme kolikrát je plocha zorného pole menší než plocha, na kterou byl nanesen vzorek, a to tak, že se plocha čtverce (dle použité šablony, obvykle 1 cm², tj. 100 mm²) dělí plochou zorného pole. Výsledek se dělí objemem vzorku naneseného na plochu vytýčenou šablonou (nejčastěji nanášíme 0,01 ml).

Příklad:

Průměr zorného pole je 0,206 mm, na plochu 100 mm² (plocha čtverce v mm²) se nanáší 0,01 ml neředěného vzorku (objem vzorku v ml).

$$P = \frac{\pi \cdot d^2}{4} = \frac{3,14 \cdot 0,0424}{4} = 0,033$$

- plocha čtverce se dělí plochou zorného pole: $100 : 0,033 = 3\,000$
- výsledek se dělí objemem vzorku: $3\,000 : 0,01 = 300\,000$

Výsledná konstanta mikroskopu je 300 000.

6.2.1.5. Výpočet počtu mikroorganismů

Z počtu vyšetřovaných polí a počtu mikroorganismů v nich se vypočte průměrný počet mikrobů v zorném poli. Ten se přepočte na 1 ml vzorku tak, že se násobí faktorem konstantním pro určitou optiku (= konstanta mikroskopu) a stupněm ředění vzorku. Výsledek se vždy zaokrouhlí na dvě číslice různé od nuly (jednotky a desetiny).

Příklad:

V 5-ti vyšetřovaných zorných polích jsme spočítali 12, 15, 10, 11 a 14 mikroorganismů; stanovená konstanta mikroskopu činí 300 000. Ředění vyšetřovaného vzorku je 10⁻¹ (tj. 0,1).

- průměrný počet mikroorganismů v jednom zorném poli (součet mikroorganismů se dělí počtem zorných polí): $(12 + 15 + 10 + 11 + 14) : 5 = 12,4$
- výpočet počtu bakterií v 1 ml vzorku (výsledek se násobí konstantou mikroskopu a stupněm ředění vzorku nanášeného na skličko): $12,4 \cdot 300\,000 \cdot 0,1 = 372\,000$
- úprava výsledku: $372\,000 = 370\,000 = 3,7 \cdot 10^5$ v 1 ml

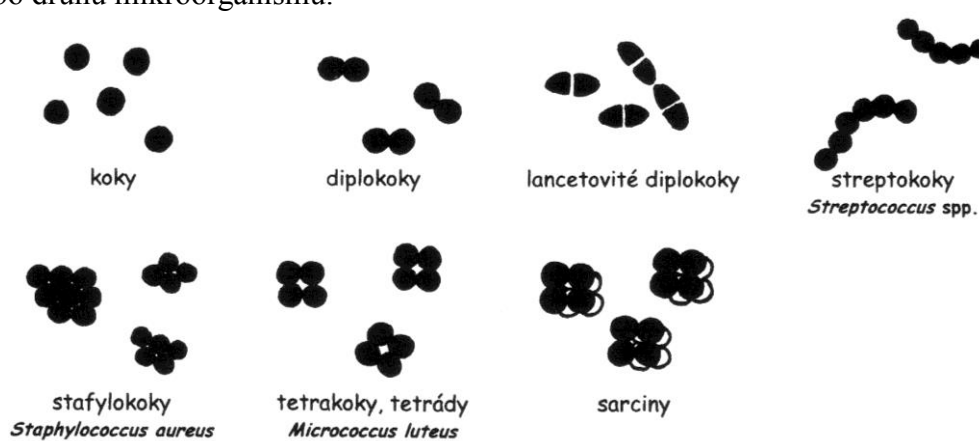
Vypočtené množství mikroorganismů činí $3,7 \cdot 10^5$ v 1 ml zkoušeného vzorku.

6.2.1.6. Spolehlivost zkoušky

Mikroskopickou metodou zjišťujeme živé, ale i část mrtvých mikroorganismů pokud jsou schopny přijímat barvivo. Kultivační metodou detekujeme pouze živé mikroorganismy a proto se výsledky obou metod liší. Mikroskopická metoda dává vždy vyšší výsledky než metoda kultivační. Výhodou mikroskopické metody je především její rychlost.

6.2.2. Kvalitativní stanovení bakterií

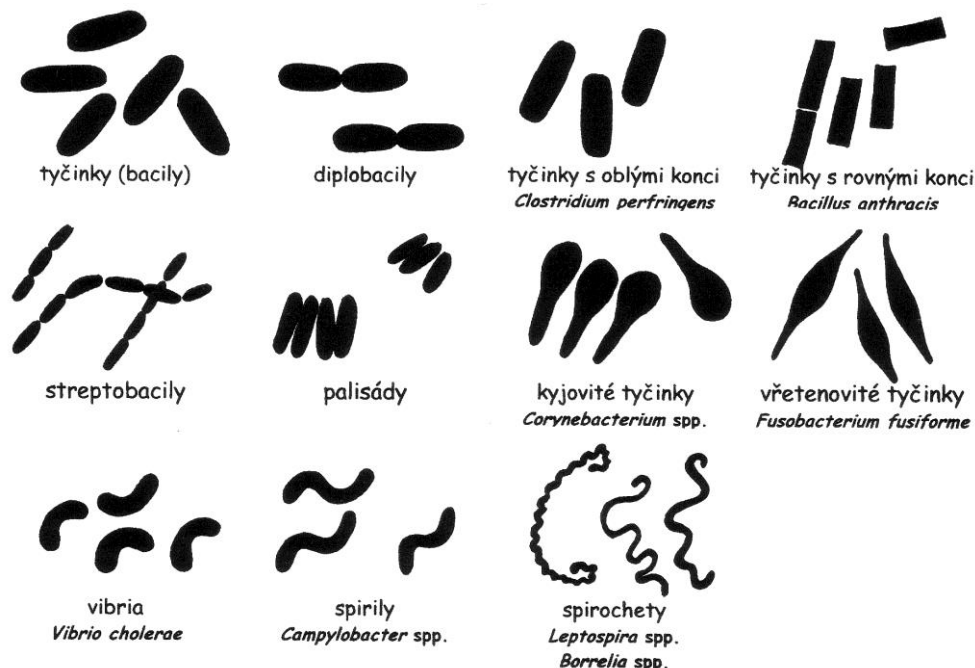
Používá se při konfirmaci suspektních kolonií vyrostlých na živných půdách, které mají podobnou nebo stejnou makroskopickou morfolologii kolonií a k orientačnímu určení čeledě, rodu nebo druhu mikroorganismů.



Obrázek 21: Základní tvary a uspořádání koků – příklady.

6.2.2.1. Morfologie bakteriálních buněk

Pomocí optické (světelné) mikroskopie jsme schopni určit nejen velikost a základní tvary mikrobiálních buněk (obrázek 21 a 22), ale také, při použití speciálních barvicích technik, např. přítomnost a uložení spor či přítomnost pouzder. Základní tvary buněk bakterií jsou – kulovitý (koky; coccus) a protáhlý (tyčinky; bacillus či bacterium). Tyčinky mohou být rovné, zakřivené (vibria, spirily, šroubovice) nebo tvoří vlákna.



Obrázek 22: Základní tvary a uspořádání tyčinek – příklady.

6.2.2.2. Zhotovení preparátu

Mikroorganismy můžeme pozorovat: a) v nativním preparátu (hodnocení morfologie kvasinek a plísní, průkaz střevních parazitů, atd.), dále b) ve vlhké komůrce a ve visuté kapce (dlouhodobé pozorování mikroorganismů, hodnocení vývoje, růstu či pohybu) nebo c) ve fixovaném barevném preparátu (hodnocení morfologie bakterií, zjištění přítomnosti spor, pouzder a dalších buněčných struktur).

Nativní preparát ukazuje skutečný tvar buněk neovlivněný fixací a barvením, můžeme v něm pozorovat i pohyb bakterií. Odmaštěné podložní sklíčko protáhneme v plameni a umístíme na tmavou podložku. Kápneme kapku sterilního fyziologického roztoku, sterilní kličkou nanese malé množství mikrobiální kultury a dobře rozmícháme. Vzniklá suspenze nesmí být příliš hustá. K okraji kapky přiložíme krycí sklíčko (držíme je pouze za boční okraje nebo v pinzetě) a lehce je přitiskneme na suspenzi tak, abychom odstranili vzduchové bubliny. Přebytečnou tekutinu odsajeme filtračním papírem. Pro pozorování nativního preparátu je nejvhodnější mikroskopie s fázovým kontrastem.

Při přípravě **fixovaného preparátu** vetřeme kličkou do kapky sterilního fyziologického roztoku na odmaštěném podložním sklíčku malé množství bakteriální kultury a dokonale ji zhomogenizujeme. Kapku rozetřeme v tenké vrstvě po povrchu sklíčka a necháme zaschnout při laboratorní teplotě na bezprašném místě. U tekutých vzorků můžeme k vyšetření použít sediment, u pevných vzorků můžeme provést otisk povrchu nebo řezné plochy.

Po úplném zaschnutí se preparáty fixují trojnásobným protažením podložního sklíčka v plameni náterem buněk vzhůru. Tato tzv. *fixace za horka* způsobí denaturaci proteinů a devitalizaci mikroorganismů (mrtvé buňky se lépe barví), současně koagulované bílkoviny pevně přichytí buňky k podložnímu sklíčku. Nevýhodou tohoto způsobu fixace je narušení vnitřní struktury buněk. Proto se při přípravě preparátu k hodnocení vnitřních buněčných struktur doporučuje použití *chemické fixace* (např. ethanol, formaldehyd, kyselina octová).

6.2.2.3. Barvení preparátu

Rozlišujeme dva hlavní typy barvení – jednoduché (přehledné) barvení a barvení diferenciální. Při **jednoduchém barvení** se používají základní barviva jako methylenová modř, krystalová violet, safranin či karbolfuchsin, barvení slouží k hodnocení základního tvaru a uspořádání mikrobiálních buněk. Při **diferenciálním barvení** se současně používají nejméně dvě barviva, barvení umožňuje odlišení různých skupin mikroorganismů (např. Gramovo barvení, barvení podle Ziehl-Neelsena) či zviditelnění struktur mikrobiální buňky (endospory, bičíky, atd.). Hotový preparát se prohlíží imerzním objektivem za použití imerzního oleje.

Jako barviva se používají různé organické sloučeniny. Mezi tzv. *bazická barviva* patří např. methylenová modř, krystalová violet, safranin či malachitová zeleň. Bazická barviva obsahují kladně nabitý chromofor, který se váže na slabě záporně nabitý povrch mikrobiální buňky a další záporně nabitou molekuly (nukleové kyseliny, proteiny). *Kyselé barviva* (jako eosin, kongo červeně či bengálská červeně) se při barvení bakterií příliš často nepoužívají, protože jsou odpuzována záporně nabitou buněčnou stěnou. Komplexní soli kyselých a bazických barviv se označují jako *barviva neutrální*.

6.2.3. Vybrané barvicí postupy

6.2.3.1. Barvení podle Grama

Základním diferenciálním barvením používaným v mikrobiologii k hodnocení morfologie buněk mikroorganismů je barvení podle Grama. Umožňuje rozlišení bakterií na grampozitivní, gramnegativní a gramlabilní.

Barvení podle Grama je založeno na odlišné stavbě stěny buněk grampozitivních a gramnegativních bakterií. Rozdíl spočívá v tom, že grampozitivní bakterie po obarvení krystalovou violetí (Gram I.) a moření Lugolovým roztokem (Gram II.) zadržují tento barevný komplex v buněčné stěně a použití organických rozpouštědel (ethanol/acetón – Gram III.) ho nerozpouští, bakterie zůstávají modrofialové. U gramnegativních bakterií je tento barevný komplex při použití organických rozpouštědel ze stěny buňky vymýván a po dobarvení kontrastním barvivem (safranin nebo karbolfuchsin – Gram IV.) se bakterie obarví červeně.

Detailní postup provedení Gramova barvení a mikroskopického hodnocení připraveného preparátu je uveden v příloze (kapitola 13.1.1.).

KOH-test

U některých mikroorganismů se často vlivem prostředí (např. kyselé pH živného média) barví buňky Gramovým barvením velmi slabě, nedokonale nebo vůbec a proto může být obtížné zhodnotit, je-li mikroorganismus grampozitivní či gramnegativní. V těchto případech lze provést velmi jednoduchou a rychlou zkoušku s KOH.

Na podložní sklíčko nanese bakterologickou kličkou testovanou kulturu z agarového živného média a přikápneme jednu kapku 3% roztoku KOH. Kličkou obě složky rychle promícháme a pokusíme se oddálením kličky na vzdálenost 1 – 2 cm od podložního skla vytáhnout z kapky vlákno. Jedná-li se o gramnegativní mikroorganismus, dojde k vytažení vlákna. V případě grampozitivních mikroorganismů se vlákno nevytvoří. Test se musí odečítat do 30 sekund po smíchání KOH s mikrobiální kulturou, později může dojít k falešně pozitivnímu výsledku.

6.2.3.2. Barvení spor

Při hodnocení morfologie sporotvorných mikroorganismů (rody *Bacillus* a *Clostridium*) se často hodnotí i tvar a uložení jejich endospor. Díky svému špatně propustnému obalu se spory velmi těžko barví, musí se používat koncentrovaná barviva či různá mořidla a vyšší teplota barvení. K odbarvování se používají kyseliny či alkohol.

Jednou z možností je *barvení podle Schaeffer-Fultona*, kdy se fixovaný preparát přelijeme roztokem malachitové zeleně a zahřívá nad plamenem až do výstupu par (asi 5 minut, nesmí se vařit). Poté se preparát dokonale opláchně vodou a nanese se roztok karbolfuchsinu ke kontrastnímu dobarvení (doba působení je 30 – 60 s). Spory se barví jasně zeleně, vegetativní buňky růžově.

Jednoduchým způsobem zviditelnění bakteriálních spor je využití *mikroskopie s fázovým kontrastem*. Spory mají vysoký index lomu, proto v nativním preparátu jasně září.

6.2.3.3. Barvení pouzder

Některé mikroorganismy vytváří okolo své buňky silně hydratovanou, obvykle polysacharidovou vrstvu – pouzdro. Barvení pouzder je poněkud obtížné na provedení, protože pouzdro je rozpustné ve vodě a může být uvolněno při oplachování, současně pouzdra nepřijímají běžná barviva. Při jejich barvení je nezbytné preparát nejdříve mořit (např. síranem železnatým) nebo použít negativní barvení.

Při *negativním barvení podle Burriho* se na odmaštěném podložním sklíčku homogenizuje bakteriální suspenze v kapce destilované vody. Poté se smíchá s kapkou tuše (v poměru 4:1) a jiným podložním sklíčkem se provede nátěr po ploše sklíčka. Nátěr se nechá zaschnout a fixuje se v plameni. Preparát se krátce barví jednoduchým barvivem (např. methylenovou modří, karbolfuchsinem, malachitovou zelení). Obarvený preparát se opatrně krátce opláchně

vodou a osuší. Bakterie jsou zbarveny podle použitého barviva, pouzdra vytváří světlé dvorce (prázdná místa) okolo nich na černém pozadí.

6.2.3.4. Acidorezistentní barvení podle Ziehl-Neelsena

Toto barvení se používá u mikroorganismů, jejichž buněčná stěna obsahuje vysoký podíl mastných kyselin nebo vosků (např. *Mycobacterium* spp.). Je díky tomu hydrofobní a vytváří relativně nepropustnou bariéru pro vodou rozpustná barviva či další látky. Tyto mikroorganismy jsou velmi odolné proti účinku kyselin a zásad. Nejpoužívanější metodou acidorezistentního barvení je metoda podle Ziehl-Neelsena.

Vlastní barvení se provádí za horka (opakovaný záhřev do výstupu par) koncentrovaným karbolfuchsinem, odbarvení se provádí kyselinou sírovou nebo kyselým alkoholem. Po oplachu preparátu se k dobarvení pozadí použije kontrastní barvivo (methylenová modř nebo malachitová zeleň). Acidorezistentní bakterie (mykobakteria) jsou karbolfuchsinem zbarveny růžově a kontrastují s modrým nebo zeleným pozadím (neacidorezistentní mikroorganismy, epiteliální buňky, leukocyty, atd.).

6.2.3.5. Negativní barvení pro mikrometrii

Pokud potřebujeme měřit velikost mikroorganismů, nelze preparát fixovat ani barvit, protože tyto zásahy mohou měnit velikost buněk. V tomto případě se tedy využívá negativního barvení, kdy se obarví pozadí preparátu (plochy mezi jednotlivými buňkami). Vlastní buňky zůstávají na tmavém pozadí bezbarvé. K negativnímu barvení se používá zředěná tuš nebo kyselá barviva (kongo červeň, nigrosin).

Na čisté odmaštěné podložní sklíčko se kápne kapka barviva a kličkou se v ní rozmíchá testovaná bakteriální kultura. Druhým podložním sklíčkem se provedeme nátěr tak, že se pod úhlem 45° barvivo zvolna hrne před pohybujícím se sklíčkem směrem dopředu. Vytvoří se souvislý povlak po celé ploše podložního skla. Po osušení se preparát krátce opláchně HCl. Za použití imerzního objektivu se v připraveném preparátu měří velikost buněk.

6.2.4. Měření velikosti mikroorganismů – mikrometrie

Ve světelném mikroskopu lze také měřit velikost buněk, příp. i jejich struktur. K měření velikosti mikroorganismů je zapotřebí okulárový a objektivový mikrometr (měřítka). **Okulárový mikrometr** je skleněná destička s vyrytou stupnicí, která se vkládá mezi čočky okuláru. **Objektivový mikrometr** je podložní sklíčko s mikrometrickým měřítkem o známém rozměru (známe délku stupnice, počet dílků a velikost 1 dílku).

Před vlastním měřením se nejprve okulárový mikrometr pomocí objektivového kalibruje a pro daný okulár a objektiv se vypočítá tzv. **mikrometrický koeficient**, který udává velikost 1 dílku okulárového mikrometru. Při stanovení velikosti buněk v preparátu měříme jejich rozměr okulárovým mikrometrem a zjištěný počet dílků násobíme mikrometrickým koeficientem.

7. FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ

Při identifikaci bakteriální kultury se nelze opírat pouze o morfologické vlastnosti mikroorganismů či charakter jejich růstu na selektivních a diagnostických půdách. Tyto znaky musí být doplněny o velký soubor jejich biologických vlastností, případně dalších vlastností fenotypových (např. serologické určení, stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám). Mezi biologické vlastnosti mikroorganismů zahrnujeme základní **fyziologické vlastnosti** a dále **biochemickou (enzymatickou) aktivitu** mikroorganismů.

Mezi základní fyziologické vlastnosti mikroorganismů zahrnujeme např. pohyblivost, vztah mikroorganismů k volnému O₂, jejich schopnost růstu při různých teplotách, v různých koncentracích NaCl nebo při různém pH.

7.1. Stanovení pohyblivosti mikroorganismů

Pohyblivost mikroorganismů lze prokázat buď **mikroskopicky** pozorováním nativního preparátu bakteriální kultury nebo **kultivačně** za použití polotuhých živných médií (tzn. půd s obsahem agarové řasy 0,1 – 0,5 %).

Kultivační metodu průkazu pohyblivosti lze provádět dvěma způsoby:

- a) bakteriální kulturu očkujeme *vpichem do polotuhého média ve zkumavce*, vpich by měl končit asi 0,5 cm nad dnem zkumavky. Po inkubaci (teplota a doba závisí na testovaných bakteriích) pohyblivé kultury prorůstají z vpichu celým médiem a vytváří zákal. Nepohyblivé kultury rostou pouze v místě vpichu. Vzhled a charakter růstu se může u jednotlivých druhů lišit, důležitým diagnostickým znakem může být také závislost pohyblivosti na konkrétní inkubační teplotě. Mezi pohyblivé bakterie patří např. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (pohyblivost je závislá na kultivační teplotě) či některé enterokoky.
- b) lze použít také *skleněné U-trubičky naplněné polotuhým médiem*. Testované bakterie očkujeme na povrch média jednoho ramene U-trubičky. Jsou-li bakterie pohyblivé, prorůstají během inkubace médiem do druhého ramene. *U-trubičky se využívají také k tzv. potencování bičků při detekci bičíkových H-antigenů.*

7.2. Vztah mikroorganismů k volnému O₂

Jednoduchou metodou posouzení vztahu mikroorganismů ke kyslíku je kultivace bakteriální kultury v **anaerobním agaru s resazurinem**. Dále lze použít tzv. **oxidačně-fermentační test**, kterým současně zjistíme i typ utilizace glukosy.

7.2.1. Kultivace v anaerobním agaru s resazurinem

Anaerobní agar s resazurinem obsahuje jako redukční složku thioglykolát sodný a dále resazurin (indikátor kyslíku). Médium se rozplňuje ve vysoké vrstvě do zkumavek a těsně před zaočkováním se regeneruje varem, tím dojde k vytěsnění O₂. Bakteriální kultura se očkuje vpichem do celého sloupce a po 24 hodinách inkubace se hodnotí růst:

- *striktně aerobní* bakterie (např. rod *Bacillus*) rostou v povrchové vrstvě, která se barví resazurinem do červena,
- *striktně anaerobní* bakterie (např. *Clostridium tetani*) rostou pouze v dolní části,
- *fakultativně anaerobní* bakterie (např. *Escherichia coli*) rostou v celém sloupci,
- bakterie *mikroaerofilní* (např. *Campylobacter* spp.) rostou na rozhraní obou vrstev.

7.2.2. Oxidačně-fermentační test (O-F test)

Tímto testem zjišťujeme, je-li bakteriální kultura schopna využívat glukosu kvašením (fermentací) nebo pouze za přístupu kyslíku aerobní oxidací. K testu se používá kultivační půda s glukosou a bromthymolovou modří (indikátor pH) ve zkumavkách, z nichž každá druhá je převrstvená sterilním parafinovým olejem. Bakteriální kulturu očkujeme vpichem vždy do dvou zkumavek (s a bez parafinového oleje). Po ukončení inkubace hodnotíme rozklad glukosy, který se projeví okyselením média (původně zelené médium zežloutne), případně i vznikem plynových bublinek a trhlinek v půdě.

- Bakterie *oxidující glukosu aerobně* způsobí zežloutnutí média bez parafinového oleje postupující od hladiny živné půdy ke dnu zkumavky, ve zkumavce s parafinem k žádným změnám nedojde.
- Bakterie *glukosu zkvašující (fermentující)* způsobí zežloutnutí půdy v celém objemu v obou zkumavkách.
- Pokud bakterie *glukosu nerozkládají*, zůstává půda v obou zkumavkách beze změn nebo dojde k její alkalizaci.

7.3. Růstové schopnosti mikroorganismů

Pro některé druhy či skupiny mikroorganismů jsou typické určité specifické růstové vlastnosti. Jedná se o schopnost růstu při nízkých nebo vysokých teplotách (např. 45 °C – *Escherichia coli*, enterokoky) nebo růst v alkalickém či kyselém prostředí (např. enterokoky rostou při pH 9,6; laktobacily při pH pod 5,5). Vysoká koncentrace žlučových solí neinhibuje růst enterokoků ani listerií. Pro některé grampozitivní bakterie je charakteristická schopnost růstu při vysokých koncentracích NaCl, např. enterokoky tolerují 6,5 % soli, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* rostou dokonce v přítomnosti 10 % NaCl.

8. BIOCHEMICKÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ

Pro průkaz biochemické aktivity byla vyvinuta celá řada různých **biochemických identifikačních testů**, kterými detekujeme přítomnost produktů či metabolitů vznikajících utilizací sacharidů, bílkovin či dalších látek nebo přímo vybrané enzymy, specifické pro daný druh bakterií (např. β -D-glukuronidasa u *Escherichia coli*). Diagnostika pozitivní biochemické reakce je založena na změně barvy testovacího média, ke které dochází změnou příslušného indikátoru. Dříve se proto soubor biochemických testů označoval jako tzv. pestrá řada (např. pestrá řada cukrů).

8.1. Základní testované biochemické vlastnosti

V následujícím textu je uveden pouze výběr testů, které nachází využití při diagnostice potravinářsky významných druhů bakterií. Mimo uvedených vlastností má v mikrobiologii potravin velký význam také sledování proteolytické, lipolytické a sacharolytické činnosti mikroorganismů, neboť tyto enzymatické změny jsou častou příčinou kažení potravin. Postupy provedení a vyhodnocení vybraných biochemických testů jsou uvedeny v příloze (kapitola 13.3.1. až 13.3.6.).

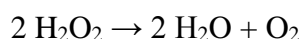
Stanovení proteolytických, lipolytických a sacharolytických mikroorganismů je uvedeno ve skriptech Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. Metody stanovení mikroorganismů v potravinách.

8.1.1. Průkaz tvorby sirovodíku

Sirovodík (sulfan) vzniká postupným odbouráváním aminokyselin obsahujících síru (methionin, cystein). K detekci se používá půda s glukosou a solemi železa nebo jiných těžkých kovů (Pb, Bi) nebo, při použití cystinového bujónu, papírek napuštěný octanem olovnatým. V **pozitivním případě** vzniklý sirovodík reaguje s ionty železa a vzniká tmavošedý až černý sulfid železa. Podobně je tomu při použití jiných kovů, např. olova (vzniká sulfid olovnatý). Reakce je typická pro většinu salmonel a rod *Proteus*, naopak *Escherichia coli* dává reakci negativní.

8.1.2. Test na průkaz katalasy

Většina aerobních a fakultativně anaerobních bakterií tvoří enzym katalasu, který rozkládá pro bakterie toxický peroxid vodíku na vodu a kyslík.



K průkazu katalasy se používá 3% roztok peroxidu vodíku, který musí být vždy čerstvě připravený. Vlastní provedení může mít několik modifikací. Nejčastěji se vyšetřovaná bakteriální kultura rozetře sterilní bakteriologickou kličkou na podložním skle v kapce 3% peroxidu vodíku, případně se roztok peroxidu přidá přímo k bujonové kultuře ve zkumavce nebo se přikápne na vyšetřované kolonie na pevné půdě (nelze provádět na krevním agaru, který katalasu přirozeně obsahuje). V **pozitivním případě** uvolňuje testovaná kultura z peroxidu bublinky kyslíku.

Z grampozitivních bakterií je pozitivní reakce typická pro rody *Staphylococcus* či *Bacillus*, negativní průkaz je u bakterií mléčného kvašení (např. rody *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*) či *Clostridium*. Převážná většina gramnegativních bakterií je katalasapozitivní (např. čeled' *Enterobacteriaceae*).

8.1.3. Průkaz tvorby indolu

Test slouží k průkazu tvorby indolu z aminokyseliny tryptofanu. Jeho tvorba je závislá na zvýšeném obsahu tryptofanu v médiu a vyžaduje nepřítomnost glukosy. Přítomnost indolu se

indikuje přidavkem *p*-dimethylaminobenzaldehydu (Kováčsovo činidlo). V **pozitivním případě** vzniká sytě růžový až červený reakční produkt, negativní reakce je charakterizována světle žlutohnědým zbarvením. Reakce je typická pro *Escherichia coli*, naopak *Salmonella* spp. dává negativní reakci.

8.1.4. Průkaz oxidasy a cytochromoxidasy

Oxidasa a cytochromoxidasa jsou enzymy podílející se na oxidativních procesech v bakteriální buňce. Je přítomna u všech aerobních bakterií s respiratorním metabolismem. Jejich průkaz je založen na oxidaci a barevné změně oxidačního činidla, ke kterému je přidána zkoušená kultura. V **pozitivním případě** dochází do jedné minuty k modrému zbarvení oxidasového testu nebo do dvou minut k červenofialovému zbarvení u cytochromoxidasového testu. Reakce je významná pro diferenciaci gramnegativních bakterií, z nichž většina je oxidasapozitivní. Negativní průkaz je u fermentujících bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*.

8.1.5. Testy zkvašování různých druhů cukrů – průkaz glykosidas

Testy jsou prováděny v tekuté půdě s přidavkem 0,5 – 1 % substrátu, kterým jsou sacharidy, glykosidy nebo vícesytné alkoholy. Nejčastěji se testuje schopnost využít glukosu, laktosu, sacharosu, ribosu, dále trehalosu, sorbitol, rhamnosu, inositol, manitol, rafínosu, atd. K detekci se používá acidobazický indikátor (např. bromthymolová modř, bromkrezolový purpur, fenolová červeň). V **pozitivním případě** dochází zkvašováním substrátu ke tvorbě organických kyselin, které okyselují médium a způsobí změnu indikátoru (půda zežloutne). Při použití plynovky můžeme současně prokázat také tvorbu plynu (bublina v plynovce).

8.1.6. TSI agar (Triple Sugar Iron agar, Hajnův agar)

Agar podle Hajny obsahuje *tři základní cukry* – glukosu, laktosu, sacharosu, a železité soli. Enzymatickou činností mikroorganismů dochází ke změně původně červené barvy média na žlutou, a to v různém rozsahu dle spektra využívaných cukrů. Současně lze sledovat produkci plynu a tvorbu sirovodíku.

TSI agar se připravuje jako šikmý agar s vyšším klínem. Jednotlivé cukry jsou na základě své molekulové hmotnosti rozděleny následovně: dole sacharosa, uprostřed glukosa a v horním klínu laktosa. Toto rozdělení umožňuje dobře rozpoznat zkvašování jednotlivých cukrů. Indikátorem štěpení je fenolová červeň. Očkování testované bakteriální kultury se provádí vpichem do agarového sloupce a následně hadovitým rozočkováním po povrchu klínu.

Po ukončení inkubace hodnotíme změnu barvy kultivační půdy, tvorbu plynu (potrhání agaru) a tvorbu sirovodíku (černání kolem vpichu způsobené reakcí sirovodíku s ionty železa za tvorby černého sulfidu železitého). Zkvašuje-li mikroorganismus (např. salmonely a shigely) pouze glukosu, zežloutne jen sloupec a šikmá plocha zůstane červená (horní šikmá část půdy se oxidativní dekarboxylací aminokyselin z peptonu alkalizuje, proto červená). Pokud testovaný mikroorganismus (např. *E. coli*, enterobakter) zkvašuje současně s glukosou i laktosu či sacharosu, příp. všechny tři cukry, zežloutne sloupec i šikmá plocha (vytvoří se tak velké množství kyseliny, že alkalizace šikmé části neproběhne).

8.1.7. ONPG-test - průkaz β -galaktosidasy

Test je zaměřen na průkaz enzymu β -galaktosidasy, který mikroorganismy potřebují při fermentaci laktosy. Jeho tvorba je detekována pomocí syntetického substrátu *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosidu (ONPG). V **pozitivním případě** účinkem enzymu k uvolnění žlutě zbarveného nitrofenolu, při negativní reakci zůstane roztok bezbarvý. Reakce je významná pro rozlišení rodů v čeledi *Enterobacteriaceae*; je pozitivní i u rodů, které laktosu

zkvašují opožděně (např. *Citrobacter* spp.). Lze tedy rozlišit salmonely (negativní) od citrobakterů či *E. coli* (pozitivní).

8.1.8. Test na přítomnost ureasy

Ureasa je specifický enzym některých mikroorganismů (např. *Proteus vulgaris*, *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*), který hydrolyticky štěpí močovinu na CO_2 a NH_3 , výrazná alkalizace média je detekována fenolovou červení. K průkazu se používá půda s přídavkem močoviny (Christensenova půda). V **pozitivním případě** vzniká červené zbarvení.

8.1.9. Test na redukci nitrátů

Enzym nitrátoreduktasa umožňuje bakteriím rostoucím v médiu obsahujícím nitráty (dusičnany, NO_3^-), jejich redukci na nitrity (dusitany, NO_2^-), amoniak (NH_3) až volný dusík (N_2). K vlastnímu průkazu se používá roztok naftylaminu v kyselině octové a sulfanilové (Gries-Ilosvayovo činidlo). V **pozitivním případě** (např. u salmonel, kampylobakterů, stafylokoků) vzniká růžové až červené zbarvení, které je důkazem redukce NO_3^- na NO_2^- . Nedojde-li ke zčervenání, ověří se negativní reakce přidáním práškového zinku; nastane redukce NO_3^- na NO_2^- a médium zčervená. Pokud nedojde ke zčervenání ani po přidání práškového zinku, byly již NO_2^- redukovány až na NH_3 a N_2 a reakce byla pozitivní.

8.1.10. Voges-Proskauerův test (VP test)

Test slouží k průkazu tvorby acetoinu (acetylmethylkarbinolu) z kyseliny pyrohroznové účinkem pyruvátdekarboxylasy při fermentaci glukosy. K průkazu se používá 40% vodný roztok KOH (VPT I.) a 5% alkoholový roztok α -naftolu (VPT II., Barritovo činidlo). V **pozitivním případě** vzniká červené zbarvení, které se projeví do 20 minut. Reakce je typická pro rody *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Serratia*. Ostatní zástupci čeledě *Enterobacteriaceae* mají VP test negativní.

8.1.11. Průkaz dekarboxylace lyzinu a ornitinu

Lyzin je štěpen lyzindekarboxylasou na kadaverin a CO_2 , ornitin enzymem ornitindekarboxylasou na putrescin a CO_2 . V obou případech vznikají organické zásady, které alkalizují živné médium. Enzymy lyzindekarboxylasa (LDC) a ornitindekarboxylasa (ODC) jsou specifické pro danou aminokyselinu a nejlépe působí v anaerobních podmínkách. Test probíhá v nutričně bohaté půdě s přídavkem lyzinu, resp. ornitinu a barviva bromkresol purpuru (indikátor pH); médium je převrstveno sterilním parafínovým olejem. V **pozitivním případě** vzniká červenofialové zbarvení.

LDC reakce je typická pro *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, naopak negativní reakci dává *Citrobacter* spp.

ODC reakce je typická pro *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis* či *Yersinia enterocolitica*, negativní reakci dává *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

8.2. Standardizované testovací systémy

V dnešní době se půdy pro biochemické testy vesměs nepřipravují individuálně. Pro urychlení identifikace velkého množství izolátů a zlepšení reprodukovatelnosti výsledků odstraněním individuálních rozdílů v provedení a hodnocení testů, se využívají standardní komerční testy (výrobce např. Erba-Lachema s.r.o., bioMérieux) a to ve formě **diagnostických proužků** (stripů) pro jednotlivé reakce (např. OXItest, VPtest, ONPtest) nebo **diagnostických soupřav** určených pro diagnostiku zvolené skupiny bakterií, např. ENTEROtest (identifikace gramnegativních fermentujících tyčinek z č. *Enterobacteriaceae*), EN-COCCUStest (druhová

identifikace enterokoků), STAPHYtest (identifikace stafylokoků a mikroků), STREPTOtest (rozlišení streptokoků a enterokoků), ANAEROtest (identifikace anaerobů), NEFERMtest (pro identifikaci gramnegativních nefermentujících tyčinek), APItest (identifikace různých skupin grampozitivních i gramnegativních bakterií a kvasinek), atd. Tyto diagnostické soupravy umožňují testovat i přes 20 různých biochemických reakcí najednou a snadno se provádějí i vyhodnocují. Mikrotitrační či jiné plastické destičky s jamkami obsahují vysušená média se substráty, do kterých se pipetuje suspenze testované bakteriální kultury o určité koncentraci buněk. Po předepsané inkubaci se barevné změny substrátů odečítají vizuálně nebo spektrofotometricky. K vyhodnocení výsledků se používají diferenční tabulky nebo softwarový PC program.

8.3. Automatizované identifikační systémy

Mnoho laboratoří využívá pro identifikaci mikroorganismů automatizované systémy. Jedná se např. o **systém VITEK®** (výrobce bioMérieux) nebo **Biolog** (výrobce Biolog, Inc.). Jsou to rychlé, plně automatizované systémy, umožňující současné stanovení velkých sérií vzorků během několika hodin. Identifikace mikroorganismů je prováděna pomocí široké škály biochemických testů. Výsledky těchto reakcí testovaných kultur jsou srovnávány s komplexními databázemi referenčních kmenů bakterií, kvasinek i plísní. Nevýhodou těchto systémů jsou vysoké pořizovací náklady.

Další metodou poskytující rychlou a velmi přesnou identifikaci a typizaci mikroorganismů je **hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem** (MALDI-TOF MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je založena na analýze ribosomálních a dalších proteinů v buňce, které jsou specifické pro jednotlivé bakteriální druhy. Samotná analýza je velmi rychlá, levná a výsledky jsou možné získat během několika minut pro 384 izolátů najednou. Pro analýzu je potřeba velmi malé množství kultury. Nevýhodou jsou opět velmi vysoké pořizovací náklady přístrojového vybavení.

8.4. Průkaz hemolýz – hemolytická činnost mikroorganismů

Jako **hemolýzu** označujeme schopnost mikroorganismu rostoucího na krevním agaru (agar s beranými či králíčími erytrocyty) narušovat povrchové membrány červených krvinek pod kolonií nebo v jejím okolí s následným uvolněním hemoglobinu. Poté může dojít k jeho rozkladu, což se projeví ztrátou červené barvy krve agaru. Hemolytická činnost je typickým znakem některých bakterií, zejména patogenních. Rozeznáváme **tři základní typy hemolýzy**:

- úplná hemolýza** se projevuje odbarvenou a dokonale projasněnou zónou v okolí kolonií, vzniká úplným rozpadem erytrocytů včetně rozložení hemoglobinu; úplná hemolýza je typická např. pro *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (produkující α -lyzin), *Pseudomonas aeruginosa*, u streptokoků (a někdy i dalších bakterií) se úplná hemolýza označuje jako β -hemolýza;
- při **neúplné hemolýze** dochází ke ztrátě červené barvy krevního agaru, avšak zóna hemolýzy zůstává zakalená (nedochází k úplnému rozpadu erytrocytů); bakterie s neúplnou hemolýzou mohou být např. *Staphylococcus aureus* (produkující δ -lyzin nebo β -lyzin), *Streptococcus agalactiae*;
- alfa hemolýza** neboli **viridace** se projevuje nazelenáním média v okolí kolonií, vzniká působením některých bakterií (např. některých druhů streptokoků – tzv. viridující streptokoků) a dochází při ní ke štěpení hemoglobinu na zelenohnědý verdoglobín.

8.5. Průkaz volné a vázané koagulasy

Staphylococcus aureus je ubikvitární mikroorganismus schopný vyvolat různá onemocnění člověka. Jeho virulence je dána schopností produkovat velké množství biologicky aktivních látek, které lze rozdělit do tří skupin: a) adhezivní faktory, b) propagační a transportní faktory a c) ochranné faktory a toxiny.

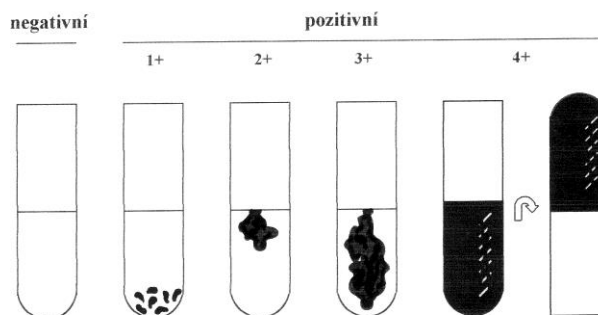
Do skupiny *adhezivních faktorů* patří plazmakoagulasa (volná koagulasa), clumping faktor (shlukovací faktor, vázaná koagulasa) a několik produktů polysacharidové povahy.

8.5.1. Průkaz přítomnosti vázané koagulasy

Vázaná koagulasa (angl. *clumping factor*) je povrchový protein schopný vázat fibrinogen a měnit jej na fibrin, čímž dochází k typickému shlukování buněk stafylokoků. Princip stanovení spočívá v reakci vázané koagulasy *S. aureus* s fibrinogenem králičí plazmy, která se projeví shlukováním buněk (aglutinace). V **pozitivním případě** pozorujeme do 2 minut vyjasnění původně mléčné suspenze a vznik viditelných shluků. Reakce je typická především pro druh *Staphylococcus aureus*. Postup provedení je uveden v příloze – kapitola 13.3.7.

8.5.2. Průkaz přítomnosti volné koagulasy

Volná koagulasa je extracelulární enzym schopný reagovat s plazmatickým faktorem za vzniku tzv. stafylotrombinu, který katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Princip stanovení volné koagulasy spočívá v reakci s fibrinogenem králičí plazmy, která se projeví tvorbou chuchvalců, sraženin či úplným ztuhnutím plazmy ve zkumavce. Výsledek testu odečítáme po 1, 3 a 24 hodinách. V případě **pozitivní reakce** dojde ke ztuhnutí plazmy nebo k vytvoření chuchvalců či sraženin. Intenzitu pozitivní reakce hodnotíme semikvantitativně na 1+, 2+, 3+ a 4+ (viz obrázek 23). Přítomnost volné koagulasy je opět typická především pro druh *Staphylococcus aureus*.



Obrázek 23: Vyhodnocení stanovení volné koagulasy.

9. IMUNOLOGICKÉ METODY

V mikrobiologické praxi se používá celá řada imunologických metod sloužících k identifikaci a izolaci patogenních a toxigenních mikroorganismů a jejich toxinů v potravinách či klinických vzorcích. Využití nachází také při confirmaci a typizaci mikroorganismů.

Imunologické metody jsou obecně založeny na *in vitro* reakci antigenu se specifickou protilátkou. Jsou zaměřeny buď na průkaz antigenů (např. bakterie, toxiny) nebo na průkaz přítomnosti specifických protilátek, přičemž reakce může být dle typu metody kvalitativní nebo kvantitativní. V potravinářské mikrobiologii se obvykle používají metody zaměřené na detekci antigenu.

9.1. Serologické metody

Podle charakteru detekovaného antigenu se serologické metody dělí na dva základní typy – **aglutinaci** a **precipitaci**. Rozdíl mezi nimi je především ve velikosti detekovaných antigenních částic. **Korpuskulární antigeny** jsou dostatečně velké, aby sedimentovaly při centrifugaci 1 000 – 1 200 otáček za minutu a jsou viditelné mikroskopem, **rozpustné (solubilní) antigeny** mají molekulové rozměry. Ze serologických metod se v potravinářské mikrobiologii nejčastěji používají metody na bázi aglutinace.

Každá serologická reakce má 3 základní složky – antigen, protilátku a prostředí (vehikulum). Antiséra obsahující protilátky se připravují injikováním antigenu do pokusného zvířete (např. krysa, králik). Protilátky se získávají z krevního séra po odebrání žilné krve do zkumavky bez protisrážlivých prostředků (po vytvoření krevní sraženiny se sérum získá odsátím nebo odstředěním). Vehikulem je nejčastěji fyziologický roztok (0,85% NaCl).

9.1.1. Aglutinační reakce

Aglutinace patří mezi nejběžnější serologické reakce. Princip metody spočívá v tom, že se **korpuskulární antigen** (bakterie) v přítomnosti specifické protilátky shlukuje – **aglutinuje**, a vytváří okem viditelné vločky (shluky) – **aglutinát**.

*Podle typu aglutinace rozlišujeme **O-aglutinaci**, při které se bakterie váží celými těly (reaguje somatický antigen O), nebo **H-aglutinaci**, kdy se bakterie váží svými bičíky (reaguje flagelární antigen H).*

V některých případech může docházet k aglutinaci bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku i bez přítomnosti specifických protilátek, tento jev nazýváme **autoaglutinace**. Naopak **anaglutinabilita** je jev, při kterém kapsulární antigen pokrývá povrch somatického antigenu a bakteriální kmen s přidanou protilátkou neaglutinuje.

*Aglutinaci můžeme využít dvojím způsobem: a) na určení protilátek v séru pomocí známého antigenu – **přímá aglutinace**, b) na určení antigenu pomocí známé protilátky – **nepřímá (pasivní) aglutinace**.*

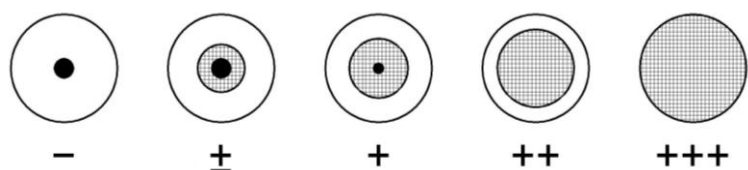
*Při použití standardní suspenze buněk a série ředění protilátky se může titrací stanovit množství protilátky v antiséru. Při kvantitativním vyšetření se sérum ředí **geometrickou řadou** (např. 1:2, 1:4, 1:8... nebo 1:5, 1:10...). Převrácená hodnota ředění se nazývá **přesná koncentrace (titr)** ředění. Při hodnocení označíme jako **titr** nejvyšší ředění séra, ve kterém ještě došlo k pozitivní reakci. Např. pozitivní reakce v ředění séra 1:64 znamená titr 64. Za významné zvýšení nebo snížení považujeme zpravidla posun o dvě ředění.*

9.1.1.1. Základní typy aglutinačních reakcí

Nejjednodušším formátem je aglutinační reakce prováděná na podložním sklíčku – tzv. **sklíčková metoda**, kdy po smíchání kapky specifického antiséra s bakteriální suspenzí dojde k vyjasnění původně mléčně zbarvené suspenze a vzniknou viditelné vločky (přesný postup viz kapitola 13.4.1.).

Další možností, často využívanou v komerčních soupravách, je **aglutinace na nosičích**, kdy se protilátky naváží na indifferntní částice – nosiče (např. latex, bentonit). Výhodou takto upravených protilátek je jejich nižší nespecifická reaktivita a lepší vizuální hodnocení výsledků. Provedení metody je v podstatě shodné se sklíčkovou metodou (kapitola 13.4.2.)

Při stanovení bakteriálních toxinů se často využívá **reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA)**. Tato metoda patří mezi aglutinace na nosičích (tím jsou zde barevné latexové částice) a provádí v mikrotitračních destičkách, jejichž jamky mají kónické dno. Na rozdíl od klasické aglutinace, jsou při reverzní aglutinaci detekovány solubilní antigeny (bakteriální



Obrázek 24: Vyhodnocení reverzní pasivní latexové aglutinace.

toxiny). Doba trvání testu je obvykle 18 – 24 hodin. Reakce je hodnocena semikvantitativně podle mřížkové struktury vzniklé na dně jamek destičky (obrázek 24), jako pozitivní je hodnocena reakce (+) až (+++).

Aglutinační reakce lze obecně využít pro serologickou identifikaci a typizaci bakterií (např. salmonel, kampylobakterů, patogenních kmenů *Escherichia coli*) nebo naopak k průkazu přítomnosti specifických protilátek v krevním séru. Metoda RPLA se používá nejen k průkazu patogenních mikroorganismů, ale i jejich toxinů (např. stafylokokové enterotoxiny, diarrhenní enterotoxiny *B. cereus*, Shigatoxiny ST1 a ST2) v potravinách.

9.1.2. Precipitační reakce

Precipitace je reakce koloidního **rozpustného antigenu** (tzv. *precipitogenu*) se specifickou protilátkou (*precipitinem*) v tekutém nebo gelovém prostředí. Precipitační testy se používají k průkazu přítomnosti rozpustných antigenů (např. bakteriálních exotoxinů, cizorodých proteinů, virů) nebo ke zjištění titru protilátek proti těmto antigenům. Rozdíl mezi aglutinací a precipitací spočívá především ve velikosti antigenních částic (precipitogeny jsou menší) a v množství molekul protilátek, které je potřebné k vizualizaci reakce (u precipitace více). Precipitaci lze testovat ve zkumavkách (prstencový test) nebo v agarovém gelu (tzv. imunodifuze).

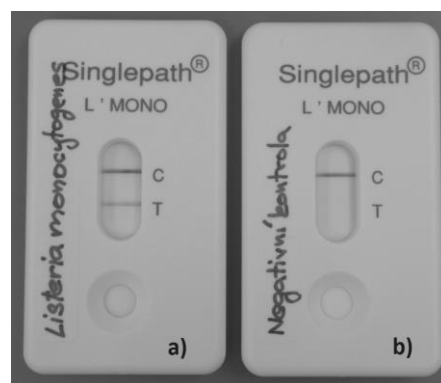
Prstencový test se provádí v precipitačních zkumavkách nebo kapilárách. Do spodní části zkumavky se dávkuje těžší složka reakce (sérum) a na ni se opatrně navrství antigen. Při pozitivní reakci vznikne na rozhraní obou složek bělavý prstenec – *precipitát*, zřetelný proti tmavému pozadí. Reakce slouží nejen ke kvalitativnímu stanovení, tímto způsobem lze také kvantitativně stanovit titr protilátek či antigenu. Prstencový test se používá například v diagnostice antraxu (termoprecipitační Ascoliho reakce).

Imunodifuze se obvykle provádí v Petriho miskách s připraveným agarem, do kterého jsou vyříznuty kruhové otvory (počet a uspořádání je závislé na typu testu). Ty se plní protilátkou nebo antigenem, které radiálně difundují do agarů v okolí jamek. U *jednoduché radiální imunodifuze* se v agaru pohybuje pouze jedna složka (antigen nebo protilátka) a druhá složka je rovnoměrně rozptýlena v gelu. Při *dvojitě imunodifuze podle Ouchterlonyho* difundují proti sobě antigen a protilátka. V místě reakce antigenu a protilátky se vytváří *precipitační linie* ve formě obloučku, linie či prstence. Metoda je vhodná k identifikaci antigenů a určení jejich imunochemické příbuznosti nebo opačně na důkaz přítomnosti protilátek.

9.2. Imunochromatografické metody

Imunochromatografické metody (označované též jako LFIA, *Lateral Flow Immuno Assay*) jsou velmi jednoduché a rychlé testy rutinně využívané v klinické i potravinářské mikrobiologii. Nejběžnějším formátem je plošná imunochromatografie. Typicky se test skládá z porózní nitrocelulóзовé membrány, na které jsou imobilizovány vazebné proteiny (obvykle specifické protilátky) pro cílovou detekovanou molekulu. Membrána je uzavřena v plastovém pouzdře s otvory.

Pomnožený vzorek se napipetuje určeným oknem do testu. V místě aplikace vzorku je v testu připraven **konjugát** (specifické protilátky proti cílovému antigenu navázané např. na částice zlata nebo barevné latexové částice). Dojde ke specifické reakci mezi konjugátem a cílovými antigeny. Vytvořený komplex antigen-konjugát projde až na membránu a putuje dopředu směrem k **linii vazebných proteinů** (tzv. testovací linie). Vazebné proteiny (obvykle specifické protilátky proti cílovému antigenu) migrující komplex zachytí a imobilizují. V testovacím okně dojde v místě vazebné linie k vytvoření zřetelného pruhu či linky, což indikuje pozitivní výsledek. Nadbytečný konjugát vzlíná dál membránou a je zachycen na dalším místě membrány, tzv. **kontrolní linii**, kde jsou navázané specifické protilátky proti konjugátu. Hromaděním zachyceného konjugátu opět vyvolá vznik barevného proužku. Tato linie slouží ke kontrole funkčnosti testu. Pokud nedojde k jejímu zvýraznění, je test neplatný.



Obrázek 25: Ukázka testu – a) pozitivní výsledek, b) negativní výsledek.

Pozitivní výsledek značí zřetelný barevný pruh v místě vazebné i kontrolní linie (2 proužky), v případě **negativního výsledku** je pruh vytvořen pouze v místě kontrolní linie (1 proužek) (viz obrázek 25). Doba trvání testu je obvykle 15 – 20 minut. Podobně jako u dalších imunochemických technik, je nezbytné potvrdit pozitivní výsledky konvenční metodou.

V potravinářské mikrobiologii se imunochromatografická metoda používá nejčastěji k detekci *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 a Shigatoxinů ST1 a ST2, *Listeria monocytogenes* či *Campylobacter* spp., a to v různých potravinách či environmentálních vzorcích.

9.3. Imunochemické metody

Imunochemické metody lze použít k detekci antigenů či protilátek, v potravinářské mikrobiologii je obvyklý první způsob využití. Detekční protilátky, příp. antigeny, mohou být značeny enzymy (enzymoimunoanalýza, EIA neboli ELISA), fluorescenčními barvivými (imunofluoroanalýza, ELFA) nebo radioaktivními látkami (radioimunoanalýza, RIA).

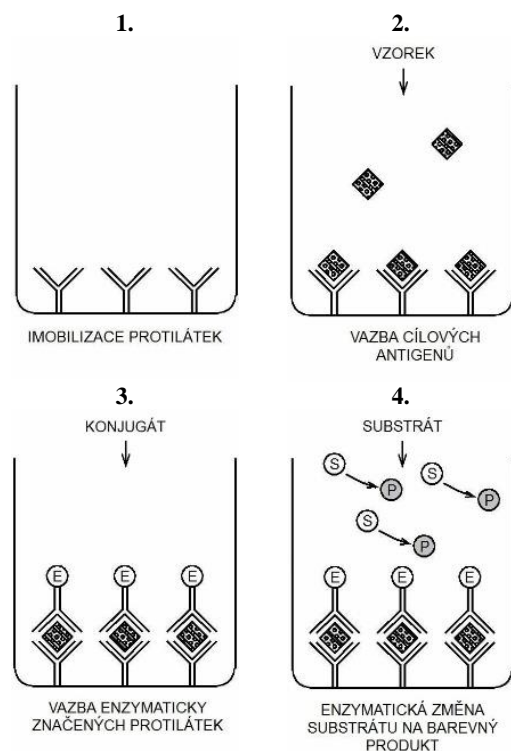
9.3.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Společným znakem ELISA metod je zakotvení (adsorpce nebo kovalentní navázání) protilátky na **pevný nosič** (nejčastěji jamky mikrotitrační destičky nebo mikrozkušavky). Ke **značení protilátek** se používá enzym (např. alkalická fosfatasa nebo křenuv peroxidasa), který katalyzuje přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt (případně dochází ke změně barvy substrátu). Hodnocení testu je vizuální nebo spektrofotometrické.

ELISA metody umožňují detekci antigenu nebo specifické protilátky, mohou být přímé či nepřímé. V potravinářské mikrobiologii se využívají zejména k detekci antigenu (bakterie, toxin) pomocí známých protilátek. Nejpoužívanějším typem v komerčních testech je **přímá sendvičová (angl. sandwich) ELISA**. „Sendvič“ v tomto případě znamená, že je cílový antigen obalen dvěma protilátkami – imobilizovanou protilátkou (vazba antigenu) a enzymaticky značenou detekční protilátkou (tzv. konjugát). Metodu lze využít nejen ke kvalitativnímu, ale i semikvantitativnímu či kvantitativnímu stanovení.

Prvním krokem každého ELISA testu je pomnožení vyšetřované potraviny, jejímž účelem je namnožení (zvýšení počtu) kontaminujících bakteriálních buněk. Hlavní kroky sendvičové ELISA metody jsou uvedeny na obrázku 26.

Vazebné (imobilizované) protilátky jsou navázány na povrch pevného nosiče (např. jamky mikrotitrační destičky). Po přidavku pomnoženého vzorku dojde k vazbě **cílových antigenů** na protilátky. Následuje **opakované promytí**, kterým se odstraní zbytky vzorku. Do jamek se přidá **konjugát** – detekční enzymaticky značené protilátky, které se váží na cílové antigeny.



Obrázek 26: Hlavní kroky sandwich ELISA.

Několikanásobným **promytím** se odstraní nenavázané protilátky. Po přidavku **substrátu** katalyzuje enzym jeho přeměnu na barevný produkt. Na závěr lze přidat tzv. stop roztok, který ukončí enzymovou aktivitu. Vzniklá **barevná reakce** je hodnocena vizuálně (podle barevné šablony) nebo spektrofotometricky.

Metoda ELISA je vysoce specifická imunologická technika používaná v potravinářské mikrobiologii zejména k detekci alimentárních patogenů (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp.) nebo toxinů (stafylokokové enterotoxiny, diarhogenní enterotoxiny *B. cereus*, Shigatoxiny a botulotoxiny). Je relativně jednoduchá, může být i automatizovaná, výsledky poskytuje dostatečně rychle (obvykle za 2 až 3 hodiny). Největší využití má při negativním screeningu vzorků (zvýšení počtu vyšetřených vzorků a podstatné zkrácení doby vyšetření). Jedná se však pouze o screeningovou metodu, **pozitivní výsledky musí být vždy potvrzeny** klasickou metodou, tj. kultivací.

9.3.2. ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay)

Fluorescenční imunologická metoda ELFA je automatizovaná metoda prováděná na přístroji VIDAS® (obrázek 50 kapitola 12.1.1.3.). Princip reakce je podobný jako u metody ELISA, rozdíl je v použitém substrátu, který je enzymem štěpen na fluorescenční produkt. Vzniklé chemické změny (fluorescence) jsou detekovány pomocí fotodiodového fluorimetru.

Vlastní test se skládá ze dvou částí – **komůrky s pevnou fází (SPR®)**, která je běžně označovaná jako „špička“ a její vnitřní povrch je potažen specifickou protilátkou pro hledaný antigen, a **reagenčního stripu**, v jehož jamkách jsou promývací a reagenční roztoky potřebné pro provedení testu (obrázek 27). Jednotlivé kroky reakce jsou shodné s provedením sendvičové ELISA metody, tj. vazba antigenů na imobilizované protilátky v SPR®, opakované promytí, vazba konjugátu (tvorba komplexu imobilizovaná protilátka-antigen-konjugát), opakované promytí, přidavek substrátu a výsledná enzymatická reakce.



Obrázek 27: VIDAS souprava – reagenční strip, SPR® a kontroly.

Nově jsou při stanovení některých patogenů (např. salmonel, listerií či *E. coli* O157:H7) místo specifických protilátek navázaných uvnitř SPR® fáze využívány specifické rekombinantní fágové proteiny.

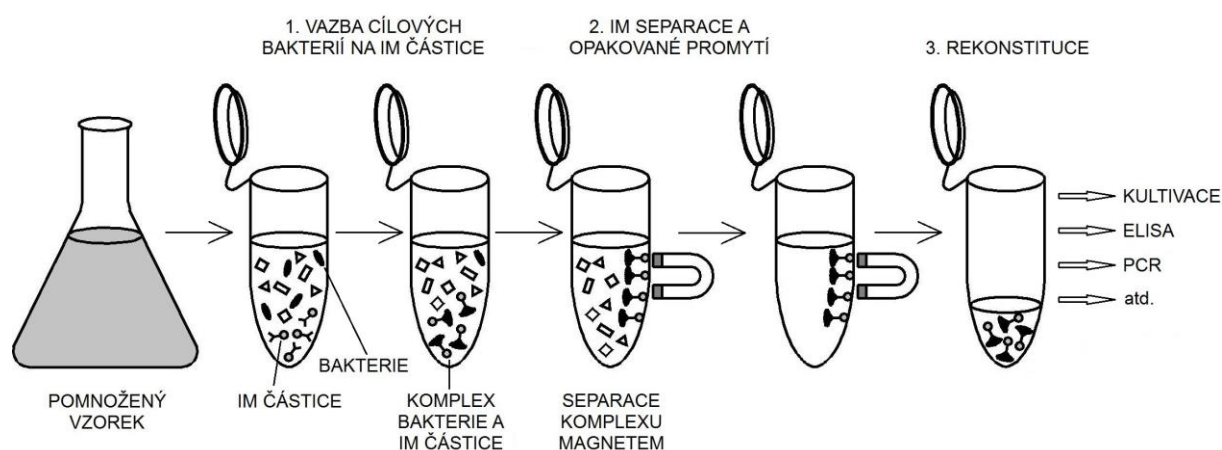
Upravený vzorek se nanáší do první prázdné komůrky stripu, který se následně spolu se špičkou (SPR® fází) umístí do přístroje. Po spuštění přístroje se SPR® postupně zasunuje do jamek s reagenciemi. Ty jsou nasáty do špičky a po ukončení daného kroku opět vypuštěny

do příslušné jamky stripu. V závěru analýzy je SPR[®], obsahující v případě pozitivního výsledku komplex imobilizovaná protilátka-antigen-konjugát, naplněna fluorogenním substrátem z poslední jamky. Proběhne enzymatická reakce a obsah je uvolněn zpět do optické kyvety, kde je změřena hladina fluorescence (tzv. **relativní fluorescenční hodnota, RFV**). Hodnota RFV se porovná s interními referenčními hodnotami a provede se interpretace výsledků (pozitivní/negativní). Výsledky pro jednotlivé vzorky přístroj vytiskne. Doba stanovení je 48 – 90 minut, podle typu testu.

Přístroj VIDAS[®] má široké využití v klinické mikrobiologii, např. při vyšetření na hepatitidu, AIDS, alergie, anémie, hormony štítné žlázy. V potravinářské mikrobiologii je využíván při detekci *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* spp. a stafylokokových enterotoxinů typu A – E.

9.4. Imunomagnetická separace

Imunomagnetická separace (IMS) je založena na principu vazby cílových mikrobiálních buněk na specifické protilátky, které jsou imobilizovány na magnetických částicích (obvykle o velikosti několik mikrometrů). Vzniklý komplex je možné separovat ze suspenze pomocí vnějšího magnetického pole. Tato specifická separační technika umožňuje významné selektivní zakoncentrování cílových buněk.



Obrázek 28: Hlavní kroky imunomagnetické (IM) separace.

Před vlastní IMS se provádí pomnožení vyšetřovaného vzorku potravin ve vhodném, obvykle selektivním, živném médiu. Pomnožený vzorek je smíchán v mikrozkuhavce s imunomagnetickými částicemi, následuje 10 – 30 minutová inkubace při laboratorní teplotě, při níž se cílové bakterie váží na specifické protilátky magnetických částic. Po magnetické separaci a opakovaném promytí mohou být navázané bakteriální buňky identifikovány kultivačně nebo dalšími mikrobiologickými technikami (ELISA, polymerázová řetězová reakce, atd.). Detailní postup provedení IMS je uveden v kapitole 13.4.3.

Imunomagnetická separace je široce využívána v klinické, potravinářské, veterinární i environmentální mikrobiologii. Umožňuje separaci a následnou detekci i subletálně poškozených mikrobiálních buněk. Standardně je IMS součástí stanovení *E. coli* O157 v potravinách, kde umožňuje významné zkrácení doby vyšetření (nahrazuje krok selektivního pomnožení vzorku). Dostupné jsou také imunomagnetické částice (tzv. Dynabeads[®], výrobce Invitrogen, dříve Dynal) pro detekci dalších enteropatogenních nebo Shigatoxigenních kmenů *E. coli* (*E. coli* O26, O55, O104, O111, O145 a O172), salmonel či listerií v potravinách.

10. STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM

Citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám (AML) je sledována zejména pro klinické účely, tedy aby byla pacientům podávána správná antibiotika o vhodné koncentraci (klinicky účinná). V posledních letech je zaznamenáván zvyšující se trend výskytu rezistentních bakterií, a to jak v populaci lidí, tak zvířat včetně potravinových. Řada vědeckých studií prokázala možnost přenosu genů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám, a to nejen v rámci stejného druhu, možný je přenos také ze saprofytických mikroorganismů na mikroorganismy patogenní. Potraviny a potravinové suroviny mohou být významným zdrojem rezistentních kmenů mikroorganismů, které mohou být jejich prostřednictvím přeneseny na člověka.

10.1. Metody stanovení citlivosti mikroorganismů k AML

Metody stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám lze rozdělit na *semikvantitativní* a *kvantitativní*.

10.1.1. Semikvantitativní metody

Semikvantitativní metody nachází uplatnění zejména při rutinním screeningu citlivosti mikroorganismů k antibakteriálním látkám. Do této skupiny náleží **disková difuzní metoda**, která se používá zejména pro vyšetření citlivosti u rychle rostoucích, nenáročných bakterií a některých náročnějších bakterií. Na základě výsledků (velikosti inhibičních zón) jsou bakteriální izoláty zařazeny do kategorie citlivý, intermediálně rezistentní (výsledek na rozhraní mezi citlivým a rezistentním izolátem, v některých studiích jsou započítávány mezi rezistentními izoláty) nebo rezistentní k určité antimikrobiální látce. Při správném provedení prokazují výsledky diskové difuzní metody a dilučních metod vysokou shodu.

10.1.2. Kvantitativní metody

Citlivost určitých mikroorganismů nebo kmenů lze spolehlivě vyšetřit pouze kvantitativní metodou. Referenční metodou pro ověřování spolehlivosti ostatních metod vyšetřování citlivosti je **agarová diluční metoda**, která spolu s **diluční mikrometodou** patří k základním metodám pro vyšetření účinnosti nových antibiotik. Další metodou je tzv. **Etest**, který kombinuje principy diskové difuzní metody a metody diluční.

Diluční metody se užívají k určení minimální koncentrace antibiotika, potřebného k inhibici růstu vyšetřované bakterie. Vyšetření se provádí na agarových nebo bujonových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antibiotika, obvykle v dvojnásobné geometrické řadě. Do půd se očkuje standardní inokulum testovaného mikroorganismu. Po příslušné době inkubace se odečítá **minimální inhibiční koncentrace (MIC)** jako nejnížší množství sledovaného antibiotika, které inhibuje viditelný růst mikroorganismu. MIC se obvykle vyjadřuje v mg/l. Kmeny, jejichž MIC je nižší než stanovený breakpoint (rozhraní mezi citlivým a rezistentním kmenem), jsou k dané AML citlivé. Kmeny, jejichž MIC je vyšší než breakpoint, jsou k dané AML rezistentní. Kvalita výsledků závisí na dodržení metodiky, ověřuje se systémem kontrol.

10.1.3. Kultivační půdy pro stanovení citlivosti

Půdy k vyšetření citlivosti musí obsahovat dostatek živných látek, nezbytných pro přiměřený růst vyšetřované bakterie a nízký nebo žádný obsah inhibitorů antimikrobiálních látek. Tyto podmínky splňuje např. **půda Mueller-Hinton (M-H)**, a to ve formě agaru či bujonu. M-H agar a M-H bujon jsou standardní půdy pro vyšetření citlivosti většiny grampozitivních i gramnegativních bakterií. Pro vyšetření citlivosti náročnějších bakterií (např. kampylobakterů či streptokoků) se používá M-H agar s příměsí 5 % ovčí krve. Bakterie se

speciálními růstovými nároky (např. anaerobní mikroorganismy) vyžadují speciální půdy obohacené různými suplementy.

10.1.4. Inokulum

Výsledky vyšetření významným způsobem ovlivňuje stáří buněk (růstová fáze), koncentrace a způsob přípravy inokula. Inokulum se může připravovat z mikrobiální kultury buď přímo nebo kultivační metodou (tabulka 5).

Tabulka 5: Metody přípravy inokula pro stanovení citlivosti k AML.

Metoda	Příprava inokula	Koncentrace buněk/ml
Přímá	<ul style="list-style-type: none"> - 18-24 h kultura na neselektivní půdě (např. krevní agar), - 3 – 5 kolonií se rozetře ve 2 – 5 ml fyz. roztoku nebo M-H bujonu, zákal musí odpovídat 0,5 – 1 stupni McFarlanda - využití např. u grampozitivních koků 	$1,5 - 3,0 \cdot 10^8$
Kultivační	<ul style="list-style-type: none"> - 24 h či starší kultura na neselektivní půdě - 3 – 5 kolonií se rozetře do 0,5 ml BHI o teplotě 37 °C - inkubace: gramnegativní střevní tyčky 2 – 8 h/37 °C, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4 – 8 h/ 37 °C 	10^9

Standardní inokulum bakterií pro *diskovou difuzní metodu* musí po naočkování na Petriho misku vytvářet splývavý růst bez diferencovaných kolonií. Koncentrace inokula závisí na objemu očkovaném na půdu. Obvykle se připravuje výchozí inokulum o koncentraci přibližně $1,5 - 3 \cdot 10^8$ buněk v ml, což odpovídá zákalovému standardu 0,5 – 1 stupeň McFarlanda. V případě *dilučních metod* se výchozí inokulum upraví na konečnou koncentraci $10^4 - 10^5$ buněk v ml, a to ředěním výchozího inokula fyziologickým roztokem nebo bujonem.

10.2. Disková difuzní metoda

Diskovou difuzní metodou se stanoví citlivost nebo rezistence podle toho, zda vyšetřovaná bakterie ve stanovené koncentraci buněk na agarové půdě vytvoří nebo nevytvoří přípustnou **zónu inhibice** kolem disku s určitou koncentrací antimikrobiální látky, a to po předepsané době inkubace.

10.2.1. Provedení diskové difuzní metody

Připravené plotny s M-H agarem se před očkováním krátce suší při 37 °C. Inokulum lze očkovat **rozetřem** sterilním tamponem. Do zkumavky ponoříme sterilní vatový tampon, přebytečnou tekutinu otřeme o stěnu zkumavky a inokulum tamponem rovnoměrně rozetřeme po celém povrchu půdy ve třech různých směrech. Další možností je **přelití** povrchu živné půdy v Petriho misce 1 ml bakteriální bujónové kultury. K inokulaci použijeme sterilní pipetu, Petriho misku držíme mírně nakloněnou a pomalu vypouštíme obsah pipety tak, aby nedocházelo ke vzniku aerosolu. Postupným nakláněním Petriho misky docílíme rovnoměrného přelití celého povrchu agaru. Nadbytečnou tekutinu, která se shromáždí u spodního okraje Petriho misky, odsajeme stejnou pipetou pryč. Před aplikací disků se inokulum nechá při laboratorní teplotě dobře zaschnout (5 – 15 minut).

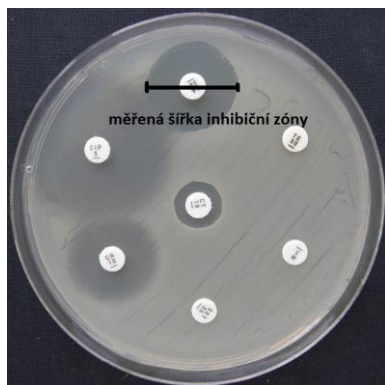
Pomocí *sterilní pinzety, jehly* nebo *dispenzoru* (dávkovače disků) se antibiotické disky kladou na povrch agaru. Rozmísťují se do kruhu, přičemž vzdálenost mezi středy disků a vzdálenost disků od okraje



Obrázek 29: Dispenzor.

plotny musí být přibližně 25 mm (na 1 misku se klade 5 – 6 disků). Disky se k plotně jemně přitisknou, aby celá plocha disku byla v kontaktu s povrchem půdy. Po dotyku disku s půdou začíná antibiotikum ihned difundovat do agarů, proto po umístění disku na Petriho misku s ním již nelze manipulovat. Misky se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 16 – 24 hodin v závislosti na testovaném mikroorganismu, do termostatu se umísťují dnem vzhůru.

Po ukončení inkubace se hodnotí velikost vzniklých **inhibičních zón**. Zóny se měří včetně disků, výsledky se uvádí v mm. Velmi jemný růst na okrajích zón se ignoruje, stejně tak jako plazivý růst bakterií rodu *Proteus* uvnitř inhibičních zón. Přítomnost drobných kolonií uvnitř inhibiční zóny se hodnotí jako rezistence. Velké kolonie uvnitř zóny inhibice jsou způsobeny smíšenou kulturou, kontaminací nebo přítomností rezistentních variant. Tyto kolonie je nutno izolovat, identifikovat a opětovně testovat. Jedná-li se o rezistentní varianty, odečítá se kmen jako rezistentní.



Obrázek 30: Disková difuzní metoda – inhibiční zóny.

Nedojde-li k vytvoření žádné viditelné inhibiční zóny (mikroorganismy rostou až k disku), je výsledkem zóna o velikosti 6 mm, nikoli 0 mm. Zóna se měří včetně disku a jeho standardní velikost je právě 6 mm.

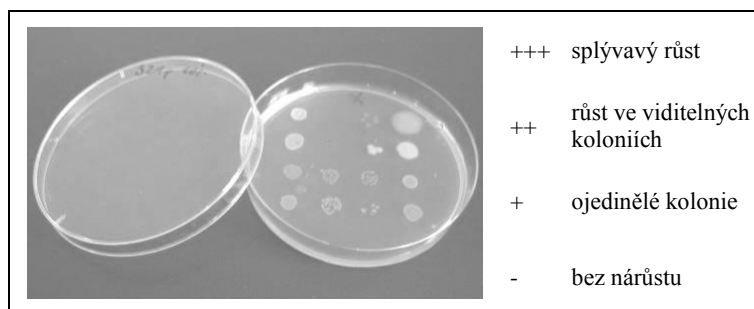
Průměr zóny inhibice, vytvořený vyšetřovanou bakterií kolem disku, se porovnává s **hraničním průměrem inhibiční zóny** pro citlivé kmeny. Vytvoří-li vyšetřovaný kmen inhibiční zónu o stejném nebo větším průměru, než je hraniční průměr inhibiční zóny pro citlivé kmeny, pokládá se za citlivý k dané antimikrobiální látce. Vytvoření inhibiční zóny o menším průměru se považuje za rezistenci.

10.3. Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda je vysoce standardizovaná technika, používaná jako referenční metoda sloužící mimo jiné k hodnocení přesnosti ostatních metod stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám. Vzhledem k poměrně pracnosti a časové a ekonomické náročnosti, není tato metoda vhodná pro vyšetření malého počtu izolátů.

Hodnota MIC se stanovuje na agarových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antimikrobiálních látek. Obvykle se připravuje 12 – 15 koncentrací jednoho antibiotika ředěných dvojnásobně geometrickou řadou. Na půdy se očkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií, a to formou **spotů** speciálním vzorkovačem. Na jedné Petriho misce (tj. jedné koncentraci antibiotika) můžeme testovat až 20 různých kmenů bakterií. Soubor vyšetřovaných kmenů takto naočkujeme na všechny připravené Petriho misky (tj. koncentrační řadu dané antimikrobiální látky).

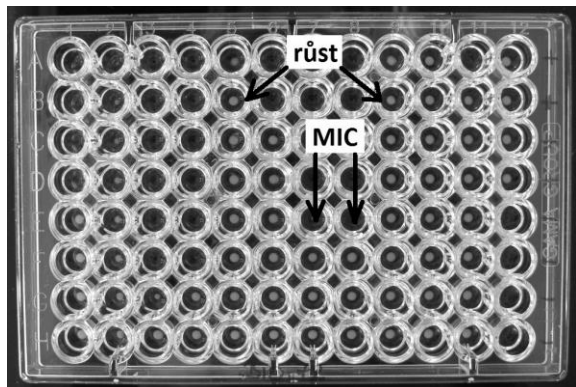
Po příslušné době inkubace hodnotíme semikvantitativně pro každý testovaný kmen jeho růst (tvorbu kolonií) na jednotlivých Petriho miskách (obrázek 31). Jako hodnotu MIC odečteme nejnižší koncentraci antibiotika, při které v místě inokulace konkrétního bakteriálního kmene nedojde k tvorbě viditelných kolonií.



Obrázek 31: Agarová diluční metoda – vyhodnocení růstu mikroorganismů.

10.4. Diluční mikrometoda

Diluční mikrometoda (též mikrodiluční metoda) se provádí v mikrotitračních destičkách. Jamky mikrotitrační destičky obsahují zvolené koncentrace antimikrobiálních látek naředěné v M-H bujonu (geometrická řada ředění). Do jamek se očkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií. Po příslušné době inkubace se odečítá hodnota MIC jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky (jamka destičky) bez viditelného růstu mikroorganismů (intenzivní zákal, sediment). Diluční mikrometoda vykazuje velkou shodu s výsledky agarové diluční metody.



Obrázek 32: Vyhodnocení diluční mikrometody.

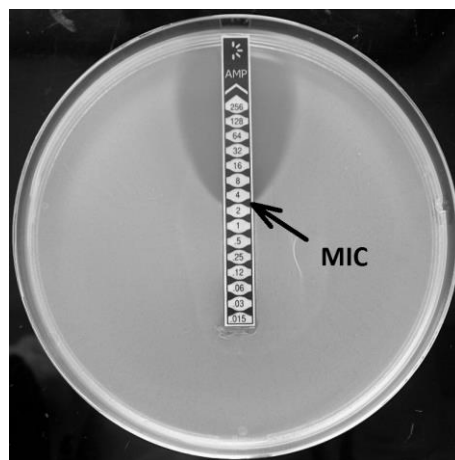
živného média – bujon bez antibiotika nezaočkovaný mikroorganismem). Destičky pro mikrodiluční metodu lze připravit v laboratoři nebo získat od komerčního výrobce. Lze je uchovávat několik týdnů při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odečítání hodnot MIC je vizuální, případně spektrofotometrické za použití readeru mikrotitračních destiček.

Půdy s antibiotiky se rozplňují mechanickými rozplňovači do jamek mikrotitrační destičky s 96 jamkami s kulatým nebo kónickým dnem. Rozplňovaný objem je obvykle $100\text{ }\mu\text{l}$ /jamku. Počet koncentrací antibiotika závisí na uspořádání destičky. Obvykle se připravuje osm koncentrací jednoho antibiotika v dvojnásobné geometrické řadě a na jedné destičce se vyšetřuje MIC 12 antibiotik na jeden kmen. Jedna až dvě jamky se nechávají jako kontrolní (kontrola růstu – bujon bez antibiotika zaočkovaný mikroorganismem, kontrola kontaminace

10.5. Etest

Etest je metoda pro kvantitativní vyšetření citlivosti, která kombinuje principy diskové difuzní metody a diluční metody. Pro vysoký stupeň shody s výsledky MIC získanými referenční agarovou diluční metodou je Etest vhodný ke stanovení MIC u řady mikroorganismů, včetně náročných bakterií a anaerobů. Výhodou Etestu je jednoduché provedení, proužky mohou být aplikovány na různá živná média uspokojující nároky různých bakterií.

Etest je inertní plastový proužek, který na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobiální látky ve vysušeném stavu. Na druhé straně proužku je vyznačen kód antimikrobiální látky a kontinuální stupnice, obvykle odpovídající rozmezí 15 ředění antibiotika dvojnásobně geometrickou řadou. Stupnice slouží k odečítání hodnot MIC. Na povrch agaru, naočkovaného inokulem testovaného mikroorganismu v takové koncentraci, aby výsledný růst byl splývavý, se přiloží Etest stranou, která obsahuje antimikrobiální látku. Po inkubaci (prostředí, teplota a doba závisí na druhu testovaného mikroorganismu) se vytváří kolem proužku Etestu **eliptická inhibiční zóna**. Hodnota MIC se odečítá na stupnici v místě, kde elipsa přetíná okraj proužku.



Obrázek 33: Etest – inhibiční zóna.

11. METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

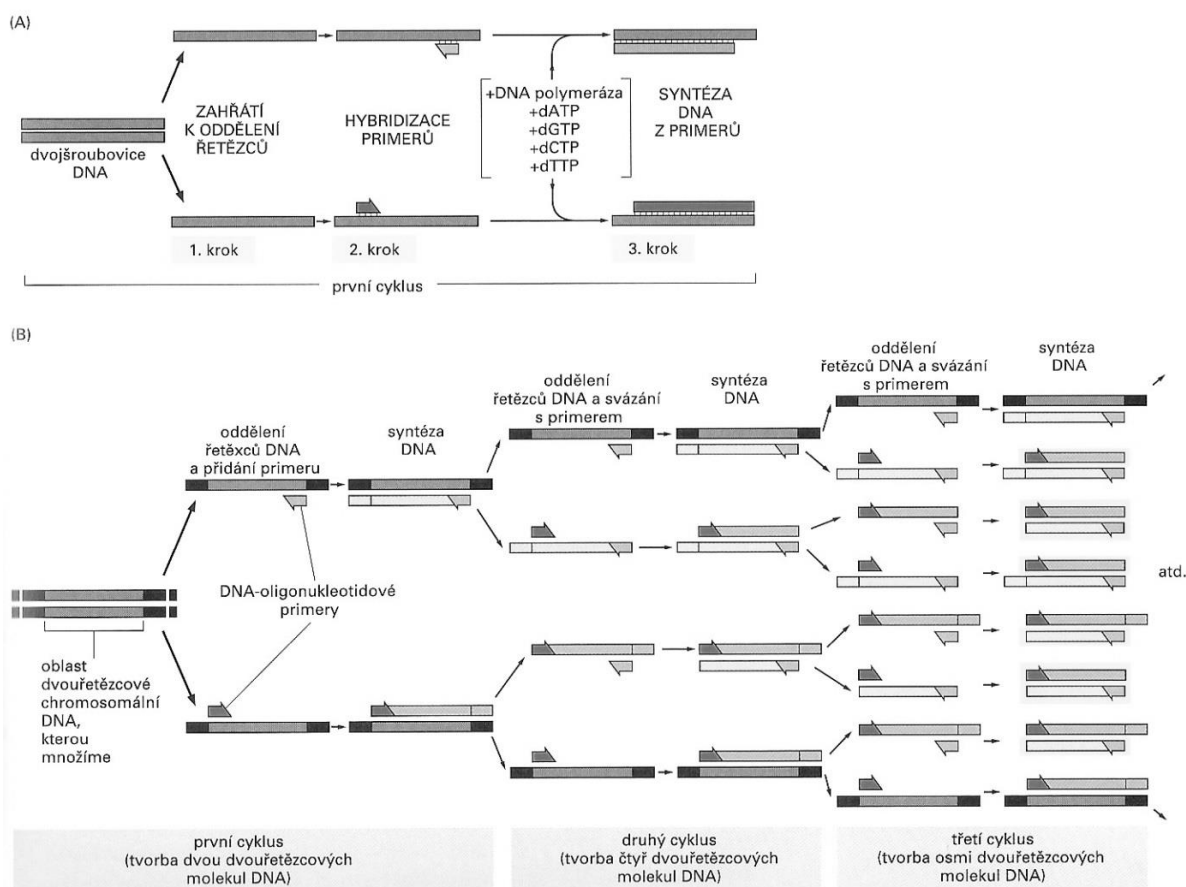
V dnešní době jsou molekulárně biologické metody běžnou součástí mikrobiologických analýz. Tyto genotypové metody se zaměřují na studium nukleových kyselin (chromozomální či plazmidovou DNA, případně RNA). Využívají se nejenom k identifikaci, ale také k typizaci mikroorganismů a charakterizaci mnohých významných genů.

11.1. Polymerázová řetězová reakce

V osmdesátých letech 20. století byla vynalezena nová, rychlá a účinná metoda pro klonování DNA – **polymerázová řetězová reakce** (PCR, angl. *Polymerase Chain Reaction*). Tato metoda se stala základem pro mnoho dalších genotypových metod. Pomocí PCR můžeme rychle a vysoce selektivně namnožit konkrétní nukleotidové sekvence obsažené v jakékoli DNA (deoxyribonukleové kyselině) za podmínek *in vitro*. Metoda PCR je dnes hojně využívána např. v diagnostice při analýze onemocnění nebo při průkazu specifických úseků v DNA.

11.1.1. Princip metody PCR

Princip PCR je založen na využití enzymu DNA-polymerasy pro opakované kopírování (amplifikaci) templátové (vzorové) molekuly DNA. Syntéza je řízena krátkými oligonukleotidy (primery), které nasedají na templátovou DNA na začátku a konci amplifikovaného fragmentu. Každý primer reaguje s jiným vláknem původní dvouřetězcové DNA (viz obrázek 34).



Obrázek 34: Schéma amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce. (Alberts *et al.*, 2005)

Mnohonásobné amplifikace (tzn. namnožení DNA) je dosaženo opakováním tří základních kroků – denaturace, hybridizace a syntézy nových vláken.

1. Při **denaturaci** templátové DNA (obvykle při teplotě 95 °C) dochází k uvolnění vodíkových můstků mezi bázemi komplementárních nukleotidů a k přechodu dvouřetězcové šroubovice DNA (dsDNA) na jednořetězcovou (ssDNA).
2. Při kroku **hybridizace** se reakční směs nejprve ochladí (teplota kolem 50 – 60 °C). V tomto kroku jsou na specifická místa navázány komplementární primery (tzv. annealing primerů). Zabrání vzniku původní dvoušroubovice a ohraničí amplifikovaný úsek DNA z obou stran.
3. Za přítomnosti DNA-polymerasy a základních stavebních kamenů DNA – nukleosidtrifosfátů (dNTP) je obvykle při teplotě 72 °C zahájen proces prodlužování nového vlákna DNA podle templátu (původní DNA). Tato fáze se nazývá **syntéza** nebo **elongace**.

Pro nasyntetizování dostatečného množství PCR produktu se zmíněné kroky 25 – 35× opakují. Celý proces amplifikace probíhá v **termocykleru** – přístroji, který umožňuje nastavení cyklického střídání teplot v reakční směsi v přesně definovaných časových intervalech. K detekci namnožených PCR produktů je nejčastěji využívána elektroforetická separace v agarózovém gelu s následným obarvením v roztoku ethidium bromidu a vizualizací v UV světle.

11.1.2. Základní pojmy

Master mix – reakční směs zajišťující optimální podmínky pro průběh reakce. Je složena z koncentrovaného pracovního pufru obsahujícího hořčnaté ionty, které zajišťují vhodné podmínky pro aktivitu DNA-polymerasy, dále směsi dNTPs, vlastní DNA-polymerasy, specifických primerů, PCR vody a templátové DNA. Koncentrace jednotlivých komponent reakční směsi je pro správnou tvorbu PCR produktu velmi důležitá a stanovuje se empiricky.

Templát – DNA, která slouží jako vzor (šablona) pro syntézu nových řetězců; pro reakci PCR se používá DNA o koncentraci přibližně 10 ng/μl.

DNA-polymerasa – enzym používaný k syntéze nové DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v templátu od místa navázaného primeru. Enzym *Taq* polymerasa, který se nejčastěji pro PCR používá, je izolován z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* a umožňuje opakované zahřátí na teplotu 95 °C, enzym zůstává aktivní při této teplotě až 40 minut.

dNTP – 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfátů (adenin, guanin, cytosin a thymin).

Primery – jsou oligonukleotidy (o velikosti obvykle 20-25 bází), které svou sekvencí odpovídají DNA templátu a vymezují úsek, který bude amplifikován.

Termocykler – teplotní cyklátor je zařízení, ve kterém za optimálních a regulovaných teplotních podmínek probíhá PCR reakce (obrázek 35).

Marker – velikostní standard, obsahující různě dlouhé fragmenty DNA s přesně definovaným počtem páru bází. Používá se při agarózové gelové elektroforéze k odhadu velikostí PCR produktů na základě jejich pohyblivosti v agarózovém gelu.



Obrázek 35: Termocykler.

11.1.3. Provedení metody PCR

11.1.3.1. Izolace templátové DNA

Prvním krokem v provedení PCR je extrakce nukleové kyseliny a její oddělení od ostatních složek buňky. Kvalita izolované DNA rozhoduje o úspěšnosti průběhu polymerázové řetězové reakce, případně dalších genotypových metod. Existuje řada metod extrakce a purifikace nukleových kyselin, kterými se dá získat DNA o různé čistotě, integritě a množství. Výběr izolační techniky je závislý na následně použité genotypové metodě. Kontrola kvality, kvantity a čistoty izolované DNA se provádí gelovou elektroforézou a UV spektrofotometrií.

Nejlevnějším způsobem izolace bakteriální DNA je **lýza bakteriálních buněk varem**. Z několika kolonií čisté 24-hodinové bakteriální kultury se vytvoří suspenze ve 100 µl sterilního fyziologického roztoku (případně sterilní destilované vody). Po zahřátí suspenze mikroorganismů při 100 °C v suché lázni 15 – 20 minut je DNA uvolněna do roztoku. Po ukončení inkubace vzorek odstředíme 10 minut při 10 000 rpm. Získaný supernatant použijeme do PCR reakce jako templátovou DNA.

Dále se mohou používat **chelatační iontoměničové pryskyřice**. V tomto případě je izolace založena na iontové vazbě molekuly DNA na nabitý iontoměnič v roztoku či na membráně, promytí a uvolnění DNA do roztoku. Tato metoda je velmi rychlá a díky komerčně dostupným kitům (např. Chelex®100, nebo produkty od firmy Qiagen) i rozšířená. Vytvoří se suspenze z 24-hodinové bakteriální kultury v 1 ml sterilního fyziologického roztoku. Suspenzi odstředíme 10 min při 10 000 rpm a poté supernatant opatrně slijeme. Do mikrozukmavky typu Eppendorf přidáme 200 µl 20% roztoku Chelex®100, krátce protřepeme na vortexu a 10 min zahříváme v suché lázni při 95,5 °C. Po záhřevu mikrozukmavky odstředíme při 13 000 rpm po dobu 3 min. Jako vzorek DNA se používá supernatant.

Jednou z nejstarších, avšak stále používaných, metod izolace DNA je **fenol-chloroformová extrakce**. Po smíchání fenolu a chloroformu s hrubým lyzátem (lyzované buňky pomocí lysozymu, SDS detergentu a proteinázy K) a centrifugací, se vytvoří dvě fáze. Spodní organická fáze, horní vodná fáze, která obsahuje DNA a RNA. Fázové rozhraní tvoří tenká vrstva fenolem vysrážených proteinů. Pokud se před extrakcí použije enzym RNáza, získáme touto metodou pouze DNA. Zbytky fenolu se odstraní směsí chloroform:isoamylalkohol. Následně je DNA vysrážena ethanolem. Tato metoda je velmi levná a výtěžky DNA jsou vyšší a stabilnější, než které poskytují komerční izolační kity. Nevýhodou je práce s fenolem a chloroformem, kvantita i kvalita získané nukleové kyseliny závisí na přesnosti provedení práce a je časově velmi náročná. Není proto vhodná pro laboratoře s velkým množstvím vzorků.

V dnešní době se pro izolaci DNA používají velmi oblíbené **silikátové kolonky**. Jejich výhodou je časová i pracovní nenáročnost a získání poměrně čisté DNA. Tato technika je založená na principu afinitní chromatografie. DNA má v přítomnosti chaotropních solí schopnost vázat se na silikátový povrch. Při promývání a odstraňování ostatních složek buněčného lyzátu, které volně prochází kolonkou, DNA zůstává adherována až do použití elučního pufru, poté se uvolní.

K izolaci nukleových kyselin se mohou použít také **magnetické částice**, které se přidají k hrubému lyzátu. Povrch těchto paramagnetických nosičů je upravený tak, aby mohl dočasně vázat vlákna nukleových kyselin a pomocí magnetu je separovat od ostatních složek buňky.

Technika **vysolování** je založena na změně rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku. Používá se např. síran amonný, chlorid sodný.

11.1.3.2. Příprava PCR reakční směsi

Všechny komponenty pro přípravu PCR směsi (master mixu) je vždy třeba před použitím jemně promíchat a krátce odstředit při nízkých otáčkách na pikofuze. Jako první pipetujeme vodu, reakční pufr a ostatní komponenty – primery, dNTP, $MgCl_2$, *Taq* polymerasu do ní postupně přidáváme. Jako poslední se přidá templátová DNA. Pro rutinní provádění PCR jsou k dispozici komerčně předpřipravené reakční směsi.

Při vyšetřování většího množství vzorků si můžeme PCR reakční směs připravit najednou smícháním všech komponent v mikrozkuhavce typu Eppendorf dostatečného objemu. Obsah promícháme a krátce odstředíme, směs udržujeme na ledu nebo v chladicím stojánku a ihned rozplníme do předem označených PCR mikrozkuhovek o objemu 200 μ l. Po rozplnění přidáme potřebné množství templátové DNA daného vzorku (obvykle 1 – 2 μ l). Obsah opět promícháme a krátce odstředíme. Takto připravené mikrozkuhavy vkládáme do termocyklu.

11.1.3.3. Systém kontrol PCR reakce

Správný průběh reakce prověřujeme použitím několika systémů kontrol, jednak pozitivní a negativní kontrolou pro sérii vzorků a jednak interní kontrolu pro individuální vzorky. Dále je nezbytné kontrolovat i proces izolace DNA – tzv. negativní izolační kontrola.

Negativní kontrola – reakční směs + PCR voda či DNA získaná z jiného rodu bakterií, než testujeme. Tato kontrola slouží jako indikátor, že žádná z komponent použitých pro master mix nebyla kontaminována a že celý proces reakce včetně detekce proběhl správně.

Pozitivní kontrola – reakční směs + DNA získaná z buněk stejného rodu bakterií, jež testujeme, např. sbírkového kmenu. Tato kontrola slouží jako indikátor, že celá reakce proběhla správně a že všechny použité komponenty jsou funkční a v dostatečném množství.

Interní kontrola – přidává se do reakční směsi společně se specifickými primery a je přítomna v každém vzorku. Jako interní kontrolu používáme např. úsek genu pro 16S rRNA (detekuje přítomnost jakékoli bakteriální DNA). V případě, že metodou PCR není detekován hledaný specifický gen, ale ve vzorku je obsažena bakteriální DNA, musí být interní kontrola pozitivní, jinak reakce neproběhla správně. Nejčastější příčinou problémů je přítomnost inhibitorů PCR (např. nukleas).

Negativní izolační kontrola – slouží k ověření kvality procesu izolace DNA. Místo vyšetřovaného bakteriálního kmene použijeme sterilní destilovanou vodu nebo, v případě že DNA izolujeme přímo ze vzorku potravin, sterilní pomnožovací médium. Při správném provedení negativní izolační kontroly nedojde k vyizolování žádné DNA, proto také výsledek PCR reakce je negativní. Tato kontrola slouží k ověření, že vlastní postup izolace DNA není zdrojem cizorodé DNA, která by mohla následně ovlivnit výsledky PCR.

11.1.4. Horizontální gelová elektroforéza

K vyhodnocení výsledků PCR se nejčastěji používá metoda horizontální agarózové gelové elektroforézy (ELFO).

11.1.4.1. Příprava agarózového gelu

Podle požadované koncentrace agarózového gelu (obvykle 1,5 – 3%, záleží na velikosti PCR produktu) si navážíme potřebné množství agarózy a k ní přidáme 0,5 \times TBE (tris-EDTA-borátový pufr). Agarózu rozvaňujeme v mikrovlnné troubě,



Obrázek 36: Tvořítka na přípravu agarózového gelu.

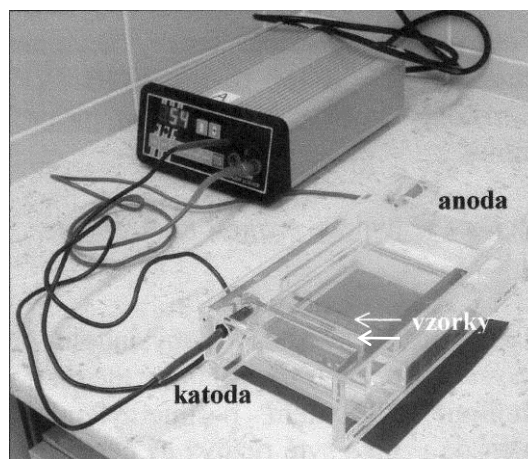
opakovaně ji zahříváme k varu a promícháváme až do úplného rozpuštění. Pak necháme agarózu zchladit asi na 45 °C a poté ji nalijeme do připravené vaničky (viz obrázek 36). Případné bubliny, které by bránily při migraci DNA gelem, odstraníme špičkou. Do agarózy vsuneme hřebínek, který se nesmí dotýkat dna vaničky a agarózu necháme na vodorovné ploše ztuhnout při laboratorní teplotě. Ze ztuhlého gelu opatrně vysuneme hřebínek, nesmí při tom dojít k poškození gelu.

11.1.4.2. Elektroforéza

Připravený gel vložíme do elektroforetické vany a zalijeme 0,5× TBE pufrem. Celý gel musí být ponořen, hladina TBE pufru by měla být 1 – 2 mm nad gelem. Do jamek gelu nanášíme po 10 µl PCR amplifikované reakční směsi, a to jednotlivé vzorky i pozitivní a negativní kontrolu. Pokud nepoužíváme barevnou polymerázu s vkládacím pufrem, musíme před nanesením PCR produkt smíchat v poměru 1:5 s vkládacím pufrem, který obsahuje stabilizační složky a látku (barvivo) pro zviditelnění přibližné migrace DNA gelem. Do jedné jamky gelu nanese DNA marker.

Druhou možností je nanášení vzorků do gelu tzv. „na sucho“ mimo elektroforetickou vanu. Gel s nanesenými vzorky poté vložíme do elektroforetické vany a zalijeme 0,5× TBE pufrem, pufr musíme nalévat velmi opatrně, aby nedošlo k vyplavení vzorků z jamek.

Před spuštěním elektroforézy zkontrolujeme, zda je gel ve vaničce umístěn ve správné orientaci. Jamky se vzorky musí být u katody (obvykle černý vodič), aby záporně nabitá DNA mohla migrovat směrem k anodě (obvykle červený vodič). Rychlost migrace závisí na molekulové hmotnosti fragmentů DNA. Podmínky elektroforézy – napětí, proud a dobu, volíme podle hustoty gelu, počtu a velikosti očekávaných produktů.



Obrázek 37 : Horizontální elektroforéza.

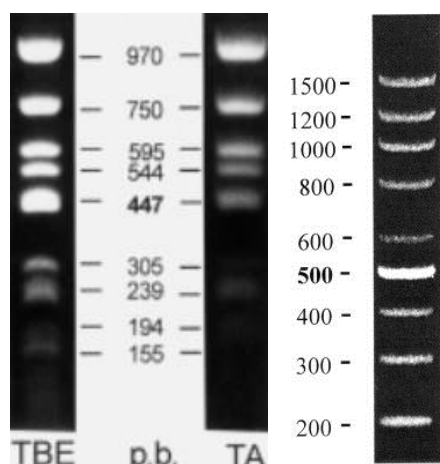
11.1.5. Vyhodnocení PCR

Po ukončení elektroforézy přeneseme gel do misky s roztokem ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µl.ml⁻¹ a necháme barvit (asi 10 minut), abychom mohli identifikovat polohu PCR produktů, které nejsou pouhým okem viditelné. Ethidium bromid je látka interkalující se mezi sousední páry bází v DNA. Po obarvení gel opláchneme v misce s vodou, abychom vymyli přebytek DNA barviva, a prohlédneme na transiluminátoru pod UV světlem, kde ethidium bromid oranžově fluoreskuje. Bezpečnější alternativou je barvení PCR produktů pomocí látky Midori Green, která emituje zelenou fluorescenci.

Pozor! Ethidium bromid je mutagenní a teratogenní látka, proto veškerou manipulaci s ním či obarveným gelem provádíme v ochranných rukavicích!

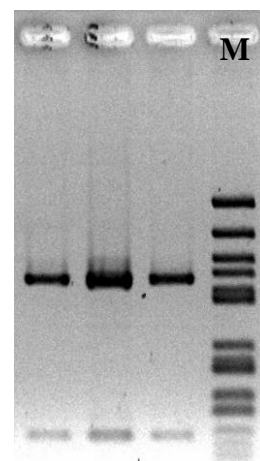
V některých laboratořích se ethidium bromid přidává přímo do agarózového gelu při jeho přípravě. Agaróza se naváží, přidá se potřebné množství 0,5× TBE a 1-2 kapky roztoku ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µl.ml⁻¹. Další postup přípravy gelu je shodný. Při tomto způsobu se vzniklé PCR produkty barví již během elektroforézy, po jejímž ukončení je možné ihned vyhodnotit výsledky. Nevýhodou je velké množství pomůcek kontaminovaných ethidium bromidem a mnohem vyšší nároky na bezpečnost práce.

Velikost PCR produktu je v určitém velikostním rozmezí a udává se v párech bází (bp). K odhadu velikostí DNA produktů generovaných v PCR se používá DNA marker s fragmenty o známé velikosti, a to na základě srovnání jejich pohyblivosti.



Obrázek 38: Příklady DNA markerů.

M = DNA marker

PCR produkt
o velikosti 469 bp →PCR produkt
o velikosti 125 bp →

Obrázek 39: Vyhodnocení PCR – příklad.

11.1.6. Vybrané modifikace metody PCR

Modifikací polymerázové řetězové reakce vznikla v průběhu let řada, některé z nich jsou dokonce využitelné i při typizaci (tzv. fingerprinting) jednotlivých izolátů mikroorganismů (např. REP-PCR – interrepetitivní (repetitivní) PCR či RAPD – náhodná PCR).

Mezi běžně používané patří mnohonásobná **multiplex-PCR**, která umožňuje detekci více genů současně. Podle počtu požadovaných PCR produktů (amplikonů), obsahuje master mix příslušný počet párů primerů. Tato metoda se často využívá pro stanovení několika bakteriálních druhů současně (např. *Campylobacter jejuni* a *C. coli*) nebo při detekci genů kódujících stafylokokové enterotoxiny či genů rezistence.

Další významnou modifikací je **real-time PCR (qPCR)** – metoda umožňující přímou detekci a kvantifikaci PCR produktu „v reálném čase“ (v průběhu celé PCR reakce), nikoliv až po jeho skončení. Při stanovení PCR produktů se využívá sledování fluorescenčního signálu, jeho intenzita je permanentně snímána a analyzována speciálním přístrojem, ve kterém současně probíhá vlastní PCR. K detekci lze využít fluorescenční barviva fluoreskující po vazbě na dsDNA (např. SYBR[®] Green I), fluorescenčně značené hybridizační sondy, které se komplementárně vážou na vnitřní část amplifikované sekvence, nebo fluorescenčně značené primery. Díky tomu, že se vzniklé PCR produkty nemusí detekovat elektroforeticky, je tato metoda jednodušší a rychlejší než klasická PCR. Velkou výhodou metody real-time PCR je možnost kvantifikace množství templátu. Stanovení množství molekul nukleových kyselin ve vzorku se využívá při studiu detekce patogenních mikroorganismů a virů a také exprese genů (zejména studium transkripce – zda je a v jaké míře daný gen přepisován z DNA do mRNA).

11.1.7. Využití metody PCR v mikrobiologii potravin

V oblasti potravinářské mikrobiologie nachází metoda PCR široké uplatnění. Využívá se k rychlé a rutinní detekci alimentárních patogenů přímo ze vzorků potravin. V těchto vzorcích se mikroorganismy obvykle vyskytují v nízkých počtech a při jejich průkazu standardními metodami je nutné primárního pomnožení, čímž se prodlužuje doba identifikace. Pomocí PCR však můžeme prokázat i mrtvé bakterie, které bychom již nevykultivovali. Metodu PCR můžeme využít ke confirmaci (potvrzení) izolátů na úrovni rodu nebo druhu, dále k průkazu genů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám, faktory virulence, genů zodpovědných za tvorbu enterotoxinů, biogenních aminů či bakteriocinů. Avšak u těchto genů nemusí dojít v potravinové matrici k expresi.

11.2. Pulzní gelová elektroforéza

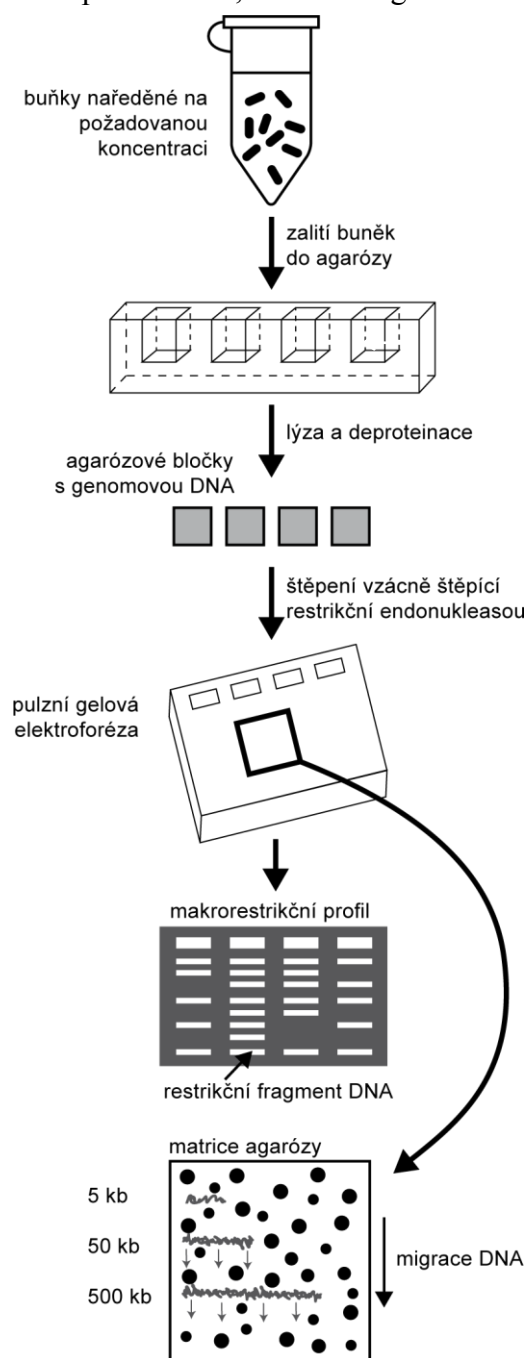
Technika pulzní gelové elektroforézy (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) se používá zejména při genotypizaci alimentárních patogenů, kdy je potřeba zjistit míru příbuznosti jednotlivých izolátů daného druhu získaných z různých zdrojů. Tato epidemiologicky významná metoda se vyznačuje vysokou rozlišovací schopností a reprodukovatelností. Výsledky mohou být mezilaboratorně i mezi jednotlivými státy srovnávány. Nevýhodou této metody je poměrně velká časová náročnost (2 – 3 dny).

Metoda PFGE využívá makrorestrikční analýzu genomové DNA provedenou *in situ*. Při této technice jsou používány restriční endonukleasy (RE, restriktasy) - enzymy štěpící DNA ve specifických místech za vzniku dvouřetězcových zlomů DNA. Je potřeba vybrat endonukleasy, které DNA štěpí vzácně (rozpoznávají a štěpí sekvence, které se v genomové DNA vyskytují zřídka) a tím vytváří dlouhé restriční fragmenty (o velikosti desítek kilobází až několik megabází). Tyto RE (např. *XbaI*, *SpeI*, *SmaI*) jsou izolovány z různých mikroorganismů. Ideální počet fragmentů je 15 – 30 a jejich separace probíhá ve speciálně upravené elektroforetické vaně hexagonálního tvaru.

11.2.1. Provedení PFGE

Prvním krokem PFGE je kultivace bakteriálních buněk do přesně stanovené koncentrace a jejich smíchání s roztavenou agarózou s nízkým bodem tání. Tato buněčná suspenze se přenesení do malých tvořítek. Lýza buněk, deproteinace i následné promývání od proteinázy probíhá v takto vytvořených bločcích. DNA je tímto chráněna před nespecifickou fragmentací při pipetování. Následuje štěpení DNA restričními endonukleasami. Agaróza umožňuje dobrou difuzi enzymů k DNA. Agarozové bločky s naštěpenou DNA se mohou přímo nanášet na gel. Při pulzní gelové elektroforéze je gel vystaven elektrickému poli, jehož směr se pod určitým úhlem v časových intervalech periodicky mění. Aby se molekuly DNA mohly pohybovat ve směru změněného elektrického pole, musí nejdříve změnit svou orientaci. Větší molekuly DNA potřebují na tuto změnu více času než kratší fragmenty DNA a tak je jejich výsledný přímočarý pohyb pomalejší. Poté se gel barví interkalačním barvivem ethidium bromidem, které pod UV fluoreskuje.

Gely jsou analyzovány počítačovým softwarem např. programem BioNumerics (Applied Maths). Numerická analýza zahrnuje výpočet podobnosti a shlukovou analýzu. Množina získaných fragmentů je analyzována z hlediska jejich přítomnosti či nepřítomnosti u jednotlivých izolátů, kdy míra shody je mírou jejich příbuznosti.



Obrázek 40: Schéma provedení PFGE. (Šmarda *et al.*, 2005 – upraveno)

12. STANOVENÍ BAKTERIÁLNÍCH TOXINŮ

Patogenní bakterie schopné produkovat toxiny označujeme jako toxigenní. Produkované exotoxiny nebo endotoxiny jsou příčinou vzniku řady infekcí či onemocnění z potravin, mnohé z nich se dokonce řadí mezi potenciální biologické zbraně.

Exotoxiny jsou zpravidla vysoce toxické proteiny vznikající jako metabolické produkty při množení patogenních bakterií v potravině nebo v průběhu jejich sporulace. Tvorba exotoxinů je typická pro některé grampozitivní bakterie. Pokud jsou příčinou onemocnění exotoxiny přítomné v potravině ve chvíli její konzumace, hovoříme o **alimentární intoxikaci**. Původci alimentárních intoxikací jsou *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*. Exotoxiny se mohou také uvolňovat až v gastrointestinálním traktu po konzumaci potravy kontaminované příslušnými bakteriemi (např. *C. perfringens*). Některé exotoxiny jsou termorezistentní, takže tepelné opracování potravin může inaktivovat přítomné bakterie, nikoliv však přítomné toxiny. To platí pro toxiny produkované *S. aureus* (stafylokokové enterotoxiny) a emetický toxin *B. cereus* (cereulid), jejichž účinek je zaměřen především na oblast gastrointestinálního traktu. Botulotoxin (neurotoxin produkovaný *C. botulinum*) je termolabilní. Pokud je místem působení exotoxinů střevo, jsou označovány jako enterotoxiny.

Endotoxiny bývají přirozenou součástí buněčné stěny a jsou do okolí bakteriální buňky uvolněny po její smrti v žaludku nebo střevě konzumenta. Zpravidla se jedná o termolabilní lipopolysacharidy, které jsou kulinárními úpravami inaktivovány. Endotoxiny v prostředí zažívacího traktu vyvolávají příznaky onemocnění z potravin (**alimentární toxoinfekce**) s typickými příznaky: průjem, zvýšená tělesná teplota, pokles krevního tlaku, atd. Produkce endotoxinů je typická pro některé gramnegativní bakterie např. *Salmonella Enteritidis*, *S. Typhimurium* či Shigatoxigenní kmeny *Escherichia coli*.

Používané metody umožňují detekovat toxiny přítomné v potravině nebo zhodnotit, zda jsou bakterie izolované z potravin schopné toxiny vytvářet – tedy toxigenní. Dělí se na **metody přímé** – založené na přímém průkazu toxinů v potravině (zpravidla metody imunologické či fyzikálně-chemické) a **metody nepřímé** – spočívající v detekci genů zodpovědných za tvorbu toxinu pomocí molekulárně biologických metod (např. PCR). Přítomnost genu neznamena, že daný toxin bude bakteriálním kmenem produkován (nemusí dojít k jeho expresi).

Práce s bakteriálními toxiny, které jsou např. součástí vyšetřovacích setů jako pozitivní kontrola, nebo manipulace s některými toxigenními bakteriálními kmeny je dle platné legislativy v laboratořích možná pouze na základě povolení, které uděluje Státní úřad pro jadernou bezpečnost. Jde o opatření související se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a možností jejich případného zneužití. Opatření se týká: stafylokokových enterotoxinů, Shigatoxinů 1 a 2, toxinů *C. perfringens*, botulinových toxinů, Shigatoxigenních kmenů *E. coli* a *C. botulinum*. Povolení je nutné i pro práci s aflatoxiny.

V následujícím přehledu jsou uvedeny pouze metody rutinně používané v laboratořích (často dostupné jako komerční testovací sety), nikoli kompletní výčet všech použitelných metod.

12.1. Stanovení toxinů *Staphylococcus aureus*

V současnosti je známo 22 typů **stafylokokových enterotoxinů** (tzv. SEs): SEA – SEV. Toxiny SEA, SEB, SEC, SED, SEE se označují jako tzv. klasické SEs, ostatní SEs se označují jako tzv. nové typy. Schopnost produkovat stafylokokové enterotoxiny lze prokázat asi u poloviny kmenů *S. aureus* izolovaných z potravin. Rizikové množství *S. aureus* v potravině, které je schopno vyprodukovat dostatečné množství stafylokokových enterotoxinů (tj. alespoň $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ potravy) je $10^5 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$. Stafylokoková enterotoxikóza bývá spojována s konzumací mléčných výrobků (zejména sýrů) a potravin s vysokým podílem ruční práce (lahůdky, cukrovinky).

12.1.1. Přímé metody

K přímé detekci stafylokokových enterotoxinů se nejčastěji používají imunologické metody, založené na reakci mezi antigenem a specifickou protilátkou. Antigenem je stafylokokový enterotoxin přítomný v potravíně a produkováný bakterií *S. aureus* během růstu.

Další možností přímého stanovení SEs jsou metody fyzikálně-chemické, mezi nejpoužívanější patří **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**, lze využít také metodu **LC-MS** kombinující fyzikální separaci pomocí kapalinové chromatografie (LC) s detekcí hmotnostní spektrometrií (MS) aj.

12.1.1.1. Reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA)

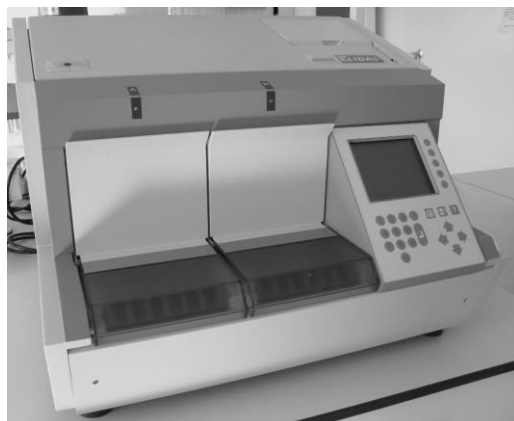
Metoda RPLA (viz kapitola 9.1.1.1.) umožňuje prostřednictvím testovací soupravy SET-RPLA (výrobce Denka-Seiken) detekovat SEA, SEB, SEC, SED přímo ve vzorcích potravin nebo v kultivačních médiích. Mezi SEA a SEE může docházet ke křížové reakci, a proto SET-RPLA neobsahuje specifickou protilátku pro SEE a kmeny s produkcí SEE jsou klasifikovány jako SEA produkující. Citlivost této metody se pohybuje kolem $1 - 2 \text{ ng.g}^{-1} (\text{ml}^{-1})$ vzorku. Po nanesení vzorků a příslušných protilátek do jamek se mikrotitrační destička inkubuje při laboratorní teplotě 20 – 24 hodin. Výsledky reakce lze hodnotit semikvantitativně podle mřížkové struktury vzniklé na dně jamek mikrotitrační destičky. Výhodou testu je možnost detekce SEs bez potřeby komplikovaného laboratorního vybavení.

12.1.1.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Ke stanovení stafylokokových enterotoxinů se nejčastěji používá metoda sandwich ELISA (viz kapitola 9.3.1.) využívající vazby antigenu a protilátky značené enzymem, který štěpením substrátu vyvolá barevnou změnu v jamkách mikrotitračních destiček. Komerčně dostupný 3M™ Tecra™ Staph Enterotoxins VIA set (výrobce TECRA) detekuje toxiny SEA – SEE jako sumu. Specifická identifikace jednotlivých enterotoxinů A, B, C, D a E je možná podobnou soupravou s názvem 3M™ Tecra™ Staph Enterotoxins Identification Test. Výhodou TECRA setu oproti ostatním je použití antisér zaměřených proti všem pěti základním enterotoxinům SEA – SEE. ELISA testy detekují 0,1 – 1,0 ng enterotoxinu na 1 g (ml) potravin, čas potřebný pro provedení a vyhodnocení metody jsou 3 – 4 hodiny.

12.1.1.3. Imunofluorescenční metoda ELFA

Metoda ELFA (Enzyme Linked Immunofluorescent Assay) je automatizovaná metoda prováděná na přístroji MiniVIDAS® (výrobce bioMérieux). Pro detekci klasických SEs (SEA – SEE) v potravinách se používá testovací souprava VIDAS SET 2. Metoda ELFA (viz



Obrázek 41: Přístroj miniVIDAS®.

kapitola 9.3.2.) pracuje na podobném principu jako sendvičová ELISA, rozdíl je ve způsobu vyhodnocení. Enzym použitý ke značení detekčních protilátek katalyzuje konverzi fluorogenního substrátu za vzniku fluorescence, která je měřena přístrojem. Nevýhodou této metody je skutečnost, že SEs přítomné ve vzorku jsou detekovány jako suma a přístroj určí pouze jejich přítomnost či nepřítomnost. Z výsledků nelze vyvodit, který typ stafylokokového enterotoxinu je ve vzorku přítomen. Detekční limit je od $0,5 \text{ ng.g}^{-1} (\text{ml}^{-1})$ (pro SEA a SEB) do $1,0 \text{ ng.g}^{-1} (\text{ml}^{-1})$ (pro SEC, SED a SEE). Velkou výhodou je rychlost stanovení (asi 2 h) a jednoduchá příprava vzorků.

12.1.2. Nepřímé metody

Nejčastěji používaná metoda **polymerázové řetězové reakce (PCR)** se používá pro stanovení genů zodpovědných za tvorbu toxinů (např. *sea*, *seb*, *sec*), tedy pro potvrzení toxigenity kmenů *S. aureus*. V současné době jsou známy primery pro jednotlivé typy enterotoxinů. Dále lze využít **polymerázové řetězové reakce sledované v reálném čase (real-time PCR)** – založené na principu klasické PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu.

12.2. Stanovení toxinů *Bacillus cereus*

Konzumace potravin kontaminovaných bakteriemi *B. cereus* může vyústit ve 2 různé formy alimentárního onemocnění – emetický a diarhogenní syndrom. Termostabilní **emetický toxin (cereulid)** je tvořen během stacionární fáze růstu bakterií v potravíně a jeho syntéza může být vázána na sporulaci. Toxická dávka je přibližně 30 µg na kg živé váhy. Rizikovými potravinami jsou těstoviny a rýže, dále maso (hovězí, vepřové), mléčné pudinky a kojenecká výživa.

B. cereus může produkovat tři základní **diarhogenní enterotoxiny** – hemolysin BL (HBL toxin), nehemolytický enterotoxin (NHE) a cytotoxin K, nově byly izolovány i enterotoxin T (BceT) a enterotoxin FM. HBL toxin se skládá se ze tří komponent: vazebného proteinu B a lytických komponent L_1 a L_2 . Proteinový komplex nehemolytických enterotoxinů (NHE) se skládá také ze tří komponent: NheA, NheB, NheC. Termolabilní diarhogenní enterotoxiny jsou zpravidla produkovány během pozdní exponenciální a na začátku stacionární fáze růstu při množení bakterií ve střevě, tedy až po kolonizaci bakterií v tenkém střevě. Enterotoxiny produkované v potravíně jsou obvykle inaktivovány nízkým pH a účinkem proteolytických enzymů v žaludku. Rizikové potraviny jsou pokrmy z masa, masné výrobky, ryby, omáčky, zelenina (např. kukuřice), vařené brambory a mléčné výrobky.

12.2.1. Přímé metody

Mezi nejpoužívanější přímé metody detekce diarhogenních enterotoxinů *B. cereus* patří imunologické testy – RPLA a ELISA. Test na principu **reverzní pasivní latexové aglutinace** je identický s testem na průkaz stafylokokových enterotoxinů, a to včetně délky inkubace mikrotitračních destiček (18 – 24 hodin) a hodnocení výsledků. Citlivost metody se pohybuje kolem 1 – 2 ng.g⁻¹ (ml⁻¹) vzorku. Komerčně dostupný test pod názvem BCET-RPLA (výrobce Oxoid Ltd) detekuje L_2 komponentu proteinového komplexu hemolysinu BL (HBL toxinu).

Komerčně dostupný Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (BDE-VIATM, výrobce TECRA) funguje na principu **sendvičové ELISA metody**. Je určen pro detekci průjmového enterotoxinu, konkrétně A komponenty (NheA) proteinového komplexu nehemolytických enterotoxinů (NHE) v potravinách, příbuzných vzorcích a pomnožovacích kulturách. Metoda detekuje toxin přítomný v koncentracích až 1 ng na 1 ml extraktu vzorku. Výsledky testu prováděného v mikrotitračních destičkách lze obdržet během 4 hodin.

K detekci průjmových toxinů lze dále použít metodu **HPLC-MS** kombinující vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s detekcí hmotnostní spektrometrií (MS). K detekci emetického toxinu se také používá **HPLC-MS** a dále např. **tkáňové kultury** (HEp-2 cell assay), **biologický pokus** (myši) či vizuálním hodnocení **motility kančího spermatu**.

12.2.2. Nepřímé metody

Ke stanovení genů zodpovědných za tvorbu toxinů *B. cereus* se běžně používá metoda PCR. Emetický toxin cereulid je kódován *ces* geny a jeho nepřímý průkaz bývá založen na detekci genu cereulid syntetázy (*cesB*). Nehemolytické enterotoxiny (NHE) jsou kódovány geny *nheA*, *nheB* a *nheC*. U hemolysinu BL (HBL) jsou to geny *hblA* (pro komponentu B), *hblC* (pro komponentu L_2) a *hblD* (pro komponentu L_1). Dále lze metodou PCR detekovat gen *cytK* zodpovědný za tvorbu cytotoxinu K nebo gen *bceT* kódující enterotoxin T.

12.3. Stanovení toxinů *Clostridium botulinum*

Patogenní působení *C. botulinum* vyvolávají toxiny, které se uvolňují z bakteriální buňky po její lýze. Celkově bylo popsáno 7 hlavních botulotoxinů a řada subtypů. Humánní botulismus vyvolávají především typy A, B a E. Botulotoxin patří mezi nejsilnější známé jedy. LD₅₀ se pro člověka pohybuje okolo 5 – 50 ng/kg živé hmotnosti. Rizikovými potravinami jsou domácí masozeleninové konzervy, nedostatečně tepelně opracované maso, syrové solené ryby nebo ryby uzené studeným kouřem.

Přítomnost botulotoxinů v potravinách lze zjistit **biologickým pokusem** na myších, k určení typu toxinu se používají diagnostická séra. Průkaz botulotoxinu je založen na zjištění onemocnění a úhynu bílých myší za klinických příznaků botulismu. Komerčně dostupný je **ELISA test** pro detekci neurotoxinu B.

Z nepřímých metod detekce mikroorganismu i jeho toxinu lze uvést **polymerázovou řetězovou reakci** (nevýhodou je detekce i mrtvých buněk a dále skutečnost, že u přítomných genů nemusí dojít k jejich expresi), **ribotypizaci** nebo **pulzní gelovou elektroforézu**.

12.4. Stanovení Shigatoxinů *Escherichia coli*

Enterohemoragické (EHEC) nebo též shiga-like toxigenní (STEC) či verotoxigenní (VTEC) kmeny *E. coli* produkují dva typy toxinů – Stx1 a Stx2, které mají několik variant. Pro jejich cytotoxický účinek na buněčné kultury Vero buněk jsou tyto toxiny nazývány také jako Shigatoxiny (ST1 a ST2). Toxin Stx1 je velmi podobný Stx toxinu produkovanému *Shigella dysenteriae* typ 1. Infekční dávka je velmi nízká (50 – 100 bakterií). Onemocnění probíhá formou hemoragické kolitidy (HC), hemolyticko-uremického syndromu (HUS) s těžkým poškozením ledvin nebo jako trombotická trombocytopenická purpura (TTP). Primárním zdrojem STEC jsou přežvýkavci, zejména skot.

Pro detekci Shigatoxinů ST1 a ST2 a posouzení toxigenity izolovaných kmenů *E. coli* je možné použít komerčně dostupný test založený na principu **reverzní pasivní latexové aglutinace** VTEC-RPLA (výrobce Oxoid Ltd.). Postup analýzy je shodný jako v případě průkazů SEs nebo toxinů *B. cereus*. Hodnocení vzniklé aglutinace na dně mikrotitračních destiček se provádí po 24 hodinách.

Dalším rutinním testem pro detekci Shigatoxinů ST1 a ST2 je **imunochromatografický test** (viz kapitola 9.2.). Komerční soupravy dodává na trh např. firma Merck KGaA (Duopath® Verotoxin Rapid Test). Vyhodnocení testu je možné po 15 – 20 minutách.

K průkazu genů kódujících tvorbu ST1 a ST2 lze použít **molekulárně biologické metody**, např. PCR.

12.5. Stanovení toxinů *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus je enteropatogenní bakterie způsobující gastroenteritidy. Za potencionálně infekční dávku je považováno množství vyšší než 10⁵ KTJ.g⁻¹. Produkuje toxiny – čtyři druhy hemolysinů, z nichž nejvýznamnější jsou termostabilní hemolysin (TDH) a termolabilní TDH-related hemolysin (TRH). *V. parahaemolyticus* se vyskytuje především v syrových rybách (sushi) a mořských plodech jako jsou ústřice a další koryšci.

K potvrzení patogenity kmenů se provádí ve specializovaných laboratořích průkaz možné produkce termostabilního hemolysinu (TDH) nebo průkaz přítomnosti genů TRH hemolysinu **polymerázovou řetězovou reakcí**.

13. PŘÍLOHY

13.1. Morfologie mikroorganismů

13.1.1. Barvení podle Grama

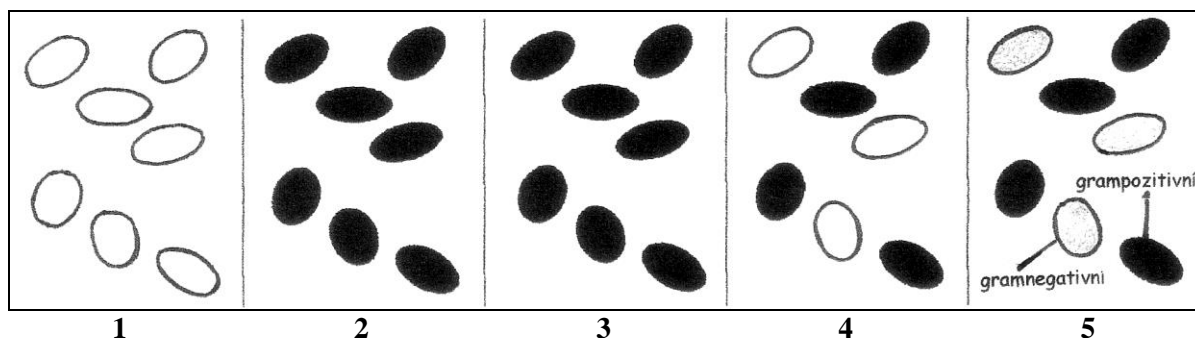
13.1.1.1. Princip metody

Barvení podle Grama je založeno na odlišné stavbě stěny buněk grampozitivních a gramnegativních bakterií, kdy grampozitivní bakterie po obarvení krystalovou violetí a moření Lugolovým roztokem zadržují tento barevný komplex v buněčné stěně. Následné použití organických rozpouštědel (např. ethanol, aceton) komplex nerozpouští, bakterie zůstávají modrofialové. U gramnegativních bakterií je barevný komplex organickými rozpouštědly ze stěny buňky vymýván a po dobarvení kontrastním barvivem (safranin nebo karbolfuchsin) jsou bakterie červené.

13.1.1.2. Pracovní postup

K přípravě preparátu používáme mladé kultury mikroorganismů (24 hodin), starší kultury se již špatně barví. Připravený a řádně fixovaný preparát:

1. přelijeme roztokem *Gram I* (roztok krystalové violeti), doba působení je 20 – 30 s;
2. barvivo slijeme, ale neoplachujeme vodou;
3. přelijeme roztokem *Gram II* (Lugolův roztok), doba působení je 20 – 30 s, poté slijeme;
4. rychle opláchneme směsí aceton-ethanol (*Gram III*), oplachujeme dokud odtéká barvivo (max. 30 s) a následně opláchneme vodou;
5. preparát přes hranu sklička osušíme filtračním papírem a nanese roztok *Gram IV* (roztok safraninu nebo karbolfuchsinu), doba působení je 1 minuta;
6. preparát opatrně opláchneme vodou a osušíme filtračním papírem přes hranu sklička a necháme zaschnout.



Obrázek 42: Průběh barvení mikroorganismů podle Grama.

1. připravený a fixovaný preparát, bakterie jsou neobarvené
2. barvení krystalovou violetí (*Gram I*), všechny bakterie se obarví modrofialově
3. přelití Lugolovým roztokem (*Gram II*), všechny bakterie zůstávají modrofialové
4. odbarvení směsí aceton-ethanol (*Gram III*), gramnegativní bakterie se odbarví
5. barvení safraninem (*Gram IV*), gramnegativní bakterie se barví červeně, grampozitivní jsou modrofialové

13.1.1.3. Vyhodnocení

Preparát se prohlíží v mikroskopu za použití imerzního objektivu a imerzního oleje. Grampozitivní bakterie se barví modrofialově, gramnegativní bakterie se barví růžově či světle červeně, gramlabilní bakterie tvoří přechod mezi oběma typy.

13.2. Biologické vlastnosti mikroorganismů

13.2.1. Stanovení pohyblivosti mikroorganismů

13.2.1.1. Princip metody

Pohyblivé mikroorganismy jsou po zaočkování vpichem do sloupce polotuhého média ve zkumavce schopné prorůstat od místa vpichu do okolí a vytvářet zákal. Oproti tomu mikroorganismy nepohyblivé rostou pouze v místě vpichu.

13.2.1.2. Pracovní postup

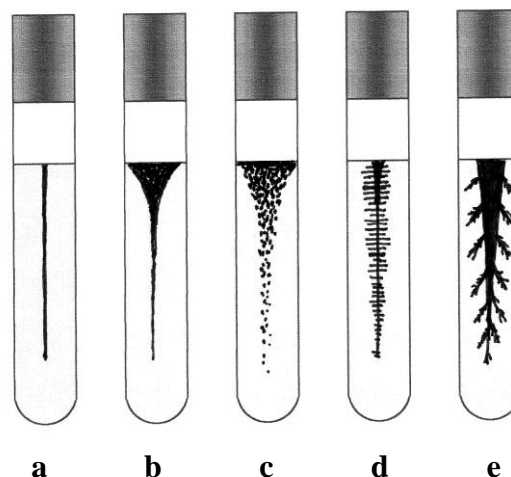
Polotuhé živné médium rozplníme do sterilních zkumavek přibližně do dvou třetin jejich výšky a necháme ztuhnout ve svislé poloze. Čistou bakteriální kulturu očkujeme vpichem sterilní očkovací jehlou do sloupce média, vpich by měl končit asi 0,5 cm nad dnem zkumavky. Naočkované zkumavky inkubujeme po dobu 24 hodin při teplotě optimální pro testovaný mikroorganismus – *Enterococcus faecalis* při teplotě 37 °C, *Listeria monocytogenes* při laboratorní teplotě, tj. max. 25 °C (při vyšší teplotě se pohyblivost u *L. monocytogenes* ztrácí).

13.2.1.3. Vyhodnocení

Po ukončení inkubace hodnotíme vznik a rozsah zákalu a charakter růstu testovaných mikroorganismů (růst bodový, kartáčovitý, kořínkovitý, atd.).

Legenda:

- a) nepohyblivý mikroorganismus
- b) deštníkovitý spojitý růst
- c) deštníkovitý bodový růst
- d) kartáčovitý růst
- e) kořínkovitý (rhizoidní) růst



Obrázek 43: Příklady růstu různě pohyblivých mikroorganismů.

13.3. Biochemické identifikační testy

13.3.1. Průkaz přítomnosti katalasy

13.3.1.1. Princip metody

Enzym katalasa rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Pozitivní reakce se projeví uvolňováním bublinek kyslíku po přidavku H_2O_2 ke kultuře testovaného mikroorganismu.

13.3.1.2. Pracovní postup

Na čisté podložní skličko kápneme čerstvě připravený 3% roztok peroxidu vodíku. Sterilní bakteriologickou kličkou odebereme z agarové půdy izolovanou kolonii testovaného kmene a suspendujeme ji v kapce peroxidu vodíku. K testování použijeme 24-hodinovou kulturu *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*.

13.3.1.3. Vyhodnocení

Sledujeme, zda dochází k uvolňování bublinek kyslíku.

13.3.2. Průkaz glykosidas

13.3.2.1. Princip metody

Pestrá řada cukrů slouží ke sledování schopnosti mikroorganismů využívat různé druhy cukrů. K průkazu se používají tekuté půdy obsahující vždy určitý cukr a indikátor pH (bromthymolová modř, fenolová červeně). Zkvašuje-li testovaná kultura daný cukr, dojde ke změně barvy média z původní zelené, resp. červené, na žlutou. Přidání plynovky umožňuje současně sledovat tvorbu plynu.

13.3.2.2. Pracovní postup

Připravené bujony rozplňujeme po 10 ml do zkumavek a před přidáním cukrů sterilizujeme v Kochově přístroji, cukry jsou sterilizovány filtrací. Do zkumavek s glukosovým, příp. laktosovým bujonem přidáme sterilní skleněnou plynovku. Sterilní bakteriologickou kličkou nabereme čistou kulturu testovaného mikroorganismu a zaočkujeme ji do zkumavek s cukernými bujony. K očkování lze použít i suspenzi testovaného mikroorganismu ve sterilním fyziologickém roztoku. K testu použijeme 24-hodinovou kulturu *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. Naočkované zkumavky inkubujeme 24 – 48 hodin při 37 °C.

13.3.2.3. Vyhodnocení

Hodnocení provádíme po 24, resp. 48 hodinách inkubace. Sledujeme změnu barvy média (zežloutnutí), zákal, blanku či sediment svědčící o růstu mikroorganismů a přítomnost bublinek plynu v plynovce.

Tabulka 6: Vyhodnocení testu na průkaz glykosidas.

Test	Výsledná barevná reakce	
	pozitivní	negativní
Glukosa	žlutá, bublina plynu v plynovce	červená, bez tvorby plynu
Laktosa	žlutá, bublina plynu v plynovce	červená, bez tvorby plynu

13.3.3. Růst na TSI agaru

13.3.3.1. Princip metody

TSI agar (Triple Sugar Iron agar, Hajnův agar) obsahuje tři základní cukry – glukosu, laktosu a sacharosu, a železité soli. Cukry jsou na základě své molekulové hmotnosti rozděleny v připraveném šikmém agaru následovně – dole sacharosa, uprostřed glukosa a horním klínu laktosa. Enzymatickou činností mikroorganismů dochází ke změně původně červené barvy média na žlutou, a to v různém rozsahu dle spektra využívaných cukrů. Současně lze sledovat produkci plynu a tvorbu sirovodíku.

13.3.3.2. Pracovní postup

TSI agar připravíme jako šikmý agar do zkumavek. Očkování testované čisté bakteriální kultury provádíme sterilní bakteriologickou kličkou na povrch agaru a vpichem do agarového sloupce. K testování použijeme 24-hodinovou kulturu *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. Naočkované zkumavky inkubujeme při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

13.3.3.3. Vyhodnocení

Po ukončení inkubace hodnotíme změnu barvy kultivační půdy, tvorbu plynu (potrhání agaru) a tvorbu sirovodíku (černání kolem vpichu). Zkvašuje-li mikroorganismus pouze glukosu, zežloutne jen sloupec a šikmá plocha zůstane červená (např. salmonely). Pokud testovaný mikroorganismus zkvašuje současně s glukosou i laktosu či sacharosu, příp. všechny tři cukry, zežloutne sloupec i šikmá plocha (např. *E. coli*).

13.3.4. Průkaz přítomnosti cytochromoxidasy (OXI test)

13.3.4.1. Princip metody

Enzym cytochromoxidasa je detekován barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indolfenolové modři.

13.3.4.2. Pracovní postup

Sterilní bakteriologickou kličkou (platinovou nebo plastovou) odebereme z agarové půdy dobře izolovanou kolonii testovaného kmene a vetřeme ji do impregnované zóny testovacího proužku. V případě čisté kultury můžeme zónu proužku otisknout přímo na bakteriální kulturu na misce. K testování použijeme 24-hodinovou kulturu *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*.

13.3.4.3. Vyhodnocení

Barevnou reakci odečítáme do 1 minuty, později může dojít k falešně pozitivnímu výsledku.

Tabulka 7: Vyhodnocení OXI testu.

Test	Označení testu	Výsledná barevná reakce	
		pozitivní	negativní
Cytochromoxidasa	OXI	modrá, světle modrá	bezbarvá, růžová, žlutá, žlutozelená

(zdroj: návod k provedení OXI testu, Erba Lachema, ČR)

13.3.5. Průkaz přítomnosti β -galaktosidasy (ONPG test)

13.3.5.1. Princip metody

Enzym β -galaktosidasa hydrolyzuje substrát *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG), reakce je detekována žlutým zbarvením uvolněného *o*-nitrofenolu.

13.3.5.2. Pracovní postup

Čistou kulturu testovaného kmene homogenizujeme v 0,6 ml sterilního fyziologického roztoku ve zkumavce tak, aby vzniklý zákal odpovídal 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Do připravené suspenze vložíme diagnostický proužek, papírová zóna proužku musí být zcela ponořena. Zkumavku inkubujeme v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin (enterobakterie), pro gramnegativní nefermentující bakterie se doporučuje teplota 30 °C po dobu 48 hodin. K testování použijeme 24-hodinovou kulturu *E. coli* a *Salmonella* spp.

13.3.5.3. Vyhodnocení

Po uplynutí inkubační doby hodnotíme výsledné zbarvení ve zkumavce.

Tabulka 8: Vyhodnocení ONPG testu.

Test	Označení testu	Výsledná barevná reakce	
		pozitivní	negativní
β -galaktosidasa	ONPG	žlutá, nažloutlá	bezbarvá, slabý bílý zákal suspenze

(zdroj: návod k provedení ONPG testu, Erba Lachema, ČR)

13.3.6. Průkaz tvorby indolu a přítomnosti β -D-glukuronidasy (COLI test)

13.3.6.1. Princip metody

COLI test slouží k průkazu enzymu β -D-glukuronidasy a tvorby indolu z aminokyseliny tryptofanu, tedy k rychlé identifikaci izolátů *Escherichia coli*. Enzym β -D-glukuronidasa štěpí 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid, vzniklý 4-methylumbelliferon vykazuje pod UV modrou fluorescenci.

Tvorba indolu je závislá na zvýšeném obsahu tryptofanu v médiu a vyžaduje nepřítomnost glukosy. Přítomnost indolu se indikuje přidávkem Kovácsova činidla (*p*-dimethylaminobenzaldehydu). V pozitivním případě vzniká sytě růžový až červený reakční produkt, negativní reakce je charakterizována světle žlutohnědým zbarvením.

13.3.6.2. Pracovní postup

Čistou kulturu testovaného kmene homogenizujeme v 1 ml sterilního fyziologického roztoku ve zkumavce tak, aby vzniklý zákal odpovídal 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Zkumavku inkubujeme v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin. K testování použijeme 24-hodinovou kulturu *Escherichia coli* a *Salmonella* spp.

13.3.6.3. Vyhodnocení

Po uplynutí inkubační doby nejprve pozorujeme na transiluminátoru při UV 360 nm tvorbu modré fluorescence. Poté přikápneme do zkumavky 4 – 5 kapek Kovácsova činidla a hodnotíme výsledné zbarvení ve zkumavce (prstenec na povrchu).

Tabulka 9: Vyhodnocení COLI testu.

Test	Označení testu	Výsledná barevná reakce	
		pozitivní	negativní
β -glukuronidasa	GLR	modrá fluorescence	bez fluorescence
Indol	IND	růžová až červená	žlutá, žlutohnědá

(zdroj: návod k provedení COLI testu, Erba Lachema, ČR)

13.3.7. Průkaz přítomnosti vázané koagulasy

13.3.7.1. Princip metody

Vázaná koagulasa (angl. *clumping factor*) je povrchový protein schopný vázat fibrinogen a měnit jej na fibrin, čímž dochází k typickému shlukování buněk stafylokoků. Její přítomnost je typická především pro druh *Staphylococcus aureus*. Princip stanovení spočívá v reakci s fibrinogenem králičí plazmy, která se projeví shlukováním buněk (aglutinace). Vizualně dochází k vyjasnění původně mléčné suspenze a k tvorbě viditelných shluků.

13.3.7.2. Pracovní postup

Na čisté podložní sklo nanese několik kapek sterilního fyziologického roztoku. Sterilní bakteriologickou kličkou nabereme testovanou kulturu a rozetřeme ji ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla mléčně zakalená suspenze. K suspenzi přidáme kapku králičí plazmy a kličkou směs dobře promícháme. Současně provedeme negativní kontrolu, kdy místo králičí plazmy smícháme bakteriální suspenzi s fyziologickým roztokem. K testování použijeme 24-hodinovou kulturu *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*.

13.3.7.3. Vyhodnocení

Proti černému pozadí pozorujeme, zda do 2 minut dochází k projasnění suspenze a ke vzniku viditelných shluků.

13.4. Imunologické metody

13.4.1. Rychlá sklíčková aglutinace – konfirmace *Salmonella* spp.

13.4.1.1. Princip metody

Princip metody spočívá ve vzájemné reakci bakterií (korpuskulárního antigenu) s příslušnou specifickou protilátkou (antisérem), která se projeví shlukováním – aglutinací buněk. Vizualně dochází k vyjasnění původně mléčné suspenze a k tvorbě viditelných vloček (aglutinátů).

13.4.1.2. Pracovní postup

Na čisté podložní sklo nanese několik kapek sterilního fyziologického roztoku. Sterilní bakteriologickou kličkou nabereme testovanou kulturu a rozetřeme ji ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla mléčně zakalená suspenze. K suspenzi přidáme kapku polyvalentního O-antiséra a kličkou směs dobře promícháme.

13.4.1.3. Vyhodnocení

Proti černému pozadí pozorujeme, zda dochází k projasnění suspenze a ke vzniku vloček. Pro zviditelnění reakce podložním sklíčkem opatrně pohybujeme. Reakce se odečítá do 2 minut.

13.4.2. Latexová aglutinace – Wellcolex® Colour *Salmonella* test

13.4.2.1. Princip metody

Rychlý test umožňující detekci a presumptivní séro skupinovou identifikaci salmonel.

13.4.2.2. Pracovní postup

Do suspenzační zkumavky odměříme 200 µl sterilního fyziologického roztoku (přiloženým kapátkem). Sterilní bakteriologickou kličkou přeneseme 1 – 2 testované kolonie do zkumavky a opatrně je rozmícháme. Lahvičky s latex reagenty 1 a 2 důkladně promícháme, na reagenční kartičku kápneme do označeného prostoru 1 kapku daného latex reagentu. Kapátkem přikápneme do obou označených prostorů vždy 1 kapku připravené bakteriální suspenze (pozor na bublinky!), kličkou suspenzi a latex reagent dobře rozmícháme. Kartičku umístíme na třepačku a necháme promíchávat při nízkých otáčkách (150 rpm) po dobu 2 minut.

13.4.2.3. Vyhodnocení

Hodnotíme vznik barevné aglutinace a změnu barvy pozadí v obou testovacích polích.

Tabulka 10: Vyhodnocení Wellcolex® Colour *Salmonella* testu.

Reakce	Pozadí	Latex 1	Latex 2
		séro skupina	
zelená nebo olivová aglutinace s jedním latexem	fialová/růžová	D	A
modrá aglutinace s jedním latexem	oranžová/růžová	C	E nebo G
červená aglutinace s jedním latexem	modrá/tyrkysová	B	Vi
nepřavidelné tmavě červené/hnědé skvrnky v obou reakčních polích	světle šedá/ hnědá	negativní	
bez aglutinace	světle šedá/ hnědá	negativní	
jemně zrnitá tmavě červená/hnědá aglutinace obvykle rovnoměrně v obou reakčních polích	bezbarvá nebo světle šedá/hnědá	nespecifické	
tyrkysová aglutinace s jedním latexem	růžová	C a D	A a E
oranžová aglutinace s jedním latexem	modrá	B a D	A a Vi
fialová aglutinace s jedním latexem	zelená	B a C	E nebo G a Vi

(zdroj: návod k provedení testu Wellcolex® Colour *Salmonella*, Oxoid, UK)

Pozn.: *Salmonella* Enteritidis – skupina D, *Salmonella* Typhimurium – skupina B, *Salmonella* Typhi – skupina D

13.4.3. Imunomagnetická separace

13.4.3.1. Princip metody

Imunomagnetická separace (IMS) je založena na principu vazby bakteriálních nebo jiných buněk na magnetické částice s imobilizovanými specifickými protilátkami. Vzniklý komplex je možné separovat ze suspenzí pomocí vnějšího magnetického pole. Tato specifická separační technika umožňuje významné selektivní zakoncentrování cílových buněk. Standardně se tato technika používá při průkazu *Escherichia coli* O157 v potravinách.

13.4.3.2. Pracovní postup

1. Potřebné množství mikrozkušavek Eppendorf vložíme do magnetického separátoru Dynal MPC-M z něhož vyjmeme magnetický pás. Zkušavky označíme na víčko.
2. Resuspendujeme Dynabeads magnetické částice anti-*E.coli* O157 a napipetujeme do každé zkušavky po 20 µl suspenze.
3. Do každé zkušavky pipetujeme postupně novou špičkou pomnožené vzorky (v TSB bujonu) v množství 1 ml, zkušavky uzavřeme.
4. Obsah zkušavek promícháme (jemným vortexováním nebo převrácením), zkušavky vložíme do nástavce vortexu (nebo do separátoru bez magnetického pásu) a za stálého pomalého míchání inkubujeme při laboratorní teplotě po dobu 10 minut.
5. Po ukončení inkubace umístíme zkušavky do separátoru a vložíme do něj magnetický pás. Imunomagnetické částice separujeme mírným otáčením stojánku po dobu 3 minut (vizuální kontrola separovaného komplexu – rezavá vrstva na vnitřní ploše zkušavky u magnetu).
6. Zkušavky otevřeme a opatrně odstraníme supernatant ze zkušavky, popř. i z víčka (na každý vzorek nová pipeta). Pozor na magnetické částice na stěně zkušavky!
7. Ze separátoru vyjmeme magnetický pás a do každé zkušavky přidáme 1 ml promývacího fosfátového pufru s Tweenem. Zkušavky uzavřeme a separátor se zkušavkami několikrát převrátíme.
8. Do separátoru vložíme magnetický pás a separujeme imunomagnetické částice po dobu 3 minut. Promývání suspenze opakujeme ještě 2x.
9. Po odstranění posledního promývacího roztoku vyjmeme ze separátoru magnetický pás a do každé zkušavky přidáme 50 µl promývacího pufru. Zkušavky uzavřeme a obsah promícháme jemným vortexováním.
10. Kličkou vyočujeme obsah každé mikrozkušavky na povrch selektivně diagnostického média (např. Sorbitol MacConkey agar s BCIG pro *E. coli* O157) a sterilními kličkami rozočkujeme po celém povrchu půdy. Misky inkubujeme aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

13.4.3.3. Vyhodnocení

Po 24 hodinách jsou charakteristické kolonie *E. coli* O157 na Sorbitol MacConkey agaru s BCIG bezbarvé o velikosti asi 1 mm.



Obrázek 44: Imunomagnetický separátor Dynal MPC™ – stojánek a pás s magnety.

POUŽITÁ LITERATURA

- ALBERTS, B., BRAY, D.; JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (eds.) *Základy buněčné biologie (Úvod do molekulární biologie)*. 1. vyd. Ústí nad Labem, CZ: Espero Publishing, s.r.o. 2005. 630 s.
- CARBONNELLE, E., MESQUITA, C., BILLE, E., Day, N., DAUPHIN, B., BERETTI, J., FERRONI, A., GUTMANN, L., NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 2011, vol. 44, no. 1, p. 104-109.
- DEMNEROVÁ, K. Microbiological Food Safety: Current Strategy of Efficient Control. *Chemické listy*, 2012, vol. 106, no. 10, p. 920-925.
- ENGELKIRK, P.G., DUBEN-ENGELKIRK, J. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2008. 754 p.
- GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava, SR: MALÉ CENTRUM. 2004. 528 s.
- HAVLOVÁ, J., JIČÍNSKÁ, E., HRABOVÁ, H. *Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. 1. vyd. Praha, ČR: ÚZPI. 1993. 243 s.
- JEBBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A. *Bacillus cereus* Enterotoxin Act as Major Virulence Factors and Exhibit Distinct Cytotoxicity to Different Human Cell Lines. *Toxicon*, 2014, vol. 77, p. 49-57.
- KUMAR, S. *Textbook of Microbiology*. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd. 2012. 784 p.
- MCMEEKIN, T.A. (ed.) *Detecting pathogens in food*. 1st ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited. 2003. 384 p.
- MEHROTRA, R.S., SUMBALI, G. *Principles of Microbiology*. 1st ed. New Delhi, India: Tata McGraw-Hill Education. 2009. 924 p.
- RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., VERMEULEN, A., ANDJELKOVIC, M., FITZ-JAMEZ, I., VELD P. in ,t, DENON, Q., VERHE, R., DEBEVERE, J. Heat Resistant of *Bacillus cereus* Emetic Toxin, Cereulid. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, vol. 46, p. 536-541.
- RAY, B., BHUNIA, A. *Fundamental Food Microbiology*. 5th ed. Boca Raton, USA: CRC Press. 2013. 663 p.
- ROSINA, J., VRÁNOVÁ, J., KOLÁŘOVÁ, H., STANEK J. *Biofyzika. Pro zdravotnické a biomedicínské obory*. 1. vyd. Praha, ČR: Grada Publishing a. s. 2013. 224 s.
- SCHWALBE R., STEELE-MOORE, L., GOODWIN, A.C. (eds.) *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. 1th ed. Boca Raton, USA: CRC Press. 2007. 432 p.
- SOBEL, J. Botulism. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, vol. 41, no. 8, p. 1167-1173.
- ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Imunomagnetická detekce patogenních mikroorganismů v sýrech. *Mlékařské listy*, 2012, roč. 23, č. 113, s. 3-6.
- ŠEDO, O., SEDLÁČEK, I., ZDRÁHAL, Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011, vol. 30, no. 3, p. 417-434.
- ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno, CZ: Vydavatelství Masarykova Univerzita. 2005. 188 s.
- URBÁŠKOVÁ, P. *Rezistence bakterií k antibiotikům – vybrané metody*. 1. vyd. Praha: Trios, spol. s r.o. 1999. s. 1.1-10.2.8.
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 1. vyd. Brno, ČR: Neptun. 2001. 247 s.
- VOTAVA, M., RŮŽIČKA, F., WOZNICOVÁ, V., ČERNOHORSKÁ, L., DVOŘÁČKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. 1. vyd. Brno, ČR: Neptun. 2010. 495 s.

VYTRÁSOVÁ, J., BÍLKOVÁ, Z. *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. 1. vyd. Pardubice, ČR: Univerzita Pardubice. 1998. 140 s.

WICTOME, M., NEWTON, K., JAMESON, K., HALLIS, B., DUNNIGAN, P., MACKAY, E., CLARKE, S., TAYLOR, R., GAZE, J., FOSTER, K., SHONE, C. Development of an In Vitro Bioassay for *Clostridium botulinum* Type B Neurotoxin in Foods That Is More Sensitive than the Mouse Bioassay. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no. 9, p. 3787-3792.

YENI, F., ACAR, S., POLAT, Ö.G., SOYER, Y., ALPAS, H. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control*, 2014, vol. 40, p. 359-367.

ZAHRADNICKÝ, J. a kolektiv. *Mikrobiológia a epidemiológia I*. 1. vyd. Martin, SR: Osveta, š.p. 1991. 609 s.

Autoři:	MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D. Mgr. Marta Dušková, Ph.D. MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.
Název:	Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	73
Vydání:	2.
Povoleno:	Rektorátem VFU Brno
Podpořeno:	Projektem OP VK reg. č. CZ.1.07/2.2.00/28.0287
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-683-4