

Obsah

1. Bezpečnost práce v mikrobiologické laboratoři	7
2. Pracovní pomůcky a přístroje potřebné k rutinní práci v mikrobiologické laboratoři	11
3. Zásady práce při mikroskopování světelným mikroskopem	29
4. Příprava inokula a zásady aseptické práce	31
5. Charakteristika a příprava kultivačních médií	32
5.1 Složení kultivačních médií	32
5.1.1 Makro a mikro prvky obsažené v kultivačních médiích.....	32
5.1.2 Aditiva a přídatné látky	32
5.1.3 Ztužovací prostředky	33
5.1.4 Aditivní látky.....	33
5.2 Rozdělení kultivačních půd.....	33
5.2.1 Dělení kultivačních půd podle konzistence:	33
5.2.2 Dělení kultivačních půd podle původu a složení:	34
5.2.3 Dělení kultivačních půd podle použití:	34
5.3 Charakteristika a použití vybraných kultivačních půd	35
5.4 Uskladnění a příprava kultivačních půd	41
6. Metody a způsoby inokulace kultivačních médií	44
6.1 Inokulace tekutých kultivačních médií	44
6.1.1 Inokulace laboratorní pipetou a Pasteurovou pipetou	44
6.1.2 Inokulace tekutých kultivačních médií pomocí inokulační bakteriologické kličky	44
6.2 Inokulace pevných kultivačních médií.....	44
6.2.1 Zalití inokula do kultivačního média.....	45
6.2.2 Jednoduchý roztěr	45
6.2.3 Inokulace šikmého agaru.....	45
6.2.4 Inokulace 96 jamkové mikrotitrační destičky	45
6.2.5 Inokulace kultivačního média pomocí křížového roztěru	46
7. Kultivace mikroorganismů	49
7.1 Aerobní kultivace.....	49
7.2 Kultivace v kapnofilním prostředí.....	49
7.3 Kultivace v anaerobním prostředí	49

8. Barvicí techniky v klinické mikrobiologii	52
8.1 Rozdělení a charakterizace nejčastější používaných barev	52
8.2 Nejpoužívanější barvicí metody	53
8.2.1 Barvení podle Grama	53
8.2.1.1 Jiné testy na určení gram pozitivita nebo gram negativita bakterií	54
8.2.2 Barvení podle Ziehla-Neelsena	55
8.2.3 Burriho metoda pomocí tuše	56
8.2.4 Barvení podle Schaeffera-Fultona	56
8.2.5 Barvení podle Wirtze-Conklina	57
8.2.6 Barvení podle Alberta	58
8.2.7 Barvení bakteriálních bičíků	58
8.2.8 Giemsovo barvení	60
9. Stanovení biochemické aktivity mikroorganismů	62
9.1 Stanovení fermentačních procesů	62
9.1.1 Stanovení ve MRVP bujonu	62
9.1.2 Identifikace na citrátovém agaru	63
9.2 Stanovení hydrolytických procesů	63
9.2.1 Hydrolyza želatiny	63
9.2.2 Produkce ureázy	64
9.2.3 Dekarboxylace lyzinu a ornitinu	65
9.2.4 Test na redukci nitrátů	65
9.2.5 Plazmakoagulázový test	66
9.3 Jiné diagnostické testy	66
9.3.1 Produkce sirovodíku	66
9.3.2 Tvorba indolu	67
9.3.3 Testování na TSI agaru	68
9.3.4 Test na přítomnost beta-galaktosidázy	68
9.3.5 Katalázový test	69
9.3.6 Oxidázový test	69
9.4 Komerčně vyráběné testovací soupravy	70
9.4.1 ENTEROtest 16 a ENTEROtest 24	70
9.4.2 STAPHYtest 16 a STAPHYtest 24	72
9.4.3 ANAEROtest 23	72
9.4.4 NEFERMest 24	73
9.4.5 API test	73
9.4.6 EN-COCCUStest	74

10. Hodnocení kultivačního nálezu	75
10.1 Hodnocení kultivačního nálezu v tekutém médiu.....	75
10.1.1 Hodnocení pohyblivosti v polotuhém kultivačním médiu.....	76
10.2 Hodnocení kultivačního nálezu na pevných médiích	76
10.2.1 Hodnocení kultivačního nálezu na krevním agaru	76
10.2.1.1 Diagnostika hemolytické aktivity mikroorganismů	76
10.2.1.2 Hodnocení forem růstu na pevném agaru	78
10.2.1.3 Hodnocení velikosti kolonií	79
10.2.1.4 Hodnocení povrchu kolonií	79
10.2.1.5 Hodnocení tvaru a okraji kolonií	79
10.2.1.6 Hodnocení zabarvení kolonií	80
10.2.1.7 Hodnocení zápachu	80
10.3 Hodnocení kultivačního nálezu na vybraných kultivačních půdách.....	81
10.3.1 Endo agar.....	81
10.3.2 XLD agar.....	81
10.3.3 Čokoládový agar	82
10.3.4 Krevní agar.....	83
10.3.5 PALCAM agar	83
10.3.6 MacConkey agar	84
10.3.7 Chromogenní média	84
10.3.8 Tinsdalovo médium	85
10.3.9 Löwensteinovo- Jensenovo médium	85
11. Tkáňové kultury	87
11.1 Rozdělení tkáňových kultur	88
11.1.1 Primární kultury.....	88
11.1.2 Buněčné kmeny	88
11.1.3 Buněčné kultury	88
11.2 Zásady práce s tkáňovými kulturami.....	89
11.3 Kultivační podmínky	90
11.3.1 Kultivační média	90
11.3.2 pH kultivačních médií	92
11.3.3 Prostředí kultivace.....	92
11.3.4 Teplota kultivace	92
11.3.5 Použití antibiotik.....	92
11.3.6 Typy růstu buněk.....	93
11.4 Skladování tkáňových linií a kultur	94

12. Princip a využití serologických metod v mikrobiologii.....	95
12.1 Precipitační reakce	95
12.2 Aglutinační reakce	96
12.3 Komplement fixační test	97
12.4 Neutralizační reakce (HIT – hemaglutinačně inhibiční test, průkaz streptolysin).....	98
12.5 Enzymová imunoanalýza (ELISA)	99
12.6 Western blot.....	100
12.7 Imunochromatografická metoda	101
12. 8 Imunofluorescence	102
12.9 Reverzně pasivní latexová aglutinace.....	102
12.10 Citlivost a specificita serologických testů.....	104
13. Principy a využití molekulárně biologických metod v lékařské mikrobiologii	105
13.1 PCR (polymerázová řetězová reakce).....	105
13.1.1 Izolace genetického materiálu	105
13.1.2 Izolace genetického materiálu z virových původců infekčních onemocnění	105
13.1.3 Izolace genetického materiálu z bakteriálních původců onemocnění	106
13.2 Amplifikace	106
13.3 Detekce produktů při PCR	106
13.4 Modifikace PCR.....	107
13.4.1 Multiplex PCR	107
13.4.2 Nested PCR	107
13.4.3 Real time PCR - RT PCR	108
13.4.4 Hot start PCR	109
13.4.5 Touchdown PCR.....	110
13.4.6 Assembly PCR	110
13.4.7 Colony PCR.....	110
13.4.8 Methylation specific PCR.....	110
13.4.9 LAMP assay	110
13.4.10 Reverzní PCR.....	110
13.4.11 <i>In situ</i> PCR.....	111
13.4.12 Repetitivní/interrepetitivní PCR	111
13.4.13 Digitální PCR (dPCR).....	111
13.4.14 NASBA PCR.....	113
13.5 Faktory ovlivňující výtěžnost modifikovaných PCR reakcí.....	113
13.6 Využití PCR v klinické praxi nebo ve výzkumné činnosti	114
13.7 Jiné molekulárně biologické metody používané v klinické mikrobiologii	114

13.7.1 FISH.....	114
13.7.2 MALDI - TOF.....	115
13.7.3 Mikročipy (Microarrays)	116
13.7.4 Single molecules (protein) assay (SIMOA).....	116
13.7.5 MIDI - Sherlock	116
13.7.6 Restrikční analýza DNA	116
14. Stanovení citlivosti na antimikrobiální látky	121
14.1 Difúzní testy.....	121
14.1.1 E-test.....	121
14.1.2 Diskový difúzní test.....	122
14.2 Diluční testy	123
14.2.1 Agarová diluční metoda.....	123
14.2.2 Diluční mikrometoda	124
15. Zásady odběru, zasílání a zpracování vzorků klinického materiálu	126
15.1 Odběrové nádoby a soupravy	126
15.2 Zásady odběru vzorků	130
15.3 Uskladnění vzorků	131
15.4 Transport vzorků	131
15.4.1 Zasílání vzorků kurýrem.....	132