

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko - technologická
Katedra biologických a biochemických věd

TESTOVÁNÍ KVALITY KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

Bc. Lucie Kurková

Diplomová práce
2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie KURKOVÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Testování kvality kultivačních médií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracování literární rešerše se zaměřením na postupy testování kvality kultivačních médií.
2. Vypracování postupu k ověřování kvality a selektivity kultivačních médií.
3. Testování různých druhů kultivačních médií.
4. Ověření doby použitelnosti kultivačních médií.
5. Vyhodnocení výsledků a srovnání s požadavky vztahujícími se k testovaným médiím.


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Bošíně dne 4.5. 2009

Lucie Kurková

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. Především Mgr. Markétě Vydržalové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za zájem, trpělivé vedení a za cenné rady.

Rovněž bych ráda poděkovala firmě LabMediaServis s.r.o. za poskytnutí kultivačních půd k otestování.

SOUHRN

Diplomová práce je zaměřena na kontrolu kvality živných médií pro kultivaci bakterií. Kultivační půdy mají rozhodující vliv na správný výsledek bakteriologického vyšetření.

Norma ČSN P CEN ISO / TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2 předepisuje druh zkoušek, které musí být u nové šarže provedeny. Patří sem: vizuální kontrola, kontrola pH, kontrola sterility a kontrola růstových vlastností.

Vizuální kontrola odhalí případné hrubé chyby, které mají obvykle za následek nepoužitelnost vzhledově odlišného výrobku. Kontrola pH je nezbytná. Každá šarže musí být kontrolována na případnou kontaminaci před vlastním použitím půd. Tyto kvalitativní testy jsou minimálním požadavkem na kontrolu kvality půd. Při vyšší kontrole jakosti média se provádějí kvantitativní (pro testování tekutých půd v bakteriologických zkumavkách) a semikvantitativní (pro testování agarových půd) zkoušky spočívající v hodnocení produktivity P_R (u semikvantitativních metod růstového indexu G_i), selektivity S_E a specifity S_P .

Každé kultivační médium má mít v laboratoři vlastní protokol o provedených kontrolách jakosti s uvedením použitých kontrolních referenčních kmenů.

Celkem jsme otestovali 46 šarží půd.

Z toho u 36,8 % testovaných šarží jsme zjistili nízký růstový index. Tento jev se vyskytoval převážně u selektivních a selektivně - diagnostických půd. Jelikož v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacích bakteriálních kmenů dobrý, mohli jsme jejich jakost potvrdit.

U 19,6 % testovaných šarží jsme objevili závady při vizuální kontrole. Tyto chyby neovlivnily funkci půd, a proto i u těchto půd jsme jakost potvrdili.

Nedostatky při kontrole specifity vykazovalo 17,9 % půd. U těchto půd jsme jakost potvrdit nemohli vzhledem k negativnímu ovlivnění charakteristiky růstu testovacích bakteriálních kmenů.

U dalších 4,3 % půd jsme nepotvrdili sterilitu. Jelikož jsme otestovali pouze jednu půdu (bujón), nemohli jsme spolehlivě zhodnotit kontaminaci celé šarže.

Klíčová slova: kultivační médium, kontrola kvality

SUMMARY

This thesis is aimed to quality control of new batches of media for bacterial cultivation. Culture media have a decisive influence on the correct result of bacteriological examination.

Standard ČSN P CEN ISO / TS 11133-2 Microbiology of food and feed - Part 2 prescribes the type of tests that must be performed for a new batches. Visual control, check of pH value, check for contamination and grow promotion testing are parameters for quality control of new batch of media.

Visual control often uncovers the gross defects and because of this reason the media can not be used. The pH value have to be checked. The batch have to be checked for possible contamination before use. These qualitative tests are minimal criteria for quality control of media. But quantitative (for testing the liquid media in bacteriological tubes) and semiquantitative (for testing the solid media) methods are used to ensure a higher quality control of the media. The productivity P_R (the grow index G_i for semiquantitative methods), the selectivity S_E and the specificity S_P are evaluated for this methods.

Each of culture media has its own protocol about performed checks of quality control in the laboratory. The control organisms should be noted in this protocol, too.

We examined a total of 46 batches of media.

The 36,8 % of the batches tested, we found a low growth index. This effect was occurred mostly in the selective and selective - diagnostic media. But the grow of test bacterial strains had been good in tested media in comparison with comparative media, we were able to confirm their quality.

In the visual control the defects were uncovered in 19,6 % of all tested media. However, these defects had not influenced function of the media and we were able to confirm the quality of batches, too.

Deficiencies in the control of specificity showed 17,9 % of media. For these media, we could not confirm the quality because of its negative influence growth characteristics of the test bacterial strains.

For further 4,3 % of media have not been confirmed the sterility. Since we tested only one medium (broth), we can not say with certainty whether the whole batch is contaminated.

Keywords: culture medium, quality control

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotika
ATCC	americká sbírka mikroorganismů (American Type Culture Collection)
CCM	česká sbírka mikroorganismů (Czech collection of Microorganisms)
CFU	jednotka množství bakterie (colony - forming unit)
CO₂	oxid uhličitý
č.š.	číslo šarže
DC agar	Deoxycholát - citrátový agar
EA	Endův agar
G_i	růstový index
HTM	<i>Haemophilus</i> Test Medium
H₂S	sulfan
KA	Krevní agar
MC agar	MacConkey agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MH agar (bujón)	Mueller - Hinton agar (bujón)
MMGA	Mineral Modify Glutamate agar
NaCl	chlorid sodný
P_R	hodnota produktivity
S_E	selektivita
S_F	faktor selektivity
S_P	specifická
sp.	species (druh)
ssp.	subspecies (poddruh)
TSA	Trypton sojový agar
TTC	trifenyltetrazolium chlorid
V agar	Agar s lidskou krví
VRBL agar	Violet Red Bile Lactose agar

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Pěstování mikroorganismů.....	11
2.1.1	Historie	11
2.1.2	Podmínky kultivace	11
2.2	Rozdělení kultivačních půd	11
2.3	Přehled vybraných testovaných kultivačních půd	12
2.3.1	Půdy neselektivní.....	12
2.3.2	Půdy k testování citlivosti na ATB.....	16
2.3.3	Půdy selektivně - diagnostické	18
2.3.4	Půdy selektivní	31
2.3.5	Půdy diagnostické.....	33
2.4	Kontrola kvality kultivačních půd	34
2.4.1	Faktory ovlivňující kvalitu kultivačních médií	34
2.4.2	Fyzikální vlastnosti kultivačních půd	35
2.4.3	Růst mikroorganismů na kultivačních půdách	36
2.5	Metodika testování kultivačních půd	36
2.5.1	Metody kontroly kvality pro agarové půdy	39
2.5.1.1	Kvantitativní metody	39
2.5.1.2	Semikvantitativní tzv. ekometrická metoda	40
2.5.1.3	Kvalitativní metoda	42
2.5.2	Metody kontroly kvality pro tekuté kultivační půdy	43
2.5.2.1	Kvantitativní metody	43
2.5.2.2	Semikvantitativní metoda	44
2.5.2.3	Kvalitativní metoda	45
2.5.3	Půdy k testování citlivosti na ATB.....	45
2.6	Řešení problémů u testovaných půd.....	46
2.7	Dokumentace kontrol	47
2.7.1	Kontrolní list.....	47
2.7.2	Ostatní dokumentace	47
2.8	Důležitost kontroly kvality kultivačních půd	48

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
3.1	Příprava srovnávacích půd a použitý materiál	49
3.1.1	Srovnávací půdy	49
3.1.2	Roztoky.....	53
3.1.3	Použitá ATB	53
3.1.4	Přístroje a pomůcky	53
3.2	Pracovní postup	54
3.2.1	Testované půdy.....	54
3.2.2	Fyzikální vlastnosti kultivačních půd	54
3.2.3	Metody zkoušení výkonnosti kultivačních půd.....	54
3.2.3.1	Agarové půdy	54
3.2.3.2	Tekuté půdy	55
3.2.3.3	Půdy k testování citlivosti na ATB.....	55
4	VÝSLEDKY	57
4.1	Výsledky testovaných šarží půd	60
4.1.1	Neselektivní půdy	60
4.1.2	Selektivně - diagnostické půdy.....	63
4.1.3	Selektivní půdy	71
4.1.4	Diagnostické půdy	72
4.1.5	Půdy k testování citlivosti na ATB.....	73
5	DISKUZE A ZÁVĚR	75
6	PŘÍLOHA	81
7	SEZNAM LITERATURY	85

1 ÚVOD

Kultivační půdy hrají rozhodující roli v každé mikrobiologické laboratoři. Jsou v široké míře používány ke kultivaci, identifikaci a kontrole citlivosti různých patogenních mikroorganismů (Basu et al., 2005).

Pro spolehlivost mikrobiologického vyšetření má tudíž klíčový význam používání kultivačních půd osvědčené jakosti. Pro všechny půdy uvedené ve standardizovaných diagnostických metodách je nezbytné definovat minimální kritéria jejich kvality vyžadovaná k zajištění jejich spolehlivosti. Stanovení minimálních kritérií výkonnosti živných půd by mělo vést k vyšší a trvalé kvalitě vyráběných médií (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Program kontroly kvality zajišťuje, že informace o bakteriologických vyšetřeních podávané pracovníky laboratoře jsou správné, spolehlivé a opakovatelné. Toto je zajištěno hodnocením kvality vzorků; monitorováním postupu testování reagensů, půd, nástrojů a personálu; hodnocením výsledků testování; a dokumentováním platnosti testované metody (Laboratory procedure manuals: Quality control, 2008).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pěstování mikroorganismů

2.1.1 Historie

První kultivační půdy se objevují v devatenáctém století, kdy obor bakteriologie byl v počátcích. Za zakladatele lékařské bakteriologie jsou považováni Pasteur a Koch.

Bakteriologové byli nejprve nuceni pracovat s tekutými kultivačními půdami (bujóny z masového extraktu, z kvasnic atd.). K izolaci čistých kultur využívali pevné substráty jako například plátek bramboru a sražený vaječný bílek. Pro většinu bakterií bylo však toto médium příliš chudé. Koch proto použil pro kultivaci želatinu, přesněji extrakt z hovězího masa zpěněný želatinou.

V roce 1882 bakteriolog Walter Hesse nahradil želatinu agarem (želatina se totiž stávala tekutou již při 25 °C), jenž se používá dodnes. Agar je polysacharid z mořských řas a pro přípravu půd je ideální, protože se rozpouští při 90 °C a tuhne přibližně kolem 35 až 40 °C (Smith, 2009).

2.1.2 Podmínky kultivace

Aby se bakteriální buňka mohla dobře rozmnožovat, potřebuje mít ve svém okolí následující faktory, které jsou nezbytné k zajištění optimálních podmínek jejich růstu: živiny a jiné látky potřebné k růstu, vhodná vlhkost, optimální pH, vhodný osmotický tlak, optimální teplota, optimální redoxpotenciál a délka kultivace (Marková, 2008; Univerzita Pardubice, 2006).

2.2 Rozdělení kultivačních půd

Mikroorganismy se v laboratorních podmínkách kultivují na sterilních živných médiích, aby se zabránilo kontaminaci mikroorganismy z okolního prostředí (Frébertová, 2008).

Živná laboratorní média můžeme rozdělovat podle různých kritérií. Nejdůležitější je dělení půd podle - konzistence a účelu:

A. Dělení podle konzistence:

- Tekuté - tyto půdy slouží převážně k pomnožení bakterií. Růst bakterií je zde patrný v podobě zákalu média, tvorbou blanky nebo sedimentu.
- Pevné - jsou nejčastěji používanými půdami. Základ tvoří půda tekutá a do ní přidáný určitý podíl agaru. Bakteriální růst se vyznačuje tvorbou charakteristických útvarů - kolonií.
- Polotuhé - vznikají přidáním menšího podílu agaru do tekuté půdy.

B. Dělení podle účelu:

- Základní půdy - základní půdou je masopeptonový bujón, který obsahuje masový extrakt, bílkovinný hydrolyzát a NaCl. Po přidavku asi 2 % agaru vznikne živný agar.
- Diagnostické půdy - používají se k identifikaci biochemických vlastností čistých kultur mikroorganismů. Obsahují látky, které se vlivem metabolismu bakterií mění, což se projeví změnou barvy přidávaného indikátoru či jiným reagens. Patří sem např. Christensenův agar.
- Selektivní půdy - tyto půdy obsahují složky, které brání růstu některých mikroorganismů a jiné naopak zvýhodňuje.
- Selektivně - diagnostické půdy - mají vlastnosti obou předešlých skupin. Patří sem např. Deoxycholát - citrátová půda, Endova půda atd.
- Pomnožovací půdy - většinou jsou tekuté konzistence. Slouží k pomnožení bakterií, které jsou přítomny ve vzorku v malém množství.
- Půdy ke speciálním účelům - mohou být určeny např. k testování citlivosti bakterií na antibiotika (Millerův - Hintonové agar), k průkazům faktorů virulence apod. (Marková, 2008; Univerzita Pardubice, 2007).

2.3 Přehled vybraných testovaných kultivačních půd

2.3.1 Půdy neselektivní

A. Agarové půdy

Krevní agar (KA)

Jedná se o základní půdu obohacenou krví, která je v mikrobiologické laboratoři nenahraditelná. Někteří autoři řadí tuto půdu, vzhledem k možnosti diagnostikovat na ní hemolytické schopnosti mikrobů, k půdám diagnostickým.

K přípravě krevního agaru se používá většinou ovčí krev. Běžně se označuje jako krev beraní, protože se obvykle odebírá zdravým beranům. Aby se odebraná krev mohla po několik dnů uchovávat v chladničce, musí se defibrinovat.

Krevní agar se připravuje přidáním 5 - 10 % (obvykle 7 %) sterilní defibrinované ovčí krve k agarovému základu ochlazenému na 45 - 50 °C (Votava, 2000).

Krevní agar se v laboratorní praxi používá ke kultivaci a izolaci celé řady náročných patogenních i nepatogenních mikroorganismů. Používá se i pro zjišťování typických hemolytických reakcí, které jsou důležitým diagnostickým kritériem pro streptokoky, stafylokoky a jiné (Mottl, 1978).

Základní složení Columbia KA (g/l destilované vody) (Ellner et al., 1996):

pepton (z kaseinu)	10,0 g/l
pepton (z masa)	5,0 g/l
extrakt ze srdce	3,0 g/l
kvasničný extrakt	5,0 g/l
škrob	1,0 g/l
chlorid sodný	5,0 g/l
agar	13,0 g/l
pH = 7.3 ± 0.2 při 25 °C	

Tabulka 1 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Krevního agaru (Masarykova univerzita, 2007).

KA			
Kmen	CCM *	Růst	Hemolýza
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4424	+	α
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4425	+	β
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+	β/α
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4418	+	-

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 18 - 72 hodin při 35 ± 2 °C, aerobně (Bazgerová a Látal, 2009a).

Trypton sojový agar (TSA)

Trypton sojový agar je neselektivní médium všeobecně používané ke kultivaci a izolaci náročných i nenáročných mikroorganismů. Používá se ke kultivaci a následně počítání

kolonií mikrobů (*E. coli*). Toto médium je vhodné ke kultivaci jak aerobních tak i anaerobních mikroorganismů.

Základní složení TSA (g/litr destilované vody) (Sigma - Aldrich, 2008):

kaseinový pepton (pankreatický)	15,0 g/l
sojový pepton (papainový)	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
agar	15,0 g/l
pH: 7,3 ± 0,2 při 37 °C	

Tabulka 2 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality TSA (Masarykova univerzita, 2007).

TSA		
Kmen	CCM*	Růst
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4425	+

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 18 - 48 hodin při 35 °C, aerobně (Sigma - Aldrich, 2008).

GTK agar (Plate Count Agar)

Toto neselektivní médium je určeno ke kultivaci a stanovení celkového počtu mikroorganismů v potravinách, vodě a mléčných výrobcích. Půda neobsahuje indikátory, ani inhibitory.

Základní složení GTK agaru (g/litr destilované vody) (Bazgerová a Látal, 2008a):

enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g/l
kvasničný extrakt	2,5 g/l
glukóza	1,0 g/l
agar	15,0 g/l
pH: 7,0 ± 0,2	

Tabulka 3 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality GTK agaru (Masarykova univerzita, 2007).

GTK agar		
Kmen	CCM*	Růst
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4425	+

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 48 - 72 hodin při 30 ± 2 °C, aerobně (Bazgerová a Látal, 2008a).

B. Pomnožovací bujóny

BHI bujón (bujón z mozkosrdcové infuze)

Toto neselektivní médium je určeno k pomnožení růstově náročných bakterií.

Základní složení BHI bujónu (g/litr destilované vody) (Bazgerová a Látal, 2009b):

bujón z mozkosrdcové infuze	17,5 g/l
proteozový pepton	10,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
dextróza	2,0 g/l
hydrogenfosforečnan disodný	2,5 g/l
pH: $7,4 \pm 0,2$	

Tabulka 4 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality BHI bujónu (Bazgerová a Látal, 2009b).

BHI bujón		
Kmen	CCM*	Růst
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4425	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	+

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 24 - 48 hodin při 35 ± 2 °C, aerobně.

Živný bujón

Tento bujón je určený pro všeobecné použití v mikrobiologii. Výhodné růstové vlastnosti umožňují dobrý růst bakterií z relativně malých inokul (IMUNA PHARM, 2007a).

Základní složení Živného bujónu č.2 (g/litr destilované vody) (Mast Diagnostics, 2008):

pepton	10,0 g/l
--------	----------

masový extrakt	10,0 g/l
NaCl	5 g/l
pH: 7,3 ± 0,2	

Tabulka 5 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Živného bujónu (Mast Diagnostics, 2008).

Živný bujón		
Kmen	ATCC*	Růst
<i>Escherichia coli</i>	25922	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	+

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

Podmínky kultivace: 18 - 24 hodin při 35 - 37 °C.

2.3.2 Půdy k testování citlivosti na antibiotika (ATB)

A. Agarové půdy

Mueller - Hintonové agar (s krví) (MH agar (s krví))

Agar Mueller - Hintonové byl původně navržen k pěstování patogenních neisserií, nyní se však používá jen jako standardní půda k testování citlivosti na ATB.

K testování náročnějších mikrobů je možno obohatit MH agar přídatkem krve (5 - 7 % krve), případně z něj připravit čokoládový agar.

Díky úsilí amerického NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) a Světové zdravotnické organizace (WHO) renomovaní výrobci zaručují v každé šarži standardní množství Mg^{2+} , Ca^{2+} , thyminu a thymidinu, jakož i standardní difusní schopnost agaru, což umožňuje získat reprodukovatelné výsledky (Votava, 2000).

Základní složení MH agaru (s krví) (g/litr destilované vody) (Bazgerová a Látal, 2008b):

infuze z 300 g hovězího masa	
kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
kukuřičný škrob	1,5 g/l
agar	17,0 g/l
(defibrinovaná ovčí krev	50,0 ml/l)
pH: 7,3 ± 0,2 (MH agar bez krve) při 25 °C	
pH: 7,3 ± 0,1 (MH agar s krví) při 25 °C	

Tabulka 6 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Mueller - Hinton agaru (Benton et al., 2008).

MH agar (s krví)		
Kmen	CCM*	Růst
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	+
<i>Escherichia coli</i>	3954	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3955	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 20 - 24 hodin při 35 ± 2 °C, aerobně (Bazgerová a Látal, 2008b).

Haemophilus Test Medium (HTM)

Médium je určeno pro testování citlivosti na ATB druhu *Haemophilus (H.) influenzae* difúzní diskovou metodou (toto médium můžeme řadit také mezi půdy neselektivní, jelikož neobsahuje žádné indikátory, ani inhibitory).

Toto médium obsahuje Mueller Hinton agar, který je obohacen o X faktor (hemin nebo hematin), V faktor (NAD) a kvasničný extrakt.

Základní složení HTM (g/litr destilované vody) (Benton et al., 2009a):

masový extrakt	2,0 g/l
kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
škrob	1,5 g/l
agar	17,0 g/l
kvasničný extrakt	5,0 g/l
hematin (X faktor)	15 mg/l
nikotinamid adenin dinukleotid (V faktor)	15 mg/l
(koňská krev	100 ml/l)
pH: $7,4 \pm 0,2$	

Tabulka 7 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality *Haemophilus* Test Media (Benton et al., 2009a).

Haemophilus Test Medium		
Kmen	ATCC*	Růst
<i>Haemophilus influenzae</i>	49247	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	49766	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	+

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

Podmínky kultivace: 20 - 24 hodin při 35 °C v atmosféře s 5 % CO₂ (Bazgerová a Látal, 2009c).

B. Tekutá média

Mueller - Hinton bujón (MH bujón)

Mueller - Hinton bujón se používá pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Základní složení MH bujónu (g/litr destilované vody) (Merck, 2009):

masová infuze	2,0 g/l
kaseinový hydrolyzát	17,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
škrob	1,5 g/l
pH: 7,4 ± 0,2 při 25 °C	

Tabulka 8 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality MH bujónu (Merck, 2009).

MH bujón		
Kmen	CCM*	Růst
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+
<i>Escherichia coli</i>	3954	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3955	+

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 20 - 24 hodin při 35 ± 2 °C, aerobně.

2.3.3 Půdy selektivně - diagnostické

Endova půda (EA)

Tato selektivně - diagnostická půda slouží především k záchytu střevních bakterií (čeled' Enterobacteriaceae).

Selektivní složku tvoří bazický fuchsin, který umožňuje růst pouze gramnegativních bakterií. Pro diagnostiku je součástí půdy Schiffovo činidlo a laktóza. Díky těmto složkám je možné rozlišovat bakterie na laktóza pozitivní (či laktózu štěpící), které na EA rostou

v podobě tmavě červených kolonií, a na laktóza negativní (laktózu neštěpící) - kolonie jsou světle červené až růžové.

Barva půdy se mění i vlivem světla, proto se musí uchovávat v temnu (Marková, 2008).

Základní složení EA (g/litr destilované vody) (Atlas, 2004):

agar	10,0 g/l
laktóza	10,0 g/l
peptický hydrolyzát z tkáně zvířete	10,0 g/l
hydrogenfosforečnan didraselný	3,5 g/l
siřičitan sodný	2,5 g/l
roztok bazického fuchsinu	4 ml/l

(složení na 10 ml: bazický fuchsin - 1 g; ethanol (95% roztok - 10,0 ml)).

pH: $7,3 \pm 0,1$ při 25 °C

Tabulka 9 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality EA (Masarykova univerzita, 2007).

Endův agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie
<i>Escherichia coli</i>	3954	+	červené, kovový lesk
<i>Enterococcus cloacae</i>	1903	+	růžové
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	4420	+	bezbarvé
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 18 - 24 hod./48 hod. při 35 ± 2 °C, aerobně, ve tmě (Bazgerová a Látal, 2009d).

MacConkey agar (MC agar)

MacConkey agar je selektivně - diagnostická půda určená pro izolaci enterobakterií z klinického materiálu a počítání enterobakterií v potravinách, mléčných výrobcích a ve vodě. Používá se také k detekci enteropatogenních druhů rodů *Salmonella*, *Shigella* a *Escherichia* u dětí a v mateřském mléce (Bazgerová a Látal, 2008c).

Dnes existuje celá řada modifikací těchto půd, takže před výběrem vhodného typu je nutno zvážit účel použití a jemu odpovídající složení půdy.

Obecně vzato patří tato půda, podobně jako EA, mezi půdy selektivně - diagnostické. Choulostivé a kultivačně náročné druhy jsou potlačeny účinkem žlučových solí. Daleko více

jsou na půdě MacConkeyho inhibovány grampozitivní mikroby. Inhibitorem růstu grampozitivních mikrobů jsou opět žlučové soli a v klasických variantách ještě krystalová violet'. Většina základních variant půd obsahuje laktózu a ta dovoluje rozlišovat gramnegativní bakterie na půdě rostoucí na laktózu štěpící a na laktózu neštěpící (Votava, 2000).

Základní složení MC agar (g/litr destilované vody) (Atlas, 2004):

pankreatický hydrolyzát	17,0 g/l
agar	13,5 g/l
laktóza	10,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
žlučové soli	1,5 g/l
pankreatický kaseinový hydrolyzát	1,5 g/l
peptický hydrolyzát zvířecí tkáň	1,5 g/l
neutrální červeně	0,3 g/l
krystalická violet'	1,0 mg/l
pH: 7,1 ± 0,2 při 25 °C	

Tabulka 10 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality MC agaru (Hardy Diagnostics, 2002).

MC agar			
Kmen	ATCC*	Růst	Kolonie
<i>Escherichia coli</i>	25922	+	růžové až červené s precipitátem kolem kolonií
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	+	bezbarvé, bez plazivého růstu
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	+	bezbarvé
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	-	-

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

Podmínky kultivace: 18 - 24 hod./48 hod. při 35 ± 2 °C, aerobně, ve tmě (Bazgerová a Látal, 2008c).

Deoxychlát - citrátová půda (DC)

Tato selektivně - diagnostická půda je značně selektivní médium vyvinuté pro průkaz střevních patogenů. Potlačuje růst nejen všech grampozitivních mikrobů, ale i většiny kmenů koliformních bakterií. Obligátní patogeny z rodů *Salmonella* a *Shigella* na ní rostou zcela neomezeně. Růst nežádoucích mikroorganismů je potlačen vyšší koncentrací deoxycholátu sodného a citrátu sodného.

Na půdě DC lze také diagnostikovat štěpení laktózy a tvorbu sulfanu. Obsahuje neutrální červeň, takže kmeny štěpící laktózu, které na půdě vyrostou, tvoří růžové kolonie, většinou obklopené zónou precipitace. Kolonie laktóza negativních kmenů jsou bezbarvé.

Indikátorem tvorby H₂S je citrát železitý nebo železito - amonný. Kolonie kmenů tvořících sulfan ve svém středu postupně tmavnou až černají.

Základní složení DC agaru (g/litr destilované vody) (Votava, 2000):

sušený masový výtažek	5,0 g/l
pepton	5,0 g/l
laktóza	10,0 g/l
citrát sodný	5,0 g/l
siřičitan sodný	5,0 g/l
citrát železitý	1,0 g/l
deoxycholát sodný	2,5 g/l
neutrální červeň	0,025 g/l
agar	15,0 g/l
pH: 7,3 ± 0,2 při 25 °C (Votava, 2000)	

Tabulka 11 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality DC agaru (Masarykova univerzita, 2007).

DC agar					
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie	H ₂ S	Precipitát
<i>Escherichia coli</i>	3954	±	růžové	-	+
<i>Enterococcus cloacae</i>	1903	+	sv. růžové	-	±
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	4420	+	bezbarvé	+	-
<i>Proteus</i> sp.	1799	+	bezbarvé	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-			

Legenda:

kmeny rodu *Proteus* s pozitivním H₂S mohou na DC agaru růst v koloniích s černým středem

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 18 - 24 hod./48 hod. při 35 ± 2 °C, aerobně (Bazgerová a Látal, 2009e).

Violet Red Bile Lactose agar (VRBL agar)

Toto selektivně - diagnostické médium se využívá pro stanovení počtu koliformních bakterií v potravinách, vodě a mlékárenských výrobcích.

Violet Red Bile agar s laktózou je založen na bázi MC agaru pro detekci a počítání laktóza - fermentujících bakterií (Laboratoires CONDA, 1960a).

Na této půdě lze diagnostikovat štěpení laktózy. Kmeny štěpící laktózu tvoří červenofialové kolonie obklopené červenofialovým haló. Kolonie laktóza negativních kmenů jsou bezbarvé nebo slámové barvy (Oxoid, 2009).

Žlučové soli a krystalová violet inhibují grampozitivní bakterie. Neutrální červen je indikátorem pH.

Základní složení VRBL agaru (g/litr destilované vody) (Laboratoires CONDA, 1960a):

laktóza	10,0 g/l
chlorid sodný	5,0 g/l
žlučové soli	1,5 g/l
krystalová violet	0,002 g/l
peptonová želatina	7,0 g/l
kvasničný extrakt	3,0 g/l
neutrální červen	0,03 g/l
bakteriologický agar	15,0 g/l
pH: 7,4 ± 0,2 při 25 °C	

Tabulka 12 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality VRBL agaru (Masarykova univerzita, 2007).

Violet Red Bile Lactose agar				
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie	Precipitát
<i>Escherichia coli</i>	3954	+	červenorůžové	+
<i>Enterococcus cloacae</i>	1903	+	červenorůžové	+ ; - ^{**}
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	4420	+	bezbarvé	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-		

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

** Oxoid; *** HiMedia, Merck

Podmínky kultivace: 18 - 24 hod. při 35 ± 2 °C, aerobně (Laboratoires CONDA, 1960a).

Tergitolový agar

Tato selektivně - diagnostická půda se doporučuje ke stanovení počtu koliformních mikrobusů, salmonel a dalších střevních mikrobusů. Tergitol 7, chemicky heptadecylsulfát sodný,

inhibuje růst grampozitivní mikroflóry a plazení protea. Substrátem v půdě je laktóza, indikátorem jejího štěpení bromthymolová modř. Půda se běžně doplňuje ještě chloridem trifenylnitrotetrazolia (TTC), jenž je indikátorem bakteriálního růstu (během růstu bakterií se redukuje na nerozpustný barevný formazan).

Tergitolový agar H je doplněn sloučeninami (thiosíran sodný a citrát železito - amonný) k průkazu tvorby sulfanu.

Základní složení Tergitol 7 agaru H (g/litr destilované vody) (Votava, 2000):

proteózový pepton	5,0 g/l
kvasničný extrakt	3,0 g/l
laktóza	10,0 g/l
heptadecylsulfát sodný	0,1 g/l
bromthymolová modř	0,025 g/l
agar	15,0 g/l
citrát železito - amonný	0,5 g/l
disiřičitan disodný	0,5 g/l
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabulka 13 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Tergitolového agaru (Masarykova univerzita, 2007).

Tergitol - 7 agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie/Zóna
<i>Escherichia coli</i>	3954	+	žluté/žlutá
<i>Proteus sp.</i>	1799	+	červené/modrá
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 12 - 24 hod. při 35 °C, aerobně (Acumedia, 2004).

Slanetz - Bartley agar

Slanetz - Bartley agar je selektivně - diagnostická kultivační půda, která se používá pro detekci a stanovení počtu střevních enterokoků.

Azid sodný je selektivní činidlo, které potlačuje růst gramnegativních mikroorganismů. TTC (trifenylnitrotetrazolium chlorid) je barvivo, které je indikátorem bakteriálního růstu. TTC je redukován a uvnitř bakteriální buňky vzniká nerozpustný formazan, který je původcem vzniku červených kolonií.

Základní složení Slanetz - Bartley agaru (g/litr destilované vody) (BioVednor, 2008):

tryptóza	20,0 g/l
kvasničný extrakt	5,0 g/l
dextróza	2,0 g/l
hydrogenfosforečnan draselný	4,0 g/l
azid sodný	0,4 g/l
TTC	0,1 g/l
agar	10,0 g/l
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabulka 14 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Slanetz - Bartley agaru (Masarykova univerzita, 2007).

Slanetz - Bartley agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	+	červenohnědé
<i>Enterococcus hirae</i>	2423	+	růžovohnědé
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 24 ± 2 hod. při 35 ± 2 °C, aerobně (Bazgerová a Látal, 2009f).

Bile Esculin Azid agar

Bile Esculin Azid agar (řadíme mezi selektivně - diagnostické půdy) je modifikací Bile Esculin agaru doplněného azidem sodným jako inhibitoru. Azid sodný se využívá jako inhibitor gramnegativních bakterií a zároveň šetří enterokoky. Žluč neinhibuje růst enterokoků, zatímco růst ostatních grampozitivních mikroorganismů je potlačen.

Schopnost hydrolyzovat eskulin v přítomnosti žluči je charakteristickým znakem pro enterokoky a streptokoky skupiny D. Mikroorganismy štěpí eskulin na eskuletin a dextrózu. Eskuletin dále reaguje s citrátem železitým za vzniku tmavě hnědých až černých kolonií (Laboratoires CONDA, 1960b).

Základní složení Bile Esculin Azid agaru (g/litr destilované vody) (Bazgerová a Látal, 2008d):

trypton	17,0 g/l
pepton	3,0 g/l
kvasničný extrakt	5,0 g/l

býčí žluč sušená	10,0 g/l
chlorid sodný	5,0 g/l
eskulin	1,0 g/l
citrát železito - amonný	0,5 g/l
azid sodný	0,15 g/l
agar	15,0 g/l
pH: 7,1 ± 0,2 při teplotě 25 °C	

Tabulka 15 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Bile Esculin Azid agaru (Masarykova univerzita, 2007).

Bile Esculin Azid agar			
Kmen	CCM*	Růst	Hydrolyza eskulinu
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	+	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4425	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 18 - 24 hod. při 35 ± 2 °C, aerobně (Laboratoires CONDA, 1960b).

Perfringens agar

Tato selektivně - diagnostická půda byla poprvé použita p. Handfordem v roce 1974, kvůli problémům spojeným s počítáním kolonií druhu *Clostridium (C.) perfringens*.

Disiřičitan disodný a citrát železito - amonný jsou indikátory redukce siřičitanu bakterií *Clostridium perfringens* - produkují černé kolonie.

Základní složení Perfringens agaru (g/litr destilované vody) (Lab M, 2006):

tryptóza	15,0 g/l
sojový pepton	5,0 g/l
kvasničný extrakt	5,0 g/l
játrový extrakt	7,0 g/l
citrát železito - amonný	1,0 g/l
disiřičitan disodný	1,0 g/l
tris pufr	1,5 g/l
agar	10,0 g/l
pH: 7,3 ± 0,2	

Tabulka 16 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Perfringens agaru (Masarykova univerzita, 2007).

Perfringens agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie
<i>Clostridium perfringens</i>	4991	+	černé
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	1999	±	bezbarvé

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 24 hod. při 37 °C, anaerobně (Lab M, 2006).

***Pseudomonas* agar**

Tato selektivně - diagnostická půda je určena pro průkaz *Pseudomonas* species. Chlorid hořečnatý a síran draselný zvýrazní produkci pyocyaninu. Pyocyanin je modrozelený pigment, který je produkován druhem *Pseudomonas aeruginosa*. Tento pigment barví kolonie a současně difunduje do okolního média. Nežádoucí mikroorganismy jsou inhibovány cetrimidem (Health Protection Agency, 2005).

Základní složení *Pseudomonas* agaru (g/litr destilované vody) (Bazgerová a Látal, 2008e):

želatinový pepton	16,0 g/l
kaseinový pepton	10,0 g/l
síran draselný	10,0 g/l
chlorid hořečnatý	1,4 g/l
glycerol	10,0 g/l
agar	11,0 g/l
cetrimid	0,2 g/l
kyselina nalidixová	0,015 g/l
pH: 7,1 ± 0,2	

Tabulka 17 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality *Pseudomonas* agaru (Masarykova univerzita, 2007).

<i>Pseudomonas</i> agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3955	+	žlutozelené/modrozelené se žlutozeleným exopigmentem
<i>Proteus</i> sp.	1799	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 24/40 - 48 hodin při 35 °C, aerobně (Bazgerová a Látal, 2008e).

Agar s lidskou krví (V agar; *Gardnerella vaginalis* agar)

Teoreticky můžeme V agar řadit mezi půdy selektivně - diagnostické, jelikož směs antibiotik působí selektivně a krev působí diagnosticky vzhledem k možnosti diagnostikovat hemolytické schopnosti mikrobů.

Tato půda se používá pro záchyt a izolaci *Gardnerella* (*G.*) *vaginalis* z klinických vzorků. *G. vaginalis* produkuje charakteristickou β hemolýzu v přítomnosti lidské krve a díky tomu můžeme *G. vaginalis* odlišit od podobných mikroorganismů (Benton et al, 2009b).

Základní složení V agaru (g/litr destilované vody) (LabMediaServis, 2008):

GC agar BBI	72,0 g/l
proteozový pepton oxoid	7,5 g/l
suplement G Dulab (směs ATB)	1 ks
Tween 80	12 kapek
lidská krev	100,0 ml
pH: 7,4 ± 0,2 při 25 °C	

Tabulka 18 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality V agaru (PML Microbiologicals, 2001).

Agar s lidskou krví			
Kmen	ATCC*	Růst	Hemolýza
<i>Gardnerella vaginalis</i>	49145	+	β
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	+	α
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	+	β

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

Podmínky kultivace: 48 - 72 hodin při 35 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

Mineral Modify Glutamate agar (MMGA)

Toto selektivně - diagnostické médium slouží k detekci koliformních bakterií a k detekci *Escherichia* (*E.*) *coli* ve chlorovaných vodách, respektive tam, kde je malá koncentrace těchto mikroorganismů. Ke zlepšení stability dehydratovaného média při skladování se musí do základního média přidat glutamát sodný.

Tato půda by měla sloužit k oživení oslabených bakteriálních buněk *E. coli* z potravin. Po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C, kde většina bakterií je již oživených, je garantován růst na Chromocult TBX agaru při 44 °C (kolonie *E. coli* na Chromocult TBX agaru mají modrozelenou barvu) (Merck, 2006; Biolife, 2006).

Základní složení MMGA (g/litr destilované vody) (Oxoid, 2008a):

laktóza	20,0 g/l
sodium formate	0,5 g/l
L-cystin	0,04 g/l
L(-) kyselina aspartová	0,048 g/l
L(+) arginin	0,04 g/l
thiamin	0,002 g/l
kyselina nikotinová	0,002 g/l
kyselina pantotenová	0,002 g/l
heptahydrát síranu hořečnatého	0,2 g/l
citrát železito - amonný	0,02 g/l
dihydrát chloridu vápenatého	0,02 g/l
hydrogenfosfát didraselný	1,8 g/l
bromkrezolová purpura	0,02 g/l
pH: 6,7 ± 0,1 při 25 °C	

Tabulka 19 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality MMGA (Merck, 2008; Andrews, 2004).

Mineral Modify Glutamate agar			
Kmen	ATCC*	Růst	Kolonie
<i>Escherichia coli</i>	25922	+	žluté
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	+	bezbarvé průhledné
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	-	
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	-	

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

***Enterobacter sakazakii* agar**

Tato selektivně - diagnostická půda se využívá k průkazu druhu *Enterobacter (E.) sakazakii*.

Po přidání chromogenního substrátu 5-brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-glukopyranosid do média můžeme odlišit α -glukosidáza pozitivní a α -glukosidáza negativní bakterie. *E. sakazakii* je α -glukosidáza pozitivní, což se projeví vznikem modrozelených kolonií.

Deoxycholát inhibuje růst většiny grampozitivních bakterií (Sigma - Aldrich, 2009a):

Chromogenní média slouží k rychlé a jednoduché detekci bakterií pomocí chromogenních substrátů v půdě. Chromogenní směs obsahuje chromogenní substráty jako Salmon - GAL, X - Gal, X - glukuronid, atd. Enzymy produkované některými bakteriemi štěpí tyto substráty, což má za následek odlišné zbarvení kolonií bakterie (Sigma - Aldrich, 2009b).

Základní složení *Enterobacter sakazakii* agaru (g/litr destilované vody) (Sigma - Aldrich, 2009a):

agar	15,0 g/l
kaseinový enzymatický hydrolyzát	15,0 g/l
chromogen	10,17 g/l
papaicky natrávená sojová moučka	5,0 g/l
chlorid sodný	5,0 g/l
deoxycholát sodný	0,5 g/l
thiosulfát sodný	1,0 g/l
pH: 7,3 \pm 0,2	

Tabulka 20 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality *Enterobacter sakazakii* agaru (Oxoid, 2008b).

<i>Enterobacter sakazakii</i> agar			
Kmen	ATCC*	Růst	Kolonie
<i>Enterobacter sakazakii</i>	29004	+	modrozelené
<i>Escherichia coli</i>	25922	+	slámová barva
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	-	

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

Podmínky kultivace: 24 hodin při 35 - 37 °C, aerobně.

HiCrome *Escherichia coli* agar

Tato selektivně - diagnostická půda slouží k detekci, izolaci a stanovení počtu *E. coli* ve vzorcích potravin. Kmeny *E. coli* jsou indikátorem fekální kontaminace. Všeobecné limity

pro potraviny jsou cca 50 bakterií *E. coli* na gram vzorku. Vzhledem k tomu je velmi důležité detekovat a především zjišťovat jejich přesný počet. Toto kultivační médium přímo detekuje kolonie *E. coli* modré barvy, a tím umožňuje přímé stanovení jejich počtu.

Žlučové soli inhibují grampozitivní bakterie. (Trios, 2009).

Základní složení HiCrome *Escherichia coli* agaru (g/litr destilované vody) (HiMedia, 2009a):

žlučové soli	1,5 g/l
kaseinový enzymatický hydrolyzát	15,0 g/l
hydrogenfosforečnan disodný	1,0 g/l
dihydrogenfosforečnan sodný	0,6 g/l
pepton	5,0 g/l
NaCl	2,4 g/l
agar	12,0 g/l
X - glukuronid	0,075 g/l
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabulka 21 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality HiCrome *Escherichia coli* agaru (Masarykova univerzita, 2007).

HiCrome <i>Escherichia coli</i> agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie
<i>Escherichia coli</i>	3954	+	modré
<i>Escherichia coli</i> (O157 avirulentní)	4787	+	bezbarvé
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	4420	+	bezbarvé
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 24 ± 48 hodin při 35 - 37 °C, aerobně (Sigma - Aldrich, 2009c).

HiCrome *Candida* agar

Tato selektivně - diagnostická půda slouží pro rychlou izolaci a identifikaci druhů rodu *Candida*.

Neumožňuje pouze růst a detekci kvasinek (jako například tradiční Sabouraud agar), ale umožňuje přímou druhovou diferenciaci různých druhů rodu *Candida*, a to pouze na základě rozlišení barvy kolonií (Trios, 2009).

Základní složení HiCrome *Candida* agaru (g/litr destilované vody) (HiMedia, 2009b):

pepticky natrávená zvířecí tkáň	15,0 g/l
dihydrogenfosforečnan didraselný	1,0 g/l
chromogenní směs	11,22 g/l
chloramfenikol	0,5 g/l
agar	15,0 g/l
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabulka 22 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality HiCrome *Candida* agaru (Masarykova univerzita, 2007).

HiCrome <i>Candida</i> Agar			
Kmen	CCM*	Růst	Kolonie
<i>Candida albicans</i>	8186	+	modré
<i>Candida tropicalis</i>	8223	+	krémové
<i>Escherichia coli</i>	3954	-	

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 48 hodin při 37 °C, aerobně (Ghelardi et al., 2008).

2.3.4 Půdy selektivní

***Campylobacter* Agar Base (KARMALI)**

Tato selektivní půda slouží k průkazu a izolaci *Campylobacter (C.) jejuni* a *Campylobacter coli* z klinických vzorků.

Toxické prvky, fotochemicky generované v půdě nebo produkované metabolizmem bakterií, jsou neutralizovány přidáním aktivního uhlí. *Campylobacter* medium obsahuje také specifický suplement - pyruvát sodný, který zlepšuje aero - toleranci *C. jejuni* a *C. coli*.

Selektivita je dosažena přidáním cefoperazonu (omezuje růst gramnegativních druhů), vankomycinu (působící na grampozitivní bakterie) a cykloheximidu (inhibuje kvasinky). Díky tomu je půda vysoce selektivní.

Základní složení Karmaliho půdy (g/litr destilované vody) (Oxoid, 2008c):

Columbia Agar Base	39,0 g/l
aktivní uhlí	4,0 g/l
hemin	0,032 g/l

Campylobacter Selective Supplement (každá vialka je určena pro 500 ml média: pyruvát sodný - 50,0 mg; cefoperazon - 16,0 mg; vankomycin - 10,0 mg; cykloheximid - 50,0 mg).

pH: $7,4 \pm 0,2$ při 25 °C

Tabulka 23 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality *Campylobacter* agaru (Oxoid, 2008c).

<i>Campylobacter</i> Agar Base			
Kmen	ATCC*	Růst	Kolonie
<i>Campylobacter jejuni</i>	33291	+	šedé
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	

Legenda:

*ATCC - American Type Culture Collection

Podmínky kultivace: 48 hodin při 42 °C, anaerobně.

GKCH agar (Agarová půda s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem)

GKCH agar je selektivní půda určená pro izolaci a kultivaci kvasinek a plísní. Obsah kvasničného extraktu poskytuje růstové faktory, glukóza je energetickým zdrojem. Přítomnost širokospektrálního antibiotika v půdě působí bakteriostaticky na grampozitivní bakterie, zatímco kvasinky a plísně rostou bez omezení.

Základní složení GKCH agaru (g/litr destilované vody) (IMUNA PHARM, 2007b):

kvasničný extrakt	5,0 g/l
chloramfenikol	0,1 g/l
glukóza	20,0 g/l
agar	12,0 g/l
pH: $6,6 \pm 0,2$	

Tabulka 24 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality GKCH agaru (IMUNA PHARM, 2007b; Bazgerová a Látal, 2008f).

GKCH agar		
Kmen	CCM*	Růst
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8191	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	-
<i>Escherichia coli</i>	3954	-

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

Podmínky kultivace: 5 dnů při 25 °C, aerobně.

2.3.5 Půdy diagnostické

Do této skupiny můžeme řadit také již zmíněný Krevní agar vzhledem k možnosti diagnostikovat na něm hemolytické schopnosti mikrobů.

Hajnova půda

Tato diagnostická půda slouží k identifikaci enterobakterií na základě štěpení cukrů a produkce sulfanu. Štěpení přítomných sacharidů, jako energetické složky, je indikované fenolovou červení. Tvorba plynu při zkvašování se zjistí zhodnocením kompaktnosti agarové vrstvy. Sulfan tvořící mikroorganismy jsou indikovány tvorbou černé sraženiny (IMUNA PHARM, 2007c).

Základní složení Hajnovy půdy (g/litr destilované vody) (LabMediaServis, 2008):

Základ na 400 ml:

Columbia agar	127,5 g/l
laktóza	40,0 ml
glukóza	4,0 g/l
siřičitan sodný	1,6 g/l
thiosíran sodný	3,2 g/l
síran železnatý	1,0 g/l
fenolová červen	48,0 ml
pH: 7,5 ± 0,1	

Tabulka 25 Přehled kontrolních kmenů používaných při kontrole kvality Hajnovy půdy (IMUNA PHARM, 2007c).

Hajnova půda					
Kmen	CCM*	Zkvašování při očkování		Tvorba	
		vpichem	plynu	plynu	H ₂ S
<i>Salmonella typhi</i>		+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	3954	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3955	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>		+	+	+	-

Legenda:

*CCM - Czech collection of Microorganisms

zkvašené sacharidy - žlutá barva půdy; nezkvašené sacharidy - barva půdy nezměněná; tvorba plynu - zjištěné bubliny v dolní části agaru; tvorba H₂S - zčernání půdy kolem vpichu

Podmínky kultivace: 18 - 24 hodin při 37 °C, aerobně.

2.4 Kontrola kvality kultivačních půd

2.4.1 Faktory ovlivňující kvalitu kultivačních médií

Mezi faktory ovlivňující přípravu kultivačních médií řadíme: kvalitu jednotlivých komponent potřebných pro přípravu médií, čistotu prostorů, způsob přidávání krve a suplementů, dávkování kultivačního média, sterilizaci, kontaminaci a lidský faktor (Bazgerová a Látal, 2004).

K přípravě kultivačních médií se užívají buď kompletní dehydratovaná kultivační média nebo jednotlivé složky standardní jakosti a chemikálie s označením „analyticky čisté“. Při přípravě kompletních kultivačních médií je třeba se řídit pokyny výrobce. Pokud nejsou připravená kultivační média ihned použita, uchovávají se při teplotě 5 ± 3 °C v temnu nejdéle 1 měsíc, za podmíněk, které zabrání změnám jejich složení nebo jinému znehodnocení (Matějů a kol., 2001). Pokud někteří výrobci doporučují určité skladovací podmínky, je nutno je respektovat. Je zapotřebí vždy označit datum dodávky a datum prvního otevření daného balení půdy (Laboratory procedure manuals: Quality control, 2008).

Voda je nejdůležitější surovinou pro přípravu půdy. Parametry, které by měly být kontrolovány jsou: přítomnost iontů mědi ve vodě, vodivost a pH. Ideálně by ionty mědi neměly být ve vodě vůbec přítomny, protože jsou to inhibitory růstu mikroorganismů. Hodnota konduktivity by měla být nižší než 15 μ S a pH vody by mělo být mírně kyselé, ale nemělo by klesnout pod hodnotu 5,5.

U krve by měla být, před přidáním do médií, kontrolována homogenita, viskozita a barva (Basu et al., 2005; Bridson, 2006).

Sterilizace hraje také významnou roli při přípravě média. Obvykle je prováděna pomocí autoklávu. V zájmu zachování původních vlastností půdy je třeba volit takový způsob sterilizace, který umožňuje spolehlivé usmrcení vegetativních forem i spor a přitom co nejméně poškodí médium. Platí zásada, že účinnější a šetrnější je krátkodobá sterilizace při vyšší teplotě. Navrhnutý cyklus je rozdělen do čtyř stádií, a to: 20 - 121 °C; <100 - 121 °C; 121 °C a 121 - 80 °C, a to při přetlaku 0,1 MPa po dobu 20 - 30 minut (Basu et al., 2005; Univerzita Pardubice, 2007).

Některé selektivní agarové půdy (např. s obsahem deoxycholátu sodného) by se sterilizačními teplotami znehodnotily, a proto se pouze rozvažují a po ochlazení na 50 °C se přímo vlévají na Petriho misku (Jandová a Kotoučková, 1996; Basu et al. 2005).

2.4.2 Fyzikální vlastnosti kultivačních pŕůd

Kontrola fyzikálních vlastností kultivační pŕůdy je neoddělitelnou součástí její přípravy. Provádí se tudíž u každé nové výrobní šarže. Alespoň tři zkoušky jsou samozřejmě u každé šarže vyrobené pŕůdy. Jsou to :

- vizuální kontrola vzhledu pŕůdy, její čirost a zabarvení
- kontrola pH pŕůdy po sterilizaci
- kontrola sterility.

Vizuální kontrola odhalí případné hrubé chyby, které obvykle mají za následek nepoužitelnost vzhledově odlišného výrobku (Votava, 2000).

Vizuální kontrola by měla zahrnovat následující body: neporušenost obalu, praskliny v Petriho misce, kvalita a správnost značení, datum expirace, kondenzace v Petriho misce, dehydratace (prasklé médium, suchý povrch), vyblednutí nebo hemolýza, nerovnoměrné zaplnění misky, kontaminace, síla gelu, krystalický charakter na povrchu média a trhliny nebo velké bubliny (Arghyros et al., 1996).

Při koupi nové šarže kultivační pŕůdy je nezbytné zkontrolovat dobu expirace. Tato doba by neměla být překročena ani před vlastním použitím hotové kultivační pŕůdy (Stadia and Barghothi, 2002). Faktory, které ovlivňují dobu expirace jsou: teplota, obal (sklo, plast, systém uzavření obalu, atd.), vlhkost a světlo. Je-li šarže uskladněná v chladničce a uzavřena v neporušeném obalu, mohou být pŕůdy používány mnohem déle než pŕůdy uskladněné v porušeném obalu (Sutton, 2006).

Hodnota pH může být měřena při přípravě média před a po autoklávování pomocí standardního pH metru po řádné kalibraci standardními pufrůy (Basu et al., 2005). Indikátorové pH papírky většinou nevyhovují pro nízkou citlivost. Úprava pH pŕůd se provádí pomocí 1M NaOH, 1M H₂SO₄ (1M HCl, kys. mléčné, vinné apod.). Pro bakterie se pH upravuje obvykle na 7,0 - 7,3, pro kvasinky a plísně na 4,5 - 6,0.

Sterilizací pŕůd klesne pH o 0,1 - 0,3, proto se před sterilizací nastaví pH o 0,1 - 0,2 nad požadovanou hodnotu (Univerzita Pardubice, 2006).

Kontrolovat sterilitu je nezbytné u pŕůd, které jsou doplněny o různé termolabilní složky (například krev, sérum, glukózu, antibiotika a další), které není možné sterilizovat v autoklávu (Arora, 2004).

Zkouší se 5 % misek či zkumavek z každé šarže, a to většinou inkubací 24 - 48 hodin při 37 °C. U případné kontaminace si všímáme její lokalizace, abychom odhadli její příčinu.

Kontaminace při dně půdy ukazují na nesterilní misky, kolonie pouze na povrchu svědčí pro vzdušnou kontaminaci při rozlévání. V celé šarži by nemělo být kontaminováno více než 5 % výrobků (Votava, 2000).

Pokud je kontaminováno více než 5 % výrobků, šarže je znovu testována. Jestliže je u těchto testovaných půd kontaminace znovu větší než u 5-ti %, šarže je kompletně vyřazena (Laboratory procedure manuals: Quality control, 2008).

2.4.3 Růst mikroorganismů na kultivačních půdách

Charakter růstu mikroorganismů na kultivačních půdách je nejdůležitějším parametrem pro kontrolu kvality médií. Naočkováním **kontrolních kmenů** zjistíme, zda na půdě vůbec rostou, v jakých koloniích, případně zda půda přesně odráží jejich biochemické vlastnosti (Votava, 2000).

Pracovní kultury se mají připravovat ze zásobní referenční kultury tak, aby byly tvořeny čistou kulturou vyrostlou v tekuté neselektivní půdě do stacionární fáze růstu (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Při zkoušení kvality půd je třeba připravit z pracovní kultury suspenzi v bakteriologické zkumavce o hustotě buněk shodné s 0,5 stupni McFarlanda. Tato hustota by měla odpovídat $10^7 - 10^8$ CFU/ml (0,08 - 0,1 absorbance při 625nm). Takto připravená inokula se používají ke zjištění růstu na médiích. Inokulace se provádí ve více kopiích pro každý typ ředěného inokula. Po inokulaci jsou Petriho misky inkubovány 24 hodin při 37 °C (platí pro většinu půd). Po inkubaci je zaznamenán jejich růst a charakteristika kolonií (Basu et al., 2005).

2.5 Metodika testování kultivačních půd

Nově připravené šarže kultivačních půd je nutné vždy před použitím otestovat, zdali splňují nároky kladené na kvalitu.

Testování kvality půd může být prováděno kvantitativně, semikvantitativně nebo kvalitativně. K testování nové šarže kultivační půdy se používají metody semikvantitativní a kvalitativní. Pouze ve zvláštních případech, např. při hodnocení nové půdy nebo nového výrobce, se musí použít kvantitativní metody.

Aby mohly být výsledky testování kultivační půdy vyhodnoceny, je nutné, je porovnat s výsledky jiné, **referenční půdy** (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin

a krmiv - Část 2, 2005). Referenční půda může být vybrána z předchozí šarže stejného druhu nebo z neselektivní kontrolní půdy (Andrews et al., 2004). Pokud jsou půdy testovány kvantitativní metodou, je nutné použít specifickou referenční půdu. U semikvantitativních nebo kvalitativních metod není jejich použití nezbytné, ale napomáhají při interpretaci výsledků (Votava, 2000).

V tekutých půdách dochází ke složitějším interakcím, které rozhodujícím způsobem ovlivňují úspěšný růst mikroorganismů. Vymezení metod pro jejich testování není proto jednoznačné jako u půd tuhých (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Produktivita

Produktivita musí být měřena tam, kde je nezbytné demonstrovat růst mikroorganismu na médiu.

Pro **kvantitativní** metody se míra produktivity P_R stanovuje následujícím způsobem:

$$P_R = N_S / N_O$$

kde N_S je celkový počet kolonií zjištěný na testované kultivační půdě a N_O je celkový počet kolonií zjištěný na definované referenční půdě a měl by být ≥ 100 (Andrews et al., 2004).

Číselná hodnota míry produktivity neselektivní půdy činí nejméně 0,7 pro mikroorganismy, které na půdě rostou dobře (cílové mikroorganismy). Číselná hodnota P_R pro cílové mikroorganismy na selektivní půdě má být nejméně 0,1.

Těchto hodnot lze běžně dosahovat, nicméně pro určité kombinace půd a testovacích mikroorganismů lze akceptovat méně přísná kritéria (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

U **semikvantitativních** metod se sčítají skóre v jednotlivých sektorech plotny naočkované některou z následujících metod. Získá se tak růstový index G_i , jehož hodnoty se mění v závislosti na kultivační půdě. Proto je třeba porovnat zjištěný index s předchozími indexy a/nebo s G_i referenční půdy (Andrews et al., 2004).

Růstový index se vyjadřuje jako skóre, tj. počtem bodů. Skóre každé očkovací čáry, kde se zjistí růst po celé její délce, se hodnotí jako 1. Pokud se zjistí růst jen do poloviny délky očkovací čáry, hodnotí se skóre jako 0,5. U očkovací čáry, kde se růst nezjistí, nebo se zjistí růst pouze slabý, se skóre hodnotí jako 0. G_i se získá sečtením všech skóre.

U **kvalitativního** hodnocení se provádí vizuální kontrola s přiřazením růstového skóre.

Pro kvantitativní zkoušení produktivity plotnových půd (tj. při zkoušení zaměřeném na cílové mikroorganismy) se používá inokulum obsahující asi 10^2 CFU.

Pro semikvantitativní nebo kvalitativní zkoušení produktivity plotnových půd je zapotřebí inokulum obsahující 10^3 CFU až 10^4 CFU.

Pro zkoušení produktivity tekutých půd se používá inokulum obsahující 10 CFU až 100 CFU (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Selektivita

Selektivitu je nezbytné hodnotit tehdy, když médium potlačuje růst určitého mikroorganismu (Andrews et al., 2004).

Pro **kvantitativní** hodnocení selektivity se pomocí vhodných pomůcek naočkuje selektivní kultivační půda a půda referenční odpovídajícím inokulem (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Faktor selektivity S_F se počítá následujícím způsobem :

$$S_F = D_O - D_S \quad (S_F \text{ se vyjadřuje v hodnotách } \log_{10})$$

kde D_O je nejvyšší ředění, z něhož vyrostlo nejméně 10 kolonií na referenční půdě (neselektivní) a D_S je nejvyšší ředění, z něhož vyrostlo srovnatelné množství na testované půdě (Andrews et al., 2004).

S_F pro jiné než cílové mikroorganismy na selektivní půdě má činit nejméně 2. Tato hodnota je běžně dosažitelná. Nicméně pro určité kombinace půd a testovacích mikroorganismů lze akceptovat méně přísná kritéria.

Při použití **semikvantitativní** nebo **kvalitativní** metody musí být růst jiné než cílové kultury částečně nebo zcela inhibován.

Pro zkoušení selektivity kultivační půdy se na plotnu půdy nebo do zkumavky s půdou inokuluje suspenze jiného než cílového mikroorganismu obsahující 10^4 CFU až 10^6 CFU (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Specifita

Specifita je dána základními charakteristikami různých mikroorganismů, odlišnými biochemickými/fyziologickými vlastnostmi cílových mikroorganismů, velikostí kolonií a jejich morfologií (Andrews et al., 2004).

2.5.1 Metody kontroly kvality pro agarové půdy

Většina technik používaných pro kontrolu kvality (pro pevná média) je založena na **počítání kolonií**. Při hodnocení výsledků plotnových metod vycházíme z předpokladu, že každá kolonie, narostlá na povrchu nebo v agaru, vyrostla z jedné buňky. Dále je nutné dbát na to, aby počet vyočkovaných buněk nebyl příliš vysoký, aby nemohlo docházet ke vzájemnému antagonistickému působení. Optimální počet kolonií na misce o průměru 9 - 10 cm se pohybuje v rozmezí 30 - 300 pro celkový počet bakterií. Vyšší nebo nižší výsledky nejsou reprodukovatelné a vzorky musí být naředěny nebo zkoncentrovány tak, aby bylo dosaženo optimálního počtu buněk (Benešová a kol., 1992). Při ředění se obvykle vychází z desítkového ředění (Frébortová, 2008).

2.5.1.1 Kvantitativní metody

U **neselektivních médií** jsou porovnávány (vzhled a velikost kolonií) a spočítány kolonie na testované a referenční půdě a pomocí nich vypočítána produktivita.

Na **selektivních půdách** (testovaných i referenčních) se zkouší růst jak pozitivních tak negativních kontrolních mikroorganismů - pomocí spočítaných kolonií se vypočítává produktivita. Dále jsou zaznamenána ředění, která umožňují růst nejméně 10 kolonií na testované selektivní a referenční neselektivní půdě. Pomocí zaznamenaných ředění vypočítáme selektivitu. Dá se očekávat, že rozdíl v ředění ukazující růst na selektivní a neselektivní referenční půdě bude větší než dva řády (Andrews et al., 2004).

Corry et al. (2003) shrnuli nejčastěji používané kultivační techniky: technika lití ploten (Thomson, 1984); metoda založená na inokulaci roztěrem (Peterz et al., 1985); modifikace techniky Miles - Misra (Miles et al., 1938; Corry, 1982) a technika spirální inokulace (Gilchirst et al., 1973).

Technika lití ploten

Tato metoda spočívá v rozmíchávání mikrobiální suspenze do roztavené živné půdy (45 °C).

Jeden mililitr každého zředěného vzorku je nalit do sterilní Petriho misky, na kterou se vzápětí nalije 9 ml sterilního, zchlazeného agaru. Obsah se musí důkladně promíchat a nechat ztuhnout. Misky se inkubují při vhodné teplotě. Po několika dnech (záleží na druhu mikroorganismu) rostou jako samostatné kolonie (Microbiological methods, 2008).

Metoda založená na inokulaci roztěrem

Tato metoda spočívá ve zředování suspenze buněk sterilní vodou nebo fyziologickým roztokem a pipetování 0,1 ml této suspenze na utuhlou předsušenou agarovou půdu. Tato suspenze se poté roztírá pomocí zahnuté skleněné tyčinky po celém povrchu až do úplného vsáknutí (Microbiological methods, 2008).

Modifikovaná kapková metoda podle autorů Miles - Misra

Tato technika spočívá v kapání určitého množství naředěné suspenze na povrch půdy.

Pro tuto metodu je třeba připravit ředící řadu (desítkové ředění). Testované misky je třeba rozdělit na čtyři kvadranty a popsat je příslušným ředěním. Na každý kvadrant se kape stejný objem inokula příslušného ředění. Stejný postup se použije pro kontrolní půdy.

Kolonie vyrostlé v kvadrantu nejnižšího ředění se počítají jak na testovaném, tak na kontrolním agaru (Basu et al., 2005).

Technika spirální inokulace

Tato technika využívá pouze jednu misku pro vzorek. V tomto systému přístroj uchovává malý objem vzorku (okolo 35 μ l) a inokuluje ho na povrch rotující kultivační misky. Vzorek je vnášen ve zmenšujících se množstvích od středu do okrajů misky ve formaci Archimédovy spirály.

Během inkubace se kolonie rozrůstají podél linií, kde byl vzorek nanesen (Donnelly et al., 1976).

2.5.1.2 Semikvantitativní tzv. ekometrická metoda

Ekometrická pruhovací technika byla vyvinuta p. Mosselem a spolupracovníky (1980) jako semikvantitativní alternativa předešlých technik. Tato technika byla speciálně navržena ke kontrole agarových půd (Schéma 1).

Růst na médiích není zaznamenáván jako počet kolonií, ale jako skóre. Pět pruhů růstu v každém kvadrantu znamená výsledek 1, růst do tří pruhů výsledek 0,5. Maximální skóre pět je získáno jestliže všechny pruhy ve čtyřech kvadrantech ukazují růst a konečný pruh ve středu misky je kolonizovaný (Corry et al., 2003).

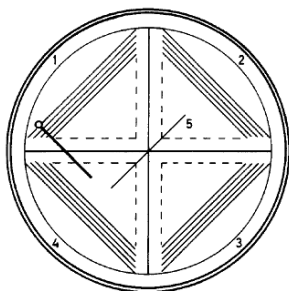


Schéma 1 Znárodnění ekometrické metody podle p. Mossela

Tato metoda má různé modifikace:

1. Opět je založena na očkování inokula kalibrovanou kličkou spirálovitým způsobem v čarách. Hodnotí se ale poslední čára, kde byl ještě pozorován souvislý nárůst. Srovnáním hodnot této čáry na půdě testované a kontrolní se vypočte růstový index a vyjádří se v procentech (Votava, 2000).

Petriho miska se zkoušeným médiem je rozdělena do čtyř kvadrantů podle schématu.

Kalibrovanou kličkou o objemu jeden mikrolitr je odebráno inokulum testované kultury, které je následně naočkováno podle schématu 2 - A1, B1, C1, D1, A2, B2...až do D5. Tento postup musí být zopakován i na kontrolní půdě. Po inkubaci je zaznamenán kvadrant a linie na které kmen ještě vyrostl, a to jak na testované tak na kontrolní půdě (Basu et al., 2005).

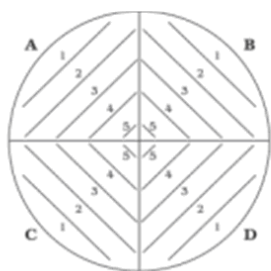


Schéma 2 Znárodnění ekometrické metody - první modifikace

Tabulka 26 Absolutní růstový index (AGI) je dán hodnotou poslední linie, na které ještě nastal růst.

Absolutní růstový index			
A1 = 5	B1 = 10	C1 = 15	D1 = 20
A2 = 25	B2 = 30	C2 = 35	D2 = 40
A3 = 45	B3 = 50	C3 = 55	D3 = 60
A4 = 65	B4 = 70	C4 = 75	D4 = 80
A5 = 85	B5 = 90	C5 = 95	D5 = 100

Relativní růstový index (RGI) se vypočítá pomocí absolutních růstových indexů zaznamenaných na testované a kontrolní půdě.

$$RGI = \frac{AGI(test.)}{AGI(kontrol.)} \times 100$$

Za účelem kontroly účinnosti média by mělo být RGI téměř 100%, zatímco pro kontrolu inhibice by mělo být blízko 0% (Basu et al., 2005).

2. V druhé modifikaci je agarové médium v Petriho misce naočkováno inokulem podle schématu 3.

Tato metoda je vhodná pro zkoušení výkonnosti agarových a tekutých živných půd. Růstové indexy jsou pouze znakem růstu a lze je pokládat jen za doplňující test pro tuhé kultivační půdy.

K očkování inokula se používá klička o objemu 1 μ l. V sektoru A se očkují čtyři rovnoběžné čáry vzdálené od sebe asi 0,5 cm. Pro každý další sektor se použije sterilní klička. Rozočkování se dále provádí v sektorech B a C a ukončí se v sektoru D jednou souvislou klikatou čarou.

Po inkubaci se posuzuje velikost kolonií a jejich vzhled, intenzita růstu a počítá se růstový index G_i . Růst cílového mikroorganismu má být typický.

Půda se hodnotí jako akceptovatelná, pokud růstový index pro cílový mikroorganismus dosahuje skóre nejméně 6. U neselektivních půd je G_i obvykle vyšší (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

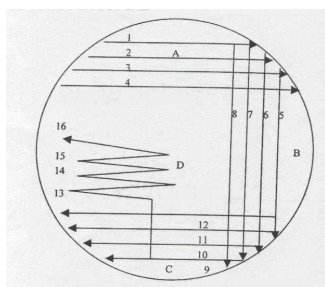


Schéma 3 Znárodnění ekometrické metody - druhá modifikace

2.5.1.3 Kvalitativní metoda

Metoda je vhodná jako doplňující pro zkoušení výkonnosti agarových půd. Zde se používají standardizované očkovací techniky inokula. Na povrch testovaných i referenčních půd se očkují testovací mikroorganismy v rovnoběžných čarách kličkou o objemu 1 μ l.

Po inkubaci se hodnotí růst na miskách: 0 odpovídá nulovému růstu, 1 odpovídá slabému růstu a 2 odpovídá dobrému růstu.

Cílové mikroorganizmy by měly dosahovat skóre 2 a kolonie musí mít typický vzhled, velikost a morfologii (Andrews et al., 2004).

2.5.2 Metody kontroly kvality pro tekuté kultivační půdy

Níže popsané kvantitativní, semikvantitativní a kvalitativní metody se používají k hodnocení jak produktivity, tak selektivity (velikost inokula viz 2.5).

2.5.2.1 Kvantitativní metody

Metody kontroly kvality tekutých půd, pomocí kvantitativních metod, můžeme rozdělit do dvou skupin:

- kontrola tekutých půd přímo v bakteriologických zkumavkách
- kontrola, během které se kultura po kultivaci v testované tekuté půdě přenesou roztěrem nebo rozočkováním kličkou na agarové půdy (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

Kontrola tekutých půd přímo v bakteriologických zkumavkách

Nejrozšířenější používanou metodou pro kontrolu kvality tekutých médií přímo ve zkumavkách je (most probable number) - metoda nejvíce pravděpodobného počtu. Tato metoda je založena na principu ředící řady.

Pro každý stupeň ředění se volí minimálně 3 zkumavky (pokud je potřeba obdržet přesnější výsledky, lze použít 5 zkumavek v jedné sérii). Po inkubaci je v každé zkumavce vyšetřen růst všech organismů, v každém stupni ředění se vyhodnocují zkumavky s pozitivní reakcí. Vyberou se vždy takové 3 po sobě jdoucí koncentrace vzorku, u kterých bylo zaznamenáno několik pozitivních i negativních výsledků, přičemž se vybere ta nejnižší koncentrace, u které se projevila ještě pozitivní reakce spolu se dvěma předcházejícími stupni ředění. Počet zkumavek zachycujících růst odpovídá statistickému vyhodnocení výtěžku nejvíce pravděpodobného počtu organismů ve vzorku (Říhová et al., 2007).

Tato technika nabízí mnoho výhod - je mnohem méně nákladná z hlediska času a zdrojů než ostatní uvedené techniky a je i mnohem jednodušší (Sutton, 2006).

Kontrola tekutých půd po inokulaci testovacích mikroorganismů na agarové půdy

Z každé šarže tekuté půdy určené ke zkoušení se vybere odpovídající počet zkumavek nebo dílů.

Inokulace cílových mikroorganismů: Každý testovací mikroorganismus se naočkuje do zkoušené a referenční tekuté půdy v nízkých počtech (např. 10 CFU až 100 CFU do každé zkumavky) a promíchá se - testování **neselektivních půd** (Andrews et al., 2004).

Pro testování **selektivních půd** je třeba ještě inokulace jiných než cílových mikroorganismů a inokulace cílových a jiných než cílových mikroorganismů jako směsné kultury.

Inokulace jiných než cílových mikroorganismů: Každý testovací mikroorganismus se naočkuje do zkoušené a referenční tekuté půdy ve vysokých počtech (např. >1000 CFU do každé zkumavky) a promíchá se.

Inokulace cílových a jiných než cílových mikroorganismů jako směsné kultury: Pro testování směsné kultury v selektivních půdách se naočkuje zkoušená a referenční tekutá půda cílovými mikroorganismy v nízkých počtech (např. 10 CFU až 100 CFU do každé zkumavky) a do téže zkumavky se naočkují jiné než cílové mikroorganismy ve vysokých počtech (např. >1000 CFU do každé zkumavky) a promíchá se.

Po inkubaci se z každé tekuté půdy nebo v případě potřeby z jejího ředění odebere příslušný objem a rozočkuje se na povrch neselektivní agarové půdy.

Po inkubaci se spočítají kolonie cílových a jiných než cílových mikroorganismů a jde-li o směsné kultury, odlišují se různé typy kolonií. Pomocí spočítaných kolonií se vypočítá P_R a S_F . Pro cílové mikroorganismy nesmí být P_R 0,1 (pokles kvantity růstu nepřesáhne jeden řád). Pro jiné než cílové mikroorganismy musí S_F činit nejméně 2. Ve směsných kulturách nesmí být růst cílových mikroorganismů inhibován mikroorganismy jinými než cílovými, tj. cílové mikroorganismy musí mít vždy dominantní populaci (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

2.5.2.2 Semikvantitativní metoda

Inokulace cílových mikroorganismů: Každý testovací mikroorganismus se naočkuje do zkoušené a referenční tekuté půdy v nízkých počtech (např. 10 CFU až 100 CFU do každé zkumavky) a promíchá se - testování **neselektivních půd**.

Pro testování **selektivních půd** je třeba ještě inokulace jiných než cílových mikroorganismů a inokulace cílových a jiných než cílových mikroorganismů jako směsné kultury.

Inokulace cílových a jiných než cílových mikroorganismů jako směsné kultury: jedna zkumavka zkoušené půdy se naočkuje cílovým mikroorganizmem v počtu asi 10 - 100 CFU a do téže zkumavky se naočkuje jiný než cílový mikroorganismus ve vyšších počtech (např. >1000 CFU do každé zkumavky).

Inokulace jiných než cílových mikroorganismů: jedna zkumavka zkoušené půdy se naočkuje jedním z nich, a to ve vyšším počtu (např. >1000 CFU) (Andrews et al., 2004).

Inokulované zkoušené tekuté půdy se inkubují, a poté se z neselektivní tekuté půdy a ze směsné kultury odebere 10 µl a rozočkuje se pomocí semikvantitativní metody na specifickou selektivní půdu určenou pro cílový mikroorganismus.

Z kultury jiného než cílového mikroorganismu se odebere 10 µl a rozočkuje se pomocí semikvantitativní metody na neselektivní půdy (např. TSA).

P_R zkoušené tekuté půdy se pokládá za vyhovující, pokud z ní vyrostlo na specifické selektivní plotnové půdě nejméně 10 kolonií cílového mikroorganismu.

S_F zkoušené tekuté půdy se pokládá za vyhovující, pokud z ní nevyrostly na neselektivní agarové půdě žádné kolonie (nebo vyrostlo méně než 10 kolonií) jiného než cílového mikroorganismu (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

2.5.2.3 Kvalitativní metoda

Standardní inokula pracovních kultur jsou přímo inokulovány do testovaných půd kličkou o objemu 1 µl.

Kvalitativní hodnocení se provádí vizuálně přiřazením růstového skóre od 0 do 2. 0 odpovídá nulovému zákalu, 1 odpovídá velmi slabému zákalu a 2 odpovídá značnému zákalu. Skóre cílového mikroorganismu musí dosáhnout 2 (Andrews et al., 2004).

2.5.3 Půdy k testování citlivosti na ATB

Jedním z nejdůležitějších úkolů v mikrobiologické laboratoři je testování citlivosti významných bakteriálních kmenů na ATB. Laboratorní vyšetření citlivosti mikroorganismů

na ATB jsou vodítkem k léčbě infekcí. Až na výjimky je citlivost kmenů téhož bakteriálního druhu variabilní. Proto je nutno ověřovat in vitro citlivost každého izolovaného patogenního kmene (Jorgensen et Ferrari, 1998; Západočeská univerzita v Plzni, 2008).

Přehled dostupných metod testování citlivosti na ATB v současné době:

Diluční metoda: Tato metoda spočívá v testování citlivosti mikroba na různé koncentrace ATB. Po inkubaci se zjišťuje minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je taková koncentrace, která již neumožňuje růst bakterie.

Disková difúzní metoda (Bauer - Kirby metoda): Tato metoda spočívá v inokulaci bakteriální suspenze na povrch testované a referenční půdy a následném vložení disku s ATB o známé koncentraci. Během inkubace dochází k difúzi ATB do půdy, a tím k vytvoření inhibiční zóny kolem disku. Po inkubaci se měří průměry inhibičních zón. Zda je mikrob rezistentní nebo citlivý se rozhoduje podle standardních hodnot daných v tabulkách. Inhibiční zóna (pro dané antibiotikum a mikroba) větší než stanovená hranice znamená, že mikrob je citlivý. Rezistentní bakterie vytvářejí zóny menší.

E test kombinuje princip diskové difúzní a diluční metody. Tato metoda je opět založena na difúzi koncentračního gradientu určitého antibiotika z plastického proužku do agarového média. Během inkubace dochází k difúzi ATB do půdy, a tím vytvoření zóny inhibice ve tvaru kapky. MIC je dána místem průniku hranice zóny inhibice se stupnicí pásu E testu (Jorgensen et Ferrari, 1998; Myrna and Mendoza, 1998).

2.6 Řešení problémů u testovaných půd

Nejčastější problémy u testovaných půd:

- měkký gel - nadbytek tepla, příliš nízké pH, nepřesné vážení, nedostatečné promíchání, nerozpuštění agaru, špatná kvalita dehydratované kultivační půdy
- nevhodné pH - kontaminované sklo, znečištěná voda, přehřívání, chemická kontaminace
- abnormální barva - znečištěná voda, špinavé sklo, nadbytek tepla, nevhodné pH
- ztmavnutí - nadbytek tepla
- precipitace - nadbytek tepla, znečištěná voda nebo sklo
- toxicita - nadbytek tepla
- špatný růst - kontaminovaná voda nebo sklo, nesprávné vážení nebo nedostatečné promíchání, nadbytek tepla

- špatná selektivita - kontaminovaná voda nebo sklo, nesprávné vážení, nadbytek tepla (Basu et al., 2005).

2.7 Dokumentace kontrol

2.7.1 Kontrolní list

Výsledky růstu či absence růstu a růstových charakteristik jsou zapisovány. Kontrolní listy by měly obsahovat následující údaje:

- jméno kultivační půdy, interní číslo šarže, datum rozplnění, datum expirace a připravený objem
- kontrola jakosti fyzikálními metodami - hodnota pH, rozplňované množství nebo tloušťka vrstvy, barva, čírost, konzistence gelu a závady
- mikrobiální kontaminace - počet zkoušených ploten nebo zkumavek a počet kontaminovaných ploten nebo zkumavek
- produktivita - použitý kmen, doba inkubace, použitá referenční půda, kritérium akceptovatelnosti a závady
- selektivita - použitý kmen, doba inkubace, použitá referenční půda, kritérium akceptovatelnosti a závady
- specificita - použitý kmen, doba inkubace, použitá referenční půda, kritérium akceptovatelnosti a závady (ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2, 2005).

2.7.2 Ostatní dokumentace

Nezbytnou součástí kontrolního systému je spolehlivá dokumentace. Na každé varně se musí vést evidence přijatých živných půd a chemikálií (s daty příjmu, expirace a otevření), zásady správné práce na varně půd, receptář sestavovaných živných půd a reagensů a přehled používaných metod (s hodnověrnými údaji o validaci domácích metod a postupů), sterilizační deník, záznamy o údržbě, kalibraci a provozuschopnosti běžných přístrojů (chladniček, vodních lázní atd.) (Votava, 2000).

2.8 Důležitost kontroly kvality kultivačních pŮd

Kontrola kvality médií používaných v laboratoři klinické mikrobiologie zůstává rozhodující pro správné a přijatelné izolace bakterií z vyšetřovaných materiálů.

Testováním médií za použití standardních protokolů lze ušetřit čas i prostředky (Weenk et al., 1992).

Ve studii provedené v Ontáriu bylo zjištěno, že doporučení NCCLS (Národní výbor pro klinické laboratorní standardy) pro zajištění kvality nebylo vůbec dodrženo. Navíc bylo zjištěno, že doporučené kontrolní kmeny byly používány pouze polovinou zúčastněných laboratoří. Podíl tohoto jevu na všech médiích se pohyboval v rozmezí od 1,10 % do 9,87 % (průměr 1,01 %) (Jones et al., 2003).

Důvody tohoto selhání byly: žádný růst (39,9 %), žádná inhibice (18,6 %), nesterilita (17,9 %), hemolýza (7,2 %) a povrchové vady (16,3 %) (Basu et al., 2005).

V krátké době budou muset být mikrobiologická pracoviště akreditována pro činnosti, jimiž se zabývají. K získání akreditace musí vyhovět určitým normám. Základní příručkou poskytující pokyny týkající se jakosti výsledků mikrobiologických zkoušek je dokument Evropské spolupráce pro akreditaci laboratoří ALE-G18 Akreditace laboratoří provádějících mikrobiologické zkoušení. Dokument vydal Český normalizační institut r.1996 (Votava, 2000).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Příprava srovnávacích půd a použitý materiál

3.1.1 Srovnávací půdy

Následující kultivační média, která jsme si sami připravili, jsme použili jako srovnávací půdy:

Krevní agar

42,5 g základu pro KA (firma HiMedia, č.š. 17141) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Při přípravě Columbia KA (firma HiMedia, č.š. 19106) jsme rozpustili 44 g základu v 1000 ml destilované vody a opět sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Po ochlazení na 50 - 60 °C jsme přidali 7 % defibrinované beraní krve (firma LabMediaServis).

KA jsme používali také pro kultivaci a izolaci používaných kmenů.

Trypton sojový agar

40 g základu pro TSA (firma HiMedia, č.š. 7L069) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

GTK agar (Plate Count Agar)

23,5 g půdy (firma HiMedia, č.š. 1G155) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

***Haemophilus* Test Medium**

21,5 g základu pro HTM (firma Oxoid, č.š. 652106) jsme rozpustili v 500 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Hned po sterilizaci v autoklávu jsme přidali 7 % hemolyzované koňské krve.

Po ochlazení na 50 °C jsme přidali HTM suplement (č.š. 684452), který byl rozpuštěn ve 2 ml sterilní destilované vody a promíchali.

Deoxychlát - citrátová půda

70 g základu pro DC agar (firma HiMedia, č.š. 9188) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali ve vodní lázni při 100 °C po dobu 15 - 30 minut.

MacConkey agar

51,5 g základu pro MC agar (firma Oxoid, č.š. 505693) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Endův agar

36 g základu pro EA (firma Oxoid, č.š. 201052) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a přidali 4 ml bazického fuchsinu. Půdu jsme zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Petriho misky s EA jsme uchovávali ve tmě.

Violet Red Bile Lactose agar

41,5 g půdy (firma AES Laboratoire, č.š. 717857) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali ve vodní lázni při 100 °C po dobu 15 - 30 minut.

Tergitol

57,2 g základu pro Tergitolový agar (firma HiMedia, č.š. 40194) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Po ochlazení na 45 - 50 °C jsme do půdy přidali 2,5 ml 1 % roztoku 2,3,5 - trifenylnitrazolium chloridu a promíchali.

Slanetz - Bartley agar

47 g půdy (firma HiMedia, č.š. 43506) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali ve vodní lázni při 95 °C po dobu 15 - 30 minut.

Bile Esculin Azid agar

56 g půdy (firma HiMedia, č.š. 9E191) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Perfringens agar

21 g základu pro Perfringens agar (firma HiMedia, č.š. 4L180) jsme rozpustili v 500 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Po ochlazení na 50 °C jsme přidali TSC suplement a promíchali.

Pseudomonas agar

24,2 g půdy (firma Oxoid, č.š. 579584) jsme rozpustili v 500 ml destilované vody a přidali jsme 5 ml glycerolu. Půdu jsme zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Po ochlazení na 50 °C jsme přidali lahvičku suplementu C-N, který byl rozpuštěn ve 2 ml směsi stejného poměru sterilní destilované vody a ethanolu.

Agar s lidskou krví (*Gardnerella vaginalis* agar)

43 g základu pro KA č.3 (firma IMUNA, č.š. 460404) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali ve vodní lázni při 100 °C po dobu 15 - 30 minut. Po ochlazení na 50 - 60 °C jsme přidali: 10 ml kvasničného extraktu a 20 ml séra na 100 ml půdy

10 ml suplementu G (firma Dulab, č.š. 060905)

0,01 ml Tweenu 80 (firma HiMedia, č.š. 3-1101)

100 ml plné lidské krve (Krajská Nemocnice Pardubice).

Mineral Modify Glutamate agar (firma HiMedia, č.š. 8963)

26,3 g části A obsahující chlorid amonný jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, a poté jsme přidali 6,4 g části B obsahující glutamát sodný. Po promíchání jsme půdu sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Enterobacter sakazakii agar

51,7 g půdy (firma HiMedia, č.š. 19332) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

HiCrome *Escherichia coli* agar

36,6 g půdy (firma HiMedia, č.š. WF247) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali ve vodní lázni při 100 °C po dobu 35 minut.

HiCrome *Candida* agar

21,5 g půdy (firma HiMedia, č.š. 34718) jsme rozpustili v 500 ml destilované vody a sterilizovali ve vodní lázni při 95 °C po dobu 15 - 30 minut (dokud nezmizel jemný zákal).

***Campylobacter* Agar Base (KARMALI)**

21,5 g půdy (firma Oxoid, č.š. 652108) jsme rozpustili v 500 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Po ochlazení na 50 °C jsme přidali vialku *Campylobacter* Selective Supplement (č.š. 6211084) a promíchali.

GKCH agar (Agarová půda s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem)

36 g půdy (firma IMUNA, č.š. 290395) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Mueller - Hinton agar (s krví)

38 g základu pro MH agar (firma Oxoid, č.š. 389630) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Při přípravě MH agaru s krví jsme po ochlazení na 50 - 60 °C přidali 7 % defibrinované beraní krve (firma LabMediaServis).

Takto připravené půdy jsme po ochlazení na 50 - 60 °C rozlévali do připravených vysterilizovaných skleněných Petriho misek do výšky 4 mm a skladovali v chladničce při 8 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

Hajnova půda

65 g půdy (firma HiMedia, č.š. 15811) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Půdu ochlazenou na 70 °C jsme dávkovali do sterilních zkumavek a nechali šikmo chladnout (30 °).

BHI bujón

37 g půdy (firma AES Laboratoire, č.š. 708001B) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Půdu ochlazenou na 30 °C jsme dávkovali do sterilních zkumavek.

Živný bujón č.2

25 g půdy (firma HiMedia, č.š. 37392) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Půdu ochlazenou na 30 °C jsme dávkovali do sterilních zkumavek.

Mueller - Hinton bujón

21 g základu pro MH bujón (firma HiMedia, č.š. 40943) jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Půdu ochlazenou na 30 °C jsme dávkovali do sterilních zkumavek.

Takto připravené půdy jsme skladovali v chladničce při 8 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

3.1.2 Roztoky

- Fyziologický roztok - 0,85% roztok NaCl

3.1.3 Použitá ATB

- Disková difúzní metoda:

Ampicillin (AMP) - 10 µg od firmy Oxoid, č.š. 400155

Tetracyclin (TE) - 30 µg od firmy Oxoid, č.š. 447329

Gentamicin (CN) - 30 µg od firmy Oxoid, č.š. 453266

Sulfamethoxazole 1,25 µg + Trimethoprim 23,75 µg (SXT) od firmy Oxoid, č.š. 221246

- Diluční metoda:

Příprava zásobního roztoku AMP: Do lahvičky AMP (firma BIOTIKA, č.š. 0605005) o obsahu 1 g účinné látky jsme přidali 5 ml redestilované vody (koncentrace 200 mg/ml).

3.1.4 Přístroje a pomůcky

Přístroje: Horkovzdušný sterilizátor (BMT, Sterimat), autokláv (BMT, Sterilab), lednice (AEG Elektrolux), termostat (BT120MR), termostat s 5 % CO₂ (SalvisLab, BC170), vodní lázeň (Memmert), digitální váhy (Kern 440-43), pH metr (Hanna, pH210), plynový kahan.

Pomůcky: Pipety, špičky, skleněné Petriho misky, zkumavky, stojánky na zkumavky, zátky na zkumavky, bakteriologické kličky, sterilní plastové bakteriologické kličky kalibrované na 1 µl (firma Aptaca), odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, ependorfky.

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Testované půdy

Půdy, které jsme podrobili testu kvality, byly vyrobeny ve firmě LabMediaServis s.r.o. Dvůr Králové. Každé balení z jedné šarže půd obsahovalo deset misek s kultivačním médiem uzavřených v neporušeném obalu. Každá miska (z plastu Ø 90 mm) byla na štítku popsána názvem půdy, číslem šarže, datem rozplnění a datem expirace.

3.2.2 Fyzikální vlastnosti kultivačních půd

Nejprve jsme provedli vizuální kontrolu půdy a zaznamenali do protokolu barvu, čírost, konzistenci, tloušťku půdy (u tekutých půd množství v bakteriologické zkumavce) a případné závady.

Poté jsme změřili pH jedné půdy z každé šarže pH - metrem po kalibraci standardními pufrů (pufrů o pH 4,01 a 7,02).

Z každé šarže testovaných půd jsme tři půdy bez inokula inkubovali 24 hodin při 37 °C, aerobně. Druhý den jsme zapsali případnou mikrobiální kontaminaci. Takto jsme kontrolovali sterilitu půd.

3.2.3 Metody zkoušení výkonnosti kultivačních půd

Před vlastním zkoušením výkonnosti testovaných půd jsme nejprve oživilí kontrolní bakteriální kmeny přeočkováním těchto kmenů na čerstvý krevní agar. Po inkubaci 24 hodin při 37 °C, aerobně jsme kultury použili pro přípravu příslušné suspenze pro vlastní testování výkonnosti půd.

3.2.3.1 Agarové půdy

Pro zkoušení agarových půd jsme používali semikvantitativní ekometrickou metodu - 2. modifikaci (viz 2.5.1.2).

Nejprve jsme z čerstvé pracovní kultury připravili 2 ml suspenze bakteriálních buněk ve fyziologickém roztoku odpovídající zákalu 0,5 stupně McFarlanda. Tato hustota by měla odpovídat 10^8 CFU/ml. Tuto suspenzi jsme připravili jak pro cílový (mikroorganismus, který na půdě roste dobře) tak necílový (mikroorganismus, pro který není půda určena a tudíž na půdě roste špatně nebo je zcela inhibován) testovací mikroorganismus.

Inokulaci jsme prováděli ve třech kopiích suspenzí cílového mikroorganismu (3 misky testované a tři misky srovnávacích půd) a v jedné kopii suspenzí necílového mikroorganismu (jedna miska testované a jedna miska srovnávací půdy). Při testování výkonnosti neselektivních půd jsme používali pouze cílový testovací mikroorganismus (inokulaci jsme prováděli také ve třech kopiích).

K očkování inokula jsme použili kalibrovanou kličku o objemu 1 μl . V sektoru A jsme naočkovali čtyři rovnoběžné čáry vzdálené od sebe asi 0,5 cm. Pro každý další sektor jsme použili novou sterilní kličku. Rozočkování jsme dále prováděli v sektorech B a C a ukončili v sektoru D jednou souvislou klikatou čarou (viz 2.5.1.2 Schéma 3).

Po inkubaci 24 hodin při 37 °C (platí pro většinu půd) jsme posuzovali vzhled kolonií, zaznamenali růstový index a spočítali počet kolonií jak na testovaných, tak na srovnávacích půdách a vypočítali hodnotu produktivity (viz 2.5).

3.2.3.2 Tekuté půdy

Pro zkoušení tekutých půd jsme používali kvantitativní metodu (viz 2.5.2.1).

Nejprve jsme z pracovní kultury připravili 2 ml suspenze o hustotě buněk 100 CFU pro cílový mikroorganismus a dále 2 ml suspenze o hustotě buněk 10^8 CFU pro necílový mikroorganismus.

Cílový mikroorganismus jsme naočkovali do tří testovaných a tří srovnávacích půd v bakteriologických zkumavkách (100 μl bakteriální suspenze na 1 ml půdy). Pro testování selektivních půd jsme ještě naočkovali suspenzi necílového mikroorganismu do jedné zkoušené a jedné srovnávací půdy (opět 100 μl bakteriální suspenze na 1 ml půdy).

Po inkubaci (většinou 24 hod při 37 °C, aerobně) jsme z každé testované a srovnávací tekuté půdy odebrali 1 μl a rozočkovali na povrch krevních agarů ekometrickou metodou - 2. modifikace (viz 3.2.3.1 Agarové půdy).

Po inkubaci 24 hodin při 37 °C jsme posuzovali vzhled kolonií, zaznamenali růstový index a zaznamenali počet kolonií na všech krevních agarech z nichž jsme následně vypočítali hodnotu produktivity.

3.2.3.3 Půdy k testování citlivosti na ATB

Disková difúzní metoda: Nejprve jsme z pracovní kultury *Escherichia coli* připravili suspenzi o hustotě buněk srovnatelné s 0,5 stupni McFarlanda. Na jednotlivá agarová média v Petriho miskách (opět tři půdy testované a tři srovnávací) jsme napipetovali 2 ml suspenze,

nechali rovnoměrně rozlít po misce, a následně slili do dezinfekce. Poté jsme pomocí dávkovače antibiotik položili čtyři disky s testovanými ATB (AMP, TE, CN a SXT).

Po inkubaci 24 hodin při 37 °C jsme pomocí pravítka změřili inhibiční zóny na všech testovaných i srovnávacích půdách.

Tabulka 27 Tabulkové průměry inhibičních zón vybraných ATB (Kumari et Bhatia, 2003).

Použitá ATB	<i>E. coli</i> [mm]
Ampicillin (AMP) - 10 µg	16 - 22
Tetracyclin (TE) - 30 µg	18 - 25
Gentamicin (CN) - 10 µg*	19 - 26
Sulfamethoxazole 1,25 µg + Trimethoprim 23,75 µg (SXT)	24 - 32

Legenda:

*my jsme pracovali s CN - 30 µg

Diluční metoda: Ze zásobního roztoku AMP (200 000 mg/l) jsme ředěním redestilovanou vodou připravili roztok AMP o koncentraci 640 mg/l.

Ze zásobního roztoku AMP (640 mg/l) jsme postupným ředěním připravili řadu zkumavek s klesající koncentrací AMP: 32, 16, 8, 4, 2 a 1 mg/l, tak aby výsledný objem ve zkumavkách byl 1 ml. Také jsme připravili kontrolní zkumavku, která obsahovala pouze MH bujón. Do každé zkumavky jsme napipetovali 100 µl suspenze *Escherichia coli* o hustotě 10⁸ CFU.

Tento postup jsme provedli i pro srovnávací půdu.

Po inkubaci 24 hodin při 37 °C jsme zaznamenali minimální inhibiční koncentraci u půdy testované i srovnávací.

4 VÝSLEDKY

Celkem jsme otestovali 46 šarží 27 různých druhů půd. Z toho 18 šarží půd bylo neselektivních, 2 šarže selektivních, 18 selektivně - diagnostických, 7 šarží půd k testování citlivosti na ATB a 1 šarže půdy diagnostické (do této skupiny bychom mohli zařadit i šarže Krevního agaru, které jsme započítali do půd neselektivních).

Tabulka 28 Přehled neselektivních testovaných půd, srovnávacích půd a testovacích mikroorganismů.

Půdy	Funkce	Inkubace	Kontrolní kmeny	Srovnávací půdy
Krevní agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	Krevní agar
Trypton sojový agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	Trypton sojový agar
GTK agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GTK agar
<i>Haemophilus</i> Test Medium	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Haemophilus influenzae</i> CCM 4456	HTM
BHI bujón	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	BHI bujón
Živný bujón	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis CCM 4420	Živný bujón

Legenda:

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms; HTM - *Haemophilus* Test Medium

Tabulka 29 Přehled selektivně - diagnostických testovaných půd, srovnávacích půd a testovacích mikroorganismů.

Půdy	Funkce	Inkubace	Kontrolní kmeny	Srovnávací půdy
Deoxycholát - citrátový agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis CCM 4420	Deoxycholát - citrátový agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
MacConkey agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis CCM 4420	MacConkey agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
Endův agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis CCM 4420	Endův agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	

Půdy	Funkce	Inkubace	Kontrolní kmeny	Srovnávací půdy
Violet Red Bile Lactose agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	VRBL agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
Tergitolový agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	Tergitol
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
Slanetz - Bartley agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	Slanetz -Bartley agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
Bile Esculin Azid agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	Bile Esculin Azid agar
	S _E	N	N	
Perfringens agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C, anaerobně	<i>Clostridium perfringens</i> CCM 4991	Perfringens agar
	S _E	24 h/37 °C, anaerobně	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
<i>Pseudomonas</i> agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	<i>Pseudomonas</i> agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
Agar s lidskou krví	G _i , P _R , S _P	48 h/37 °C v atmosféře s 5 % CO ₂	<i>Gardnerella vaginalis</i>	V agar
	S _E	48 h/37 °C v atmosféře s 5 % CO ₂	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
MMGA	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	MMGA
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
<i>Enterobacter sakazakii</i> agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Enterobacter sakazakii</i> CCM 1902	<i>Enterobacter sakazakii</i> agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
HiCrome <i>Escherichia coli</i> agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	HiCrome <i>Escherichia coli</i> agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
HiCrome <i>Candida</i> agar	G _i , P _R , S _P	48 h/37 °C	<i>Candida albicans</i>	HiCrome <i>Candida</i> agar
	S _E	48 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	

Legenda:

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; S_E - selektivita; CCM - Czech collection of Microorganisms; N - netestováno; MMGA - Mineral Modify Glutamate agar; VRBL agar - Violet Red Bile Lactose agar

Tabulka 30 Přehled selektivních testovaných půd, srovnávacích půd a testovacích mikroorganismů.

Půdy	Funkce	Inkubace	Kontrolní kmeny	Srovnávací půdy
<i>Campylobacter</i> Agar Base	G _i , P _R , S _P	48 h/42 °C, anaerobně	<i>Campylobacter jejuni</i>	Karmaliho půda
	S _E	48 h/42 °C, anaerobně	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	
GKCH agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GKCH agar
	S _E	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	

Legenda:

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; S_E - selektivita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Tabulka 31 Přehled diagnostických testovaných půd, srovnávacích půd a testovacích mikroorganismů.

Půdy	Funkce	Inkubace	Kontrolní kmeny	Srovnávací půdy
Hajnova půda	S _P	24 h/37 °C	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis CCM 4420 + <i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	Hajnova půda
Krevní agar	G _i , P _R , S _P	24 h/37 °C	<i>Staphylococcus intermedius</i> CCM 5739	Krevní agar

Legenda:

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Tabulka 32 Přehled půd k testování citlivosti na ATB, srovnávacích půd a testovacích mikroorganismů.

Půdy	Funkce	Inkubace	Kontrolní kmeny	Srovnávací půdy
Mueller - Hinton agar	Stanovení citlivosti na ATB	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	Mueller - Hinton agar
Mueller - Hinton agar s krví	Stanovení citlivosti na ATB	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	Mueller - Hinton agar s krví
Mueller - Hinton bujón	Stanovení citlivosti na ATB	24 h/37 °C	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	Mueller - Hinton bujón

Legenda:

CCM - Czech collection of Microorganisms

Růstový index pro cílový mikroorganismus by měl dosahovat skóre nejméně 6. U neselektivních půd je G_i obvykle vyšší. Číselná hodnota míry produktivity neselektivní

půdy by měla být nejméně 0,7 pro mikroorganismy, které na půdě rostou dobře. Číselná hodnota P_R pro cílové mikroorganismy na selektivní půdě by měla být nejméně 0,1.

Při hodnocení selektivity na selektivních agarových půdách (semikvantitativní metoda) by měl být růst jiné než cílové kultury částečně nebo zcela inhibován.

U specificity jsme hodnotili základní charakteristiky testovaných mikroorganismů, velikost kolonií a jejich morfologií.

4.1 Výsledky testovaných šarží půd

4.1.1 Neselektivní půdy

Krevní agar

Tabulka 33 Výsledky testování kvality různých šarží Krevního agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G_i	P_R	S_p
277	7,7	červená	-	7	0,93	šedobílé kolonie; β_{\pm}/α - hemolýza
278	7,52	červená	-	7	0,95	šedobílé kolonie; β -/ α - hemolýza
397	7,52	hnědá	-	6	1,0	šedobílé kolonie; β/α hemolýza
398	7,4	červenohnědá	-	8	1,38	šedobílé kolonie; β/α hemolýza
399	7,5	hnědá	-	6,5	1,1	šedobílé kolonie; β/α hemolýza
400	7,53	hnědá	-	6,5	0,96	šedobílé kolonie; β/α hemolýza
495	7,65	červenohnědá	1 miska (1 kolonie)	7	1,43	šedobílé kolonie; β/α hemolýza
497	7,54	červenohnědá	-	7,5	1,5	šedobílé kolonie; β/α hemolýza
642	7,56	červená	-	6	0,97	šedobílé kolonie; β_{\pm}/α - hemolýza
654	7,39	červená	N	7	1,17	šedobílé kolonie; β_{\pm}/α - hemolýza
655	7,39	červená	1 miska (1 kolonie) - testována jedna miska	5,5	0,92	šedobílé kolonie; β_{\pm}/α - hemolýza
657	7,52	červená	-	7	1,17	šedobílé kolonie; β_{\pm}/α - hemolýza
823	7,33	červená	-	5,5	1,14	šedobílé kolonie; β/α hemolýza

Legenda:

Kontrolní kmen: *Staphylococcus intermedius* CCM 5739

Inkubace: 24 h/ 37 °C

* Očekávaná hodnota pH: $7,3 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; N - netestováno; α - - hemolýza α inhibována; β - - hemolýza β inhibována; β_{\pm} - hemolýza β velmi úzká; CCM - Czech collection of Microorganisms

U 6 testovaných šarží jsme zjistili závadu při vizuální kontrole (červenohnědé a hnědé zbarvení půd). Krevní agar č.š. 655 byl nesterilní (byla otestována pouze jedna půda). U 6 šarží testovaných půd jsme objevili závažné nedostatky při kontrole specificity (u jedné šarže KA byla hemolýza druhu *S. intermedius* inhibována úplně a u 5 dalších šarží byla α hemolýza inhibována úplně a β hemolýza byla velmi úzká). Na srovnávacích půdách byla hemolýza druhu *S. intermedius* typická (β/α hemolýza).

Z důvodu malého počtu testovaných půd jsme u šarže číslo 654 nemohli ověřit sterilitu.

Trypton sojový agar

Tabulka 34 Výsledky testování kvality šarže Trypton sojového agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G_i	P_R	S_P
702	7,2	světle žlutá	-	7,5	0,9	drobné šedobílé kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Staphylococcus intermedius* CCM 5739

Inkubace: 24 h/ 37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,3 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

GTK agar (Plate Count agar)

Tabulka 35 Výsledky testování kvality šarže GTK agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G_i	P_R	S_P
879	N	světle žlutá	N	0,5	0,4	bílé (nažloutlé) kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Saccharomyces cerevisiae*

Inkubace: 24 h/ 37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,0 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; N - netestováno; CCM - Czech collection of Microorganisms

Zjistili jsme nízký růstový index a nízkou hodnotu produktivity. Při testování této šarže půd jsme zvolili špatný testovací mikroorganismus (měli jsme použít *Staphylococcus intermedius* jako u ostatních neselektivních půd) a také špatnou dobu a teplotu kultivace (měla být 48 - 72 hodin při 30 ± 2 °C).

Z důvodu malého počtu testovaných půd jsme nemohli změřit pH a ověřit sterilitu.

Haemophilus Test Medium

Tabulka 36 Výsledky testování kvality šarže *Haemophilus Test Medium*.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
950	7,69	červenohnědá	1 miska (1 kolonie)	3	0,77	drobné šedé kolonie (viz Obrázek 1)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Haemophilus influenzae* CCM 4456

Inkubace: 24 h/ 37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,4 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je dostačující). Při testování této šarže jsme měli zvolit inkubaci 24 h/37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

U tohoto média by bylo lepší testovat citlivost na ATB.

BHI bujón

Tabulka 37 Výsledky testování kvality šarže BHI bujónu.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
981	N	žlutá	N	9	1,06	šedobílé kolonie; β/a hemolýza

Legenda:

Kontrolní kmen: *Staphylococcus aureus* CCM 5739

Inkubace: 24 h/ 37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,4 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; N - netestováno; CCM - Czech collection of Microorganisms

Z důvodu malého počtu testovaných půd jsme nemohli změřit pH a ověřit sterilitu.

Živný bujón**Tabulka 38** Výsledky testování kvality šarže Živného bujónu.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
974	7,54	světle žlutá	-	8	1,09	větší šedobílé kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis CCM 4420

Inkubace: 24 h/ 37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,3 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Hodnocení:

Otestovali jsme celkem 18 šarží neselektivních půd.

Z toho u 6 šarží testovaných půd jsme zjistili závadu při vizuální kontrole. Jedna otestovaná šarže byla nesterilní. U této šarže byla na bakteriální kontaminaci otestována pouze jedna půda. Dvě testované šarže půd vykazovaly nízký růstový index. U dalších 6 šarží jsme objevili závažné nedostatky při kontrole specificity.

Sterilita nebyla z důvodu malého počtu půd ověřena u 3 šarží a u 2 šarží nebylo změřeno pH.

4.1.2 Selektivně - diagnostické půdy**Deoxycholát - citrátový agar****Tabulka 39** Výsledky testování kvality různých šarží Deoxycholát - citrátového agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
275	7,81	lososovitá	-	5	0,97	bezbarvé kolonie s černým středem (produkce H ₂ S); kolem kolonií projasnění
493	7,67	lososovitá	-	4	1,56	bezbarvé kolonie s černým středem (produkce H ₂ S); kolem kolonií projasnění

Legenda:

Kontrolní kmen: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis CCM 4420

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,3 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testovaných půdách zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu těchto šarží.

Zjistili jsme nízký růstový index u obou testovaných šarží, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacích mikroorganismů dobrý (hodnoty produktivit jsou dostačující).

MacConkey agar

Tabulka 40 Výsledky testování kvality šarže MacConkey agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
267	7,19	růžovofialová	-	4	0,56	bezbarvé kolonie; kolem kolonií projasnění

Legenda:

Kontrolní kmen: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis CCM 4420

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,1 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je dostačující).

Endův agar

Tabulka 41 Výsledky testování kvality různých šarží Endova agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
501	7,58	světle růžová	-	7	0,86	bezbarvé kolonie
643	7,43	světle růžová	N	8	1,0	bezbarvé kolonie
663	7,59	světle růžová	-	5,5	0,71	bezbarvé kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis CCM 4420

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,3 ± 0,1

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; N - netestováno; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testovaných půdách zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu těchto šarží.

Z důvodu malého počtu testovaných půd jsme u šarže číslo 643 nemohli ověřit sterilitu.

Violet Red Bile Lactose agar

Tabulka 42 Výsledky testování kvality šarže Violet Red Bile Lactose agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
881	7,53	růžovofialová	-	3	0,66	fialové kolonie; fialový precipitát kolem kolonií (viz Obrázek 2)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,4 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je dostačující).

Tergitolový agar

Tabulka 43 Výsledky testování kvality šarže Tergitolového agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
877	7,13	světle zelená	-	2,5	0,79	žlutooranžové kolonie; půda kolem kolonií projasněná (viz Obrázek 3)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,2 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je vysoká).

Slanetz - Bartley agar

Tabulka 44 Výsledky testování kvality různých šarží Slanetz - Bartley agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
697	7,27	světle žlutá	-	7	0,9	temně červené kolonie (viz Obrázek 4)
958	7,68	světle žlutá; měkký jemně zakalený agar	-	5,5	1,32	temně červené kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,2 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testovaných půdách zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu těchto šarží.

Zjistili jsme, že půdy u šarže číslo 958 byly hodně měkké a jemně zakalené.

Bile Esculin Azid agar

Tabulka 45 Výsledky testování kvality šarže Bile Esculin Azid agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
698	7,43	žlutá	-	4	0,89	šedé kolonie s tmavě hnědým haló (hydrolýza eskulinu) (viz Obrázek 5)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,1 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; N - netestováno; CCM - Czech collection of Microorganisms

U této šarže jsme neotestovali selektivitu.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je vysoká).

Perfringens agar

Tabulka 46 Výsledky testování kvality šarže Perfringens agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
696	7,8	světle žlutá	-	4,5	1,08	drobné bezbarvé kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Clostridium perfringens* CCM 4991

Inkubace: 24 h/37 °C, anaerobně

*Očekávaná hodnota pH: 7,3 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Na Perfringens agaru jsme měli pozorovat černé kolonie. Nám ovšem narostly bezbarvé kolonie a ty jsme pozorovali také na srovnávací půdě.

Dále jsme zjistili nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je vysoká).

Pseudomonas agar

Tabulka 47 Výsledky testování kvality šarže Pseudomonas agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
695	7,47	světle žlutá	-	9,5	2,15	velké temně zelené kolonie; půda kolem kolonií zbarvena do stejného odstínu (viz Obrázek 6)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,1 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Agar s lidskou krví**Tabulka 48** Výsledky testování kvality šarže V agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
1014	7,01	červená	-	6,5	9,96	drobné šedé kolonie obklopené zónou hemolýzy

Legenda:

Kontrolní kmen: *Gardnerella vaginalis*

Inkubace: 24 h/37 °C v atmosféře s 5 % CO₂

*Očekávaná hodnota pH: 7,4 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Při přípravě srovnávací půdy jsme suplement A nahradili kvasničným extraktem a koňským sérem (na srovnávací půdě druh *Gardnerella vaginalis* téměř nenarostl).

Mineral Modify Glutamate agar**Tabulka 49** Výsledky testování kvality šarže Mineral Modify Glutamate agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
706	6,5	bezbarvá; jemně zakalený agar	-	4	1,14	drobné krémové kolonie (viz Obrázek 7)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 6,7 ± 0,1

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je vysoká).

Tato půda by měla sloužit pouze k oživení oslabených bakteriálních buněk *Escherichia coli* (čtyřhodinová inkubace při 37 °C).

Při vizuální kontrole jsme odhalili jemné zakalení půd.

Enterobacter sakazakii agar**Tabulka 50** Výsledky testování kvality šarže *Enterobacter sakazakii* agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
700	7,18	světle fialová	-	7	1,07	velké modrozelené kolonie (viz Obrázek 8)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Enterobacter sakazakii* CCM 1902

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,3 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

HiCrome Escherichia coli agar**Tabulka 51** Výsledky testování kvality šarže HiCrome *Escherichia coli* agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
705	7,4	světle žlutá	-	4	1,14	modrozelené kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,2 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je vysoká).

HiCrome Candida agar**Tabulka 52** Výsledky testování kvality šarže HiCrome *Candida* agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
962	6,78	světle žlutá; jemně zakalené médium	-	0,3	0,33	modré kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Candida albicans*

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,2 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je dostačující). Při kultivaci jsme zvolili krátkou dobu inkubace (měla být 2 dny).

Zjistili jsme, že půdy byly jemně zakalené. Také hodnota pH testovaných půd se lišila od očekávané hodnoty.

Hodnocení:

Otestovali jsme celkem 18 šarží selektivně - diagnostických půd.

U 3 šarží půd jsme zjistili drobné závady při vizuální kontrole. Nízký růstový index jsme zjistili u 10 testovaných šarží selektivně - diagnostických půd, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacích mikroorganismů dobrý. Testované půdy šarže *Perfringens* agarů vykazovaly závažné nedostatky při kontrole specificity. Hodnota naměřeného pH se výrazně lišila od očekávané hodnoty u jedné šarže.

Jedna šarže nebyla otestována na selektivitu a u další šarže jsme neověřili sterilitu.

4.1.3 Selektivní půdy

Campylobacter Agar Base (KARMALI)

Tabulka 53 Výsledky testování kvality šarže *Campylobacter* Agar Base.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
902	7,59	černá	-	5	0,81	velmi drobné šedé kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Campylobacter jejuni*

Inkubace: 24 h/37 °C, anaerobně

*Očekávaná hodnota pH: $7,4 \pm 0,2$

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý. Při kultivaci jsme zvolili krátkou dobu inkubace (měla být 2 dny).

GKCH agar

Tabulka 54 Výsledky testování kvality šarže GKCH agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	G _i	P _R	S _P
880	6,51	světle žlutá	-	0,5	0,57	velké bílé (nažloutlé) kolonie

Legenda:

Kontrolní kmen: *Saccharomyces cerevisiae*

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 6,6 ± 0,2

G_i - růstový index; P_R - hodnota produktivity; S_P - specificita

Růst *Staphylococcus intermedius* CCM 5739 byl na testované půdě zcela inhibován, a tím jsme ověřili selektivitu této šarže.

Zjistili jsme nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacího mikroorganismu dobrý (hodnota produktivity je dostačující). Při testování této půdy jsme špatně zvolili teplotu kultivace (měla být 25 °C) i dobu inkubace (měla být 5 dní).

Hodnocení:

Otestovali jsme 2 šarže selektivních půd.

U obou šarží půd jsme zjistili nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacích mikroorganismů dobrý.

4.1.4 Diagnostické půdy

Do této skupiny bychom mohli zařadit i šarže Krevního agaru (my jsme je zařadili do půd neselektivních) vzhledem k možnosti diagnostikovat na nich hemolytické schopnosti mikrobů.

Hajnova půda (šikmý agar)**Tabulka 55** Výsledky testování kvality šarže Hajnovy půdy.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	Kontrolní kmen	Sp
982	7,59	červená	-	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	drobné lesklé kolonie s černým středem (produkce H ₂ S); celé médium zčernalo (produkce H ₂ S), ale vrchní část zružověla (alkalizace)
				<i>Staphylococcus intermedius</i>	drobné bílé kolonie; celé médium zežloutlo (zkvašování sacharidů)

Legenda:

Kontrolní kmen: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis CCM 4420;

Staphylococcus intermedius CCM 5739

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: 7,5 ± 0,1

Sp - specificita; CCM - Czech collection of Microorganisms

Hodnocení:

Otestovali jsme 1 šarži diagnostických půd.

4.1.5 Půdy k testování citlivosti na ATB**Mueller - Hinton agar****Tabulka 56** Výsledky testování kvality šarže Mueller - Hinton agaru.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	ATB	<i>Escherichia coli</i> [mm]
265	7,3	světle žlutá	-	AMP	20
				TE	25
				CN (30µg)	24
				SXT	27
496	7,37	světle žlutá	-	AMP	20
				TE	24
				CN (30µg)	29
				SXT	32
621	7,09	světle žlutá	1 miska (1 kolonie)	AMP	19
				TE	25
				CN (30µg)	26
				SXT	29
640	7,6	světle žlutá	N	AMP	20
				TE	26
				CN (30µg)	26,5
				SXT	29,5

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,3 \pm 0,2$

ATB - antibiotika; N - netestováno; AMP - Ampicillin; TE - Tetracyclin; SXT - Sulfamethoxazole + Trimethoprim

Mueller - Hinton agar s krví

Tabulka 57 Výsledky testování kvality šarže Mueller - Hinton agaru s krví.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	ATB	<i>Escherichia coli</i> [mm]
260	7,49	červená	-	AMP	20
				TE	24
				CN (30µg)	29
				SXT	25
895	7,45	červená	-	AMP	16
				TE	18
				CN (30µg)	24
				SXT	23

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,3 \pm 0,1$

ATB - antibiotika; AMP - Ampicillin; TE - Tetracyclin; SXT - Sulfamethoxazole + Trimethoprim

Mueller - Hinton bujón

Tabulka 58 Výsledky testování kvality šarže Mueller - Hinton bujónu.

Číslo šarže	Naměřená hodnota pH*	Barva média	Mikrobiální kontaminace	ATB	MIC
1022	N	světle žlutá	1 zkumavka - testována 1 bakteriologická zkumavka	AMP	16 mg/l

Legenda:

Kontrolní kmen: *Escherichia coli* CCM 3954

Inkubace: 24 h/37 °C

*Očekávaná hodnota pH: $7,4 \pm 0,2$

ATB - antibiotika; AMP - Ampicillin; MIC - minimální inhibiční koncentrace; N - netestováno

U této šarže půd jsme zjistili nesterilitu (byl otestován pouze 1 bujón z důvodu malého počtu testovaných půd). Z důvodu malého počtu tekutých půd jsme nemohli změřit pH.

Hodnocení:

Otestovali jsme celkem 7 šarží půd k testování citlivosti na ATB.

U 1 šarže půd jsme neotestovali sterilitu, u 1 šarže půd jsme nezměřili pH a u 1 šarže půd jsme zjistili nesterilitu.

Celkové hodnocení:

Celkově jsme otestovali 46 šarží půd.

U 19,6 % testovaných šarží jsme zjistili závady při vizuální kontrole a u 17,9 % při kontrole specificity. Téměř 4,3 % šarží bylo nesterilních (byla otestována pouze jedna půda (bujón)). U 36,8 % testovaných půd jsme zjistili nízký růstový index, ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacích mikroorganismů dobrý (hodnoty produktivit byly dostačující až na šarži GTK agaru).

Hodnota naměřeného pH se výrazně lišila od očekávané hodnoty u 1 šarže půd.

U 10,9 % půd jsme neověřili sterilitu, u 6,5 % jsme nezměřili pH a u jedné šarže jsme neotestovali selektivitu.

5 DISKUZE A ZÁVĚR

U testovaných šarží půd, firmy LabMediaServis s.r.o., jsme prováděli jak kontrolu fyzikálních vlastností, tak zkoušku růstu mikroorganismů na těchto půdách.

Votava (2000) zahrnul mezi kontrolu fyzikálních vlastností půd kontrolu vzhledu půdy, její čírost a zbarvení, kontrolu pH půdy a kontrolu sterility.

Zjistili jsme, že u 19,6 % testovaných šarží půd byly závady při vizuální kontrole. Tyto nedostatky jsme pozorovali zejména u neselektivních půd, a to u krevních agarů (KA č.š. 397, KA č.š. 398, KA č.š. 399, KA č.š. 400, KA č.š. 495 a KA č.š. 497). Jednalo se o červenohnědé a hnědé zbarvení těchto půd. Důvodem ztmavnutí půdy by mohlo být vlití defibrinované beraní krve do příliš horkého média při přípravě.

U 3 šarží selektivně - diagnostických půd (Slanetz - Bartley č.š. 958, MMGA č.š. 706 a HiCrome *Candida* agar č.š. 962) jsme pozorovali jemné zakalení. Slanetz - Bartley agar č.š. 958 byl kromě zakalení ještě velmi měkký. Basu et al. (2005) uvedli, že měkkost média může být způsobena nadbytkem tepla, nízkým pH, nepřesným vážením, nerozpuštěním agaru nebo špatnou kvalitou dehydratované půdy.

Tyto závady ovšem neměly vliv na funkci testovaných půd.

Jelikož jsme pH u většiny agarových půd měřili elektrodou pH - metru určenou pro měření pH tekutých půd, brali jsme naměřené hodnoty pH u většiny šarží testovaných agarových půd spíše informativně a nezahrnovali jsme je do hodnocení jakosti půdy (naše naměřené hodnoty pH a očekávané hodnoty pH se u některých půd dosti lišily). pH tekutých kultivačních půd jsme do hodnocení jakosti zahrnuli.

Pouze u několika posledních testovaných šarží agarových půd jsme již použili vpichovou elektrodu pH - metru (KA č.š. 823, MH agar s krví č.š. 895, Tergitolový agar č.š. 877, VRBL agar č.š. 881, GKCH agar č.š. 880, HTM č.š. 950, Slanetz - Bartley agar č.š. 958, HiCrome *Candida* agar č.š. 962, *Campylobacter* Agar Base č.š. 902 a V agar č.š. 1014), a proto jsme u těchto půd mohli pH hodnotit.

U 6,5 % šarží jsme pH nezměřili z důvodu malého množství půd v šarži.

Hodnota naměřeného pH, z půd zahrnutých do hodnocení, se výrazně lišila od očekávané hodnoty u jedné šarže selektivně - diagnostických půd (šarže HiCrome *Candida*

agaru). Basu et al. (2005) zjistili, že nevhodné pH média může být důsledkem kontaminovaného skla, znečištěnou vodou, přehříváním nebo chemickou kontaminací.

Votava (2000) doporučil, aby se sterilita zkoušela u 5 % misek či zkumavek z každé šarže, a to většinou inkubací 24 - 48 hodin při 37 °C. V celé šarži by nemělo být kontaminováno více než 5 % výrobků.

My jsme sterilitu testovali u tří půd z každé šarže inkubací 24 hodin při 37 °C.

Zjistili jsme, že 4,3 % testovaných šarží bylo nesterilních (KA č.š. 655 a MH bujón č.š. 1022). Jelikož jsme zkoušeli pouze jednu půdu (bujón) z důvodu malého množství testovaných půd v šarži, nemohli jsme s určitostí říci, zda byla celá šarže kontaminovaná.

U 10,9 % půd jsme sterilitu neověřili vůbec (málo půd v testované šarži).

Charakter růstu mikroorganismů na kultivačních půdách je nejdůležitějším parametrem pro kontrolu kvality médií. Norma ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2 (2005) uvádí, že testování kvality půd může být prováděno kvantitativně, semikvantitativně nebo kvalitativně.

My jsme pro testování agarových půd zvolili semikvantitativní ekometrickou metodu. Pro hodnocení produktivity by nám tedy měl stačit zaznamenaný růstový index. Jelikož jsme ale při hodnocení půd používali srovnávací půdy, počítali jsme ještě hodnotu produktivity jako při kvantitativní metodě.

Andrews et al. (2004) doporučil, aby se pro semikvantitativní zkoušení produktivity agarových půd používalo inokulum obsahující 10^3 CFU až 10^4 CFU.

Při ověřování semikvantitativní metody jsme ovšem zjistili skutečnost, že abychom získali růstový index alespoň 6 pro naočkovaný mikroorganismus (jak je uvedeno v normě ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2 (2005)), musíme použít inokulum o hustotě 10^8 CFU. Proto jsme tuto hustotu používali po celou dobu testování nových šarží agarových půd.

Pro zkoušení selektivity jsme podle normy ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2 (2005) měli použít inokulum jiného než cílového mikroorganismu obsahující 10^4 CFU až 10^6 CFU. I zde jsme používali inokulum o hustotě 10^8 CFU.

Pro testování tekutých kultivačních půd jsme zvolili kvantitativní metodu. Při hodnocení produktivity jsme brali jako hlavní parametr spočítanou hodnotu produktivity.

Jelikož jsme po inkubaci mikroorganismů v tekutých testovaných půdách používali pro naočkování na neselektivní půdy ekometrickou techniku, hodnotili jsme také růstový index.

Andrews et al. (2004) doporučil, aby se pro zkoušení produktivity tekutých půd používalo inokulum obsahující 10 CFU až 100 CFU.

My jsme pro hodnocení produktivity používali inokulum obsahující 100 CFU.

Při testování selektivity tekutých kultivačních půd bychom měli použít inokulum o stejné hustotě jako pro agarové půdy. My jsme ale používali inokulum 10^8 CFU jako u testování selektivity agarových půd.

Téměř 36,8 % testovaných půd vykazovalo nízký růstový index. Do tohoto hodnocení jsme zahrnuli pouze 38 testovaných šarží, u kterých jsme hodnotili růstový index a produktivitu (růstový index a produktivitu jsme nehodnotili u diagnostických půd a u půd k testování citlivosti na ATB).

Tento jev jsme pozorovali u dvou šarží neselektivních půd (GTK agar č.š. 879 a HTM č.š. 950), u deseti šarží selektivně - diagnostických půd (DC agar č.š. 275, DC agar č.š. 493, MC agar č.š. 267, VRBL agar č.š. 881, Tergitolový agar č.š. 877, Bile Esculin Azid agar č.š. 698, Perfringens agar č.š. 696, MMGA č.š. 706, HiCrome *Escherichia coli* agar č.š. 705 a HiCrome *Candida* agar č.š. 962) a u obou testovaných šarží selektivních půd (*Campylobacter* Agar Base č.š. 902 a GKCH agar č.š. 880).

Jelikož jsme použili inokulum o hustotě vyšší než je doporučená, je zvláštní, že nám cílový mikroorganismus narostl v tak malém množství. Ale v porovnání růstu mikroorganismů na těchto testovaných půdách s růstem mikroorganismů na půdách srovnávacích jsme zjistili, že na testovaných půdách byl nárůst cílových mikroorganismů větší (hodnoty produktivit byly dostačující a splňovaly předepsaná kritéria). Podle normy ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Část 2 (2005) lze pro určité kombinace půd a testovacích mikroorganismů akceptovat méně přísná kritéria.

U obou testovaných šarží neselektivních půd jsme špatně zvolili podmínky kultivace.

Při testování GTK agaru jsme zjistili jak nízký růstový index, tak i nízkou hodnotu produktivity. Důvodem takto malého nárůstu by mohlo být špatné zvolení cílového mikroorganismu (měli jsme použít *Staphylococcus intermedius* jako u ostatních neselektivních půd) a také jsme špatně zvolili dobu a teplotu kultivace (měla být 48 - 72 hodin při 30 ± 2 °C).

U šarže *Haemophilus* Test Medium mohl být nízký růstový index způsoben nevhodnou inkubací. Inkubace měla probíhat 24 h/37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

U GKCH agaru mohl být nízký růstový index způsoben špatně zvolenou teplotou a dobou kultivace (měla být 5 dnů při 25 °C). Při testování šarže HiCrome *Candida* agaru jsme zase zvolili krátkou dobu inkubace (měla být 2 dny), což mohlo mít opět za následek nízký růstový index.

Mineral Modify Glutamate agar by měl sloužit pouze k oživení oslabených bakteriální buněk *E. coli*. Po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C, kdy většina bakterií je již oživených, by se pro růst bakterií měl zvolit selektivní Chromocult TBX agar. My jsme z hlediska kontroly růstu bakterií na půdách porovnávali růst na testovaných MMGA a na srovnávacích půdách (inkubace probíhala 24 hodin při 37 °C). I přes 24 hodinovou inkubaci jsme i zde zjistili nízký růstový index.

Basu et al. (2005) uvedli, že špatný růst může být důsledkem kontaminované vody nebo skla, nesprávným vážením, nedostatečným promícháním nebo nadbytkem tepla.

V našem případě je to ale dosti nepravděpodobné, jelikož se tento jev objevil u 36,8 % všech testovaných šarží půd.

Při testování selektivity u selektivních a selektivně - diagnostických šarží půd jsme jako necílový mikroorganismus zvolili *Staphylococcus intermedius* CCM 5739. I když jsme používali inokulum o hustotě 10⁸ CFU (tedy vyšší hustota inokula než je stanoveno), růst *Staphylococcus intermedius* byl na všech půdách zcela inhibován. A to i u tekutých kultivačních půd, kde jsme používali kvantitativní metodu. Z toho vyplývá, že selektivita byla potvrzena u všech testovaných půd.

U šarže Bile Esculin Azid agaru č.š. 698 jsme selektivitu neotestovali.

U 17,9 % testovaných šarží jsme zjistili závady při kontrole specificity. Do tohoto hodnocení jsme zahrnuli pouze 39 testovaných šarží, u kterých jsme hodnotili specificitu (specificitu jsme nehodnotili u půd k testování citlivosti na ATB).

Většina těchto závad se týkala neselektivních půd, přesněji krevních agarů. Jednalo se o inhibici hemolýzy druhu *Staphylococcus intermedius*, kde u jedné šarže byla hemolýza inhibována úplně (KA č.š. 278) a u 5 dalších šarží byla úplně inhibována α hemolýza a β hemolýza byla velmi úzká (KA č.š. 277, KA č.š. 642, KA č.š. 654, KA č.š. 655 a KA č.š. 657). Na srovnávacích půdách byla hemolýza druhu *Staphylococcus intermedius* typická

(β/α hemolýza). Z hlediska posuzování hemolýzy bychom měli šarže Krevního agaru řadit spíše mezi půdy diagnostické.

Další chybu při kontrole specifity jsme objevili u šarže, selektivně - diagnostické půdy, Perfringens agaru. Na Perfringens agaru jsme měli pozorovat černé kolonie druhu *Clostridium perfringens* (tento druh by měl produkovat sulfan). Nám ovšem narostli bezbarvé kolonie a ty jsme pozorovali také na srovnávacích půdách. Důvodem této chyby mohla být skutečnost, že jsme nepoužili předepsaný kontrolní kmen a námi použitý druh *Clostridium perfringens* neprodukoval sulfan.

Kontrolní kmeny jsme nepoužili také při testování GTK agaru, GKCH agaru, HiCrome *Candida* agaru, *Campylobacter* agaru a Agarů s lidskou krví.

U všech těchto jmenovaných půd (kromě Agarů s lidskou krví) jsme zaznamenali nízký růstový index, ale hodnoty produktivity byly dostačující.

Při testování šarže Agarů s lidskou krví byla hodnota růstového indexu v pořádku a hodnota produktivity byla velice vysoká ($P_R = 9,96$). Při přípravě srovnávací půdy jsme totiž suplement A nahradili kvasničným extraktem a koňským sérem a z tohoto důvodu druh *Gardnerella vaginalis* na srovnávací půdě téměř nenarostl.

Jones et al. (2003) ve studii v Ontáriu zjistili, že doporučení NCCLS (Národní výbor pro klinické laboratorní standardy) pro zajištění kvality nebylo vůbec dodrženo. Navíc zjistili, že doporučené kontrolní kmeny byly používány pouze polovinou zúčastněných laboratoří. Podíl tohoto jevu na všech médiích se pohyboval v rozmezí od 1,10 % do 9,87 %. Basu et al. (2005) uvedli následující důvody tohoto selhání: žádný růst (39,9 %), žádná inhibice (18,6 %), nesterilita (17,9 %), hemolýza (7,2 %) a povrchové vady (16,3 %).

Doporučené kontrolní kmeny jsme nepoužili u šesti výše jmenovaných šarží půd a z toho u pěti šarží jsme zjistili nízký růstový index a u jedné šarže jsme objevili závady při kontrole specifity. Z toho vyplývá, jak důležité je při kontrole kvality kultivačních médií používat kontrolní kmeny.

Jorgensen a Ferrari (1998) uvedli, že jedním z nejdůležitějších úkolů v mikrobiologické laboratoři je testování citlivosti významných bakteriálních kmenů na ATB.

My jsme citlivost na ATB otestovali u 7 šarží půd (4 šarže Mueller - Hinton agaru, 2 šarže Mueller - Hinton agaru s krví a 1 šarže Mueller - Hinton bujónu). U všech otestovaných půd jsme mohli potvrdit jakost.

Z výsledků uvedených v této studii vyplynulo, že u 36,8 % testovaných šarží půd jsme zjistili nízký růstový index. Tento jev se nejvíce objevil u selektivních a selektivně - diagnostických půd. Jelikož ale v porovnání se srovnávacími půdami byl nárůst testovacích mikroorganismů dobrý, mohli jsme u těchto půd jakost potvrdit.

U 19,6 % testovaných šarží jsme objevili závady při vizuální kontrole. Tyto chyby ovšem neovlivnily funkci půd a tudíž i u těchto šarží jsme mohli potvrdit jakost.

Nedostatky při kontrole specifity vykazovalo 17,9 % šarží půd. U těchto půd jsme jakost potvrdit nemohli vzhledem k negativnímu ovlivnění charakteristiky růstu cílových mikroorganismů.

U dalších 4,3 % půd jsme nepotvrdili sterilitu. Jelikož jsme otestovali pouze jednu půdu (bujón), nemůžeme spolehlivě zhodnotit kontaminaci celé šarže.

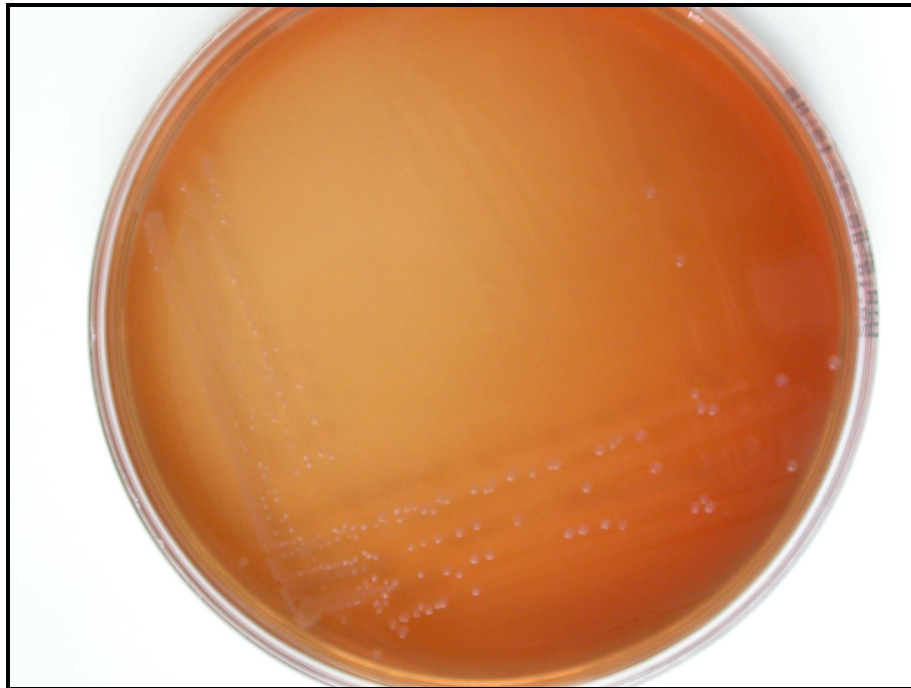
Taté jsme ověřili, jak důležité je používání kontrolních kmenů při testování kvality kultivačních médií.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá důležitost kontroly nových šarží kultivačních půd. Pro spolehlivost mikrobiologického vyšetření má totiž klíčový význam používání živných médií ověřené kvality, jejichž kontrolou lze zajistit, že informace podávané pracovníky mikrobiologických laboratoří jsou správné a spolehlivé.

Závěrem lze říci, že kultivační média dodávaná firmou LabMediServis s.r.o. splňují, až na malé nedostatky, nároky kladené na kvalitu kultivačních médií.

6 PŘÍLOHA

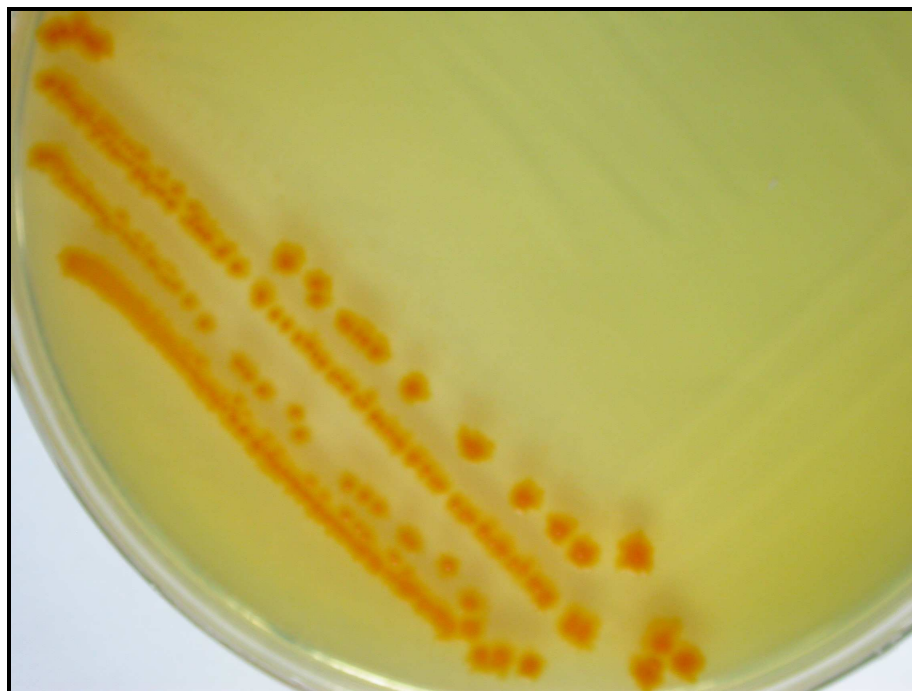
Obrázek 1: Růst *Haemophilus influenzae* na *Haemophilus* Test Medium



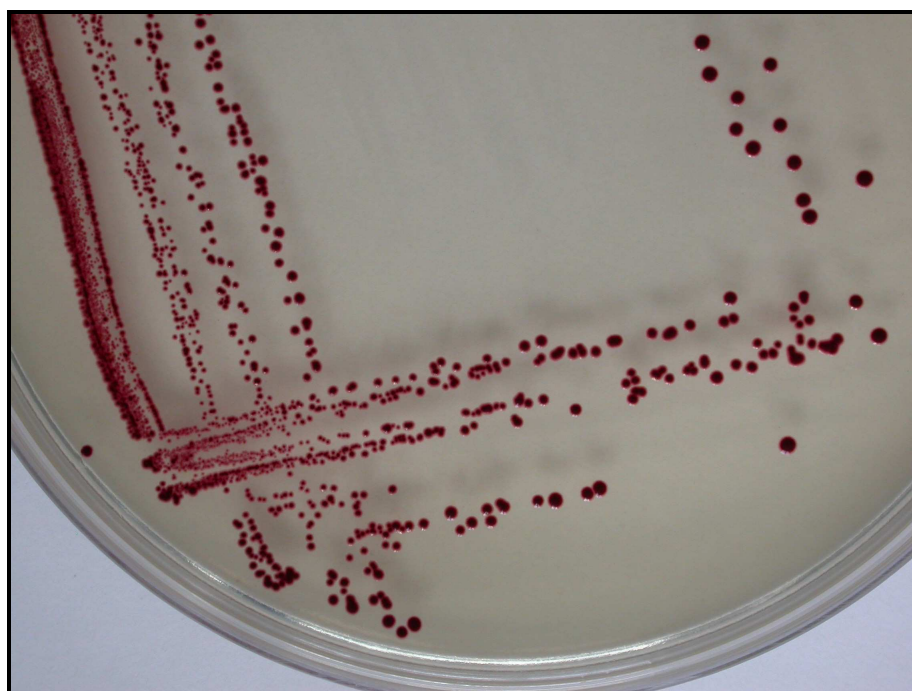
Obrázek 2: Růst *Escherichia coli* na Violet Red Bile Lactose agaru



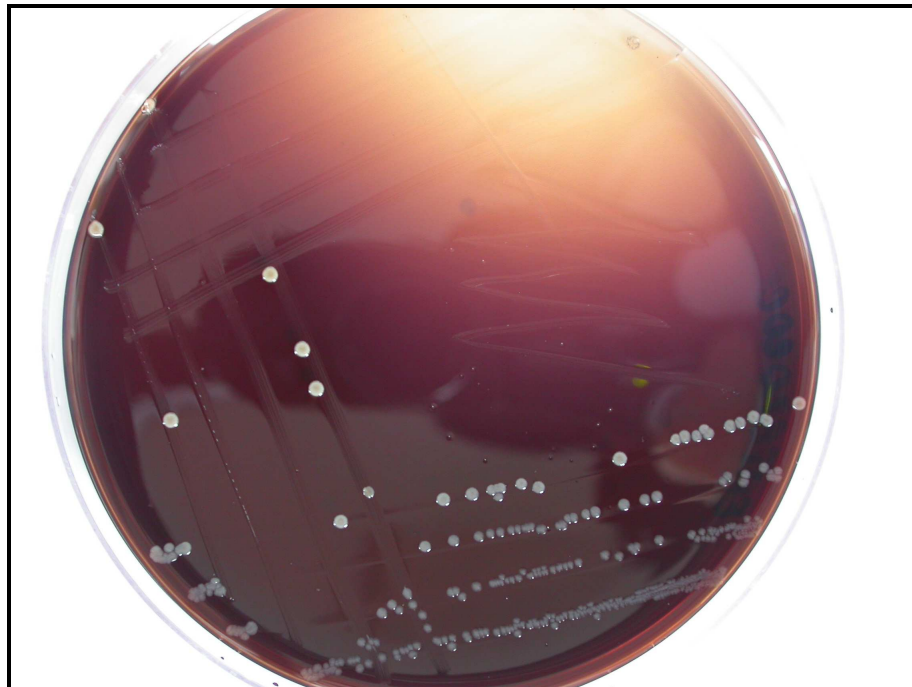
Obrázek 3: Růst *Escherichia coli* na Tergitolovém agaru



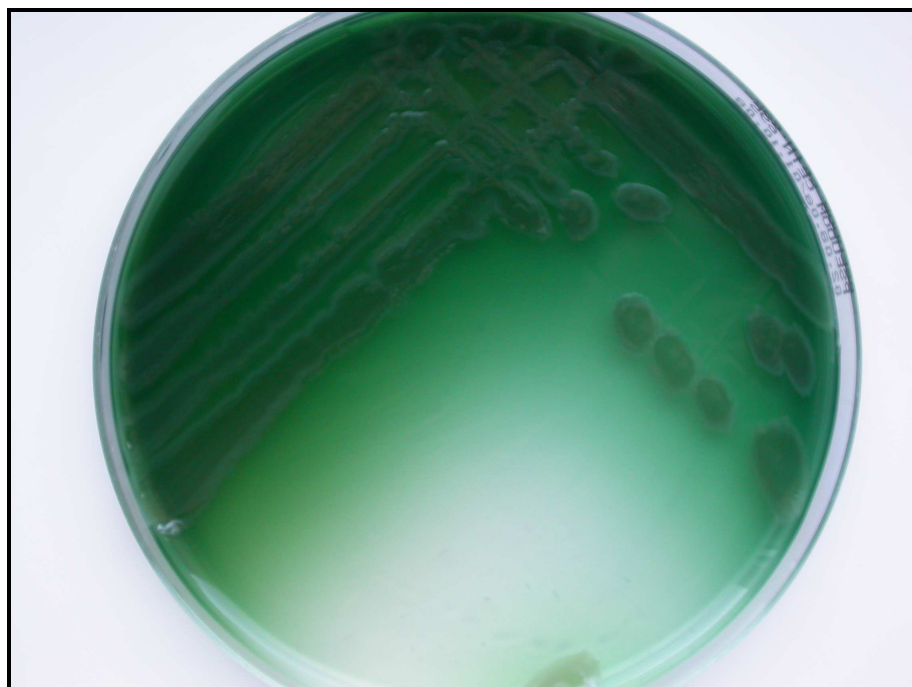
Obrázek 4: Růst *Enterococcus faecalis* na Slanetz - Bartley agaru



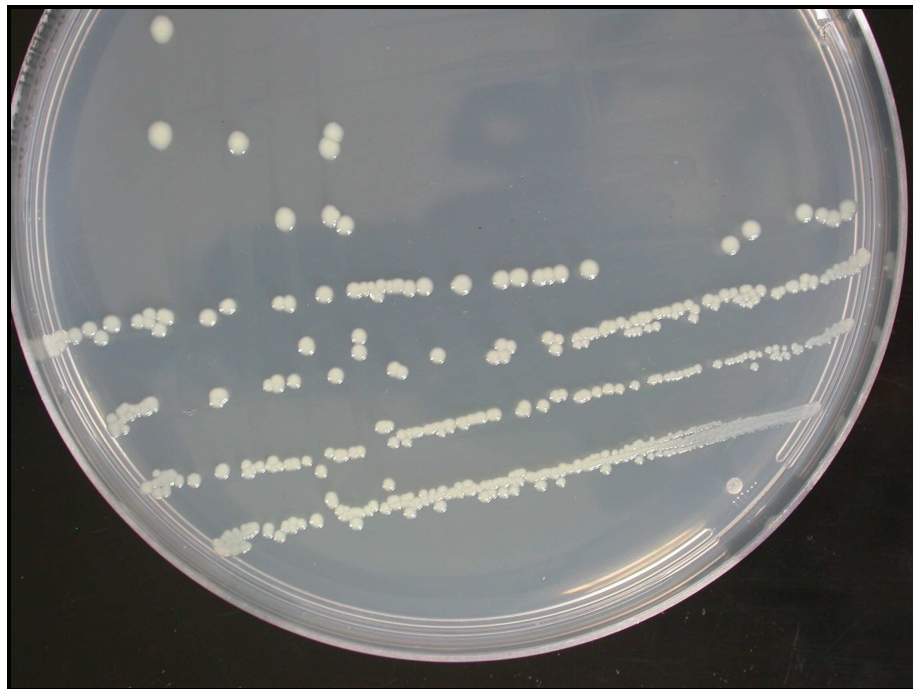
Obrázek 5: Růst *Enterococcus faecalis* na Bile Esculin Azid agaru



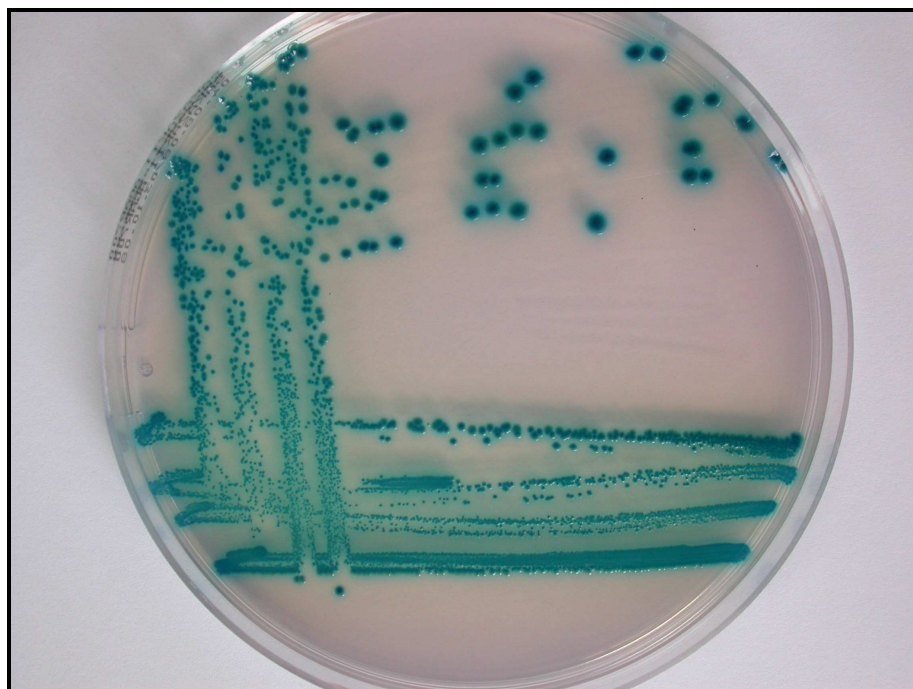
Obrázek 6: Růst *Pseudomonas aeruginosa* na *Pseudomonas* agaru



Obrázek 7: Růst *Escherichia coli* na Mineral Modify Glutamate agaru



Obrázek 8: Růst *Enterobacter sakazakii* na *Enterobacter sakazakii* agaru



7 SEZNAM LITERATURY

Andrews, S., Traynor, P., Scholtes, A., and *Water Microbiological Culture Media*. ASM, Melbourne, Australia, 2004.

Arghyros, M., Douglass, G., Löcher, M., Mugg, P., Myatt, D.C., Olma, T., Scholtes, A., Wilkinson, I. *Guidelines for Assuring Quality of Medical Microbiological Culture Media*. ASM, Melbourne, Australia, 1996. Anderson, J., Shepherd, N., Tan, A. *Guidelines for Assuring Quality of Food*

Arora, D.R. Quality Assurance in Microbiology. *Indian J Med Microbiol*, 2004, 22: s 81-86.

Atlas, R.M. *Handbook of Microbiological Media*. 3rd edition CRC Press, 2004.

Basu, S., Pal, A., Desai, P.K. Quality Control of Culture Media in a Microbiology Laboratory. *Indian J Med Microbiol*, 2005, 23: s 159-163.

Benešová, L., Burdová, M., Demnerová, K., Houšová, J., Chýleová, L., Kvasničková, A., Pohlová, M., Sedláčková, J., Suková, I. *Potravinářství 91*. Středisko potravinářských informací, Praha, 1992.

Bridson, E.Y. *Culture media*. The Oxoid Manual 9th Edition. OXOID England, Limited Hampshire, 2006: s 2-8.

Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. *Culture Media for Food Microbiology*. Elsevier Science, vol.37, 2003.

ČSN P CEN ISO/TS 11133-2 *Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné pokyny pro přípravu a výrobu kultivačních pŮd - Část 2: Pokyny pro zkoušení výkonnosti kultivačních pŮd v praxi*. 2005.

Donnelly, C.B., Gilchrist, J.E., Peeler, J.T., Campbell, J.E. Spiral Plate Count Method for the Examination of Raw and Pasteurized Milk. *Appl Environ Mikrobiol*, 1976, 32(1): s 21-27.

Frébortová, J. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta, 2008.

Ghelardi, E., Pichierri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A., Campa, M. Efficacy of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clinical Microbiology & Infection*, 2008, 14(2): s 141-147.

Jandová, B., Kotoučková, L. *Praktikum z mikrobiologie*. PřF, Brno, 1996.

Jones, R.N., Krisher, K., Bird, D.S. Results of the Survey of the Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiology Media. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, 127: s 661-5.

Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 1998, 26: s 973–980.

Kumari, S., Bhatia, R. *Quality assurance in Bacteriology and Immunology: Quality control in Antibiotic Susceptibility Testing*. 2nd edition, WHO Regional Publication, South-East Asia Series, New Delhi, 2003: s 147-148.

LabMediaServis s.r.o. *Katalog produktů*. Jaroměř, 2008.

Marková, V. *Vliv různých způsobů rozočkování vzorků na počet izolovaných kolonií mikrobů*. Bakalářská práce na lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Lékařská fakulta. 2008, 48 s. Vedoucí bakalářské práce MUDr. Ondřej Zahradníček.

Matějů, L. Stanovení indikátorových mikroorganismů pro mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě ve smyslu vyhlášky č.382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica číslo 7/2001*, Státní zdravotní ústav, Praha: s 6.

Mossel, D.D.A., Van Rossem, F., Koopmans, M., Hendriks, M., Verouden, M., Eelderink, I. Quality Control of Solid Culture Media: A Comparison of the Classic and the So-called Ecometric Technique. *Journal of Applied Bacteriology*, 1980, 49: s 439-454.

Mottl, J. Půdy a biochemické testy v diagnostice enterobakteriaceí. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica* 1978, příloha č.1. Státní zdravotní ústav, Praha.

Myrna, T., Mendoza, M.D. What's New in Antimicrobial Susceptibility Testing? *Phil J Microbiol Infect Dis*, 1998, 27(3): s 113-115.

Stadia, S., Barghothi, B.A. Microbiological Media. *Technical Bulletin*, 2002, 2(2).

Sutton, S. Quality Control of Microbiological Culture Media. *PMF Newsletter*, 2006, 12(1): s 2-5.

Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Katedra biologických a biochemických věd. *Laboratoř z mikrobiologie: Kultivační média*. Pardubice, 2006.

Votava, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1.vyd. Hortus, 2000.

Vysoká škola chemicko technologická v Praze. Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Ústav biochemie a mikrobiologie. *Laboratoř z mikrobiologie*.

Weenk, G.H., Brink, J., Meeuwissen, J., van Oudenallen, A., van Schievan, R.R. A Standard Protocol for Quality Control of Microbiology Media. *Int J Food Microbiol*, 1992, 17: s 183-98.

Elektronické zdroje

Acumedia. *TERGITOL 7 AGAR* (7187) [online]. 2004 [citováno 2009-02-23]. <http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7187_PI.pdf>.

Bazgerová, E., Látal, T. BHI bujón (MKM 06022). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2009b-02-15]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/06022.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. Columbia krevní agar (MKM 01011). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2009a-02-23]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/01011.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. DC agar (MKM 03013). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2009e-02-23]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/03013.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. Endo agar (MKM 03011). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2009d-02-23]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/03011.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. HTM agar (MKM 02013). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2009c-02-13]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/02013.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. Slanetz - Bartley agar (MKM 03041). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2009f-02-23]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/03041.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. GKCH (MKM 09029). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2008f-12-10]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/09029.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. GTK (MKM 10069). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2008a-12-05]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/10069.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. MacConkey agar (MKM 03012). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2008c-11-10]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/03012.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. Mueller Hinton agar (MKM 02011). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2008b-11-08]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/02011.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. *Pseudomonas* agar CN (MKM 04056). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2008e-12-03]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/04056.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. Žluč-eskulin-azid agar (MKM 04053). *TRIOS-MKMTM Manuál* [online]. [citováno 2008d-11-18]. <http://www.trios.cz/mkm_manual/04053.htm>.

Bazgerová, E., Látal, T. *Kontrola kvality ve vztahu ke kultivačním médiím* [online]. 2004 [citováno 2009-02-11]. <http://www.trios.cz/_sgg/me_1.htm>.

Benton, Dickinson and Company. *Haemophilus* Test Medium Agar. *BD Product Catalog* [online]. [citováno 2009a-02-13]. <[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007380\(06\)\(0207\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007380(06)(0207).pdf)>.

Benton, Dickinson and Company. V Agar. *BD Product Catalog* [online]. [citováno 2009b-02-23]. <[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007425\(06\)\(0506\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007425(06)(0506).pdf)>.

Benton, Dickinson and Company. Mueller Hinton Agar. *BD Product Catalog* [online]. [citováno 2008-11-08]. <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Mueller_Hinton_Agars.pdf>.

Biolife Italiana Srl. *MINERALS MODIFIED MEDIUM BASE (MMGM)* [online]. 2006 [citováno 2009-04-20]. <<http://www.biolifeit.com/biolife/upload/file/Schede/TS-401737.PDF>>.

BioVendor. *Slanetz Bartley agar* [online]. Brno, 2008 [citováno 2008-11-19]. <http://lm.biovendor.cz/download.php?file=S:%5CBIOVENDOR%20BVLM%20DATAB%C3%81ZE%5CBioVendor-Laboratorn%C3%AD%20medic%C3%ADna%5CKultiva%C4%8Dn%C3%AD%20p%C5%AFdy%20tuh%C3%A9%20%20agary%5CP%C5%99%C3%ADbalov%C3%BD%20let%C3%A1k%20CZ%5CCZ%20PL%20SB.pdf&_full_path=1>.

Ellner et al. Columbia Blood Agar Base. *EMD* [online]. 1996 [citováno 2008-11-08]. <http://www.emdchemicals.com/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1_10455_0500_5000.html#composition>.

Hardy Diagnostics. *MacConkey Agar* [online]. 2002 [citováno 2008-11-10]. <<https://www.hardydiagnostics.com/catalog/hugo/MacConkeyAgar.htm>>.

Health Protection Agency. *Pseudomonas selective agar* [online]. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, 2005 [citováno 2008-12-03]. <<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/msop/pdf/msop8.pdf>>.

HiMedia Laboratoires. *AGAR HICROME CANDIDA* [online]. [citováno 2009b-04-11]. <<http://www.himedialabs.com.br/produtos/detail.asp?iPic=372&iType=37>>.

HiMedia Laboratoires. *HiCrome - Single Streak Rapid Differentiation Series: HiCrome Agar E. coli* [online]. 2009a [citováno 2009-04-10]. <http://www.himedialabs.com/ad_HiCrome.aspx>.

IMUNA PHARM a.s. *AGAR PODĚA HAJNA* [online]. 2007c [citováno 2009-02-13]. <<http://www.imuna.sk/sk/produkt.php?c=38&b=2>>.

IMUNA PHARM a.s. *GKCH AGAR* [online]. 2007b [citováno 2008-12-10]. <<http://www.imuna.sk/sk/produkt.php?c=48&b=2>>.

IMUNA PHARM a. s. *Živný bujón č.2* [online]. 2007a [citováno 2009-03-16]. <<http://www.imuna.sk/sk/produkt.php?c=108&b=2>>.

Lab M. Perfringens Agar. *Lab M Manual* [online]. 2006 [citováno 2008-11-18]: s 142. <http://www.labm.com/technical_zone_media_manual.htm>.

Laboratoires CONDA. Bile Esculin Azide Agar ISO 7899-2:2000. *Product catalog* [online]. 1960b [citováno 2008-11-18]. <<http://www.condalab.com/pdf/1005.pdf>>.

Laboratoires CONDA. Violet Red Bile Agar with Lactose (VRBL) ISO 4832. *Product catalog* [online]. 1960a [citováno 2008-11-15]. <<http://www.condalab.com/pdf/1093.pdf>>.

Laboratory procedure manuals: Quality control [online]. [citováno 2008-09-08]. <<http://www.doctorfungus.org/thelabor/sec15.pdf>>.

Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. *Doporučené kontrolní kmeny pro testování médií* [online]. Brno, 2007 [citováno 2008-11-08]. <<http://www.sci.muni.cz/ccm/down/media.pdf>>.

Mast Diagnostics. *Nutriet Broth* [online]. 2008 [citováno 2009-03-16]. <http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU339_GB.pdf>.

Merck spol. s.r.o. *MUELLER-HINTON bujón* [online]. [citováno 2009-02-15]. <http://www.merck.cz/data/navodypdf_micro/105437.pdf>.

Merck. *MMGA - Merck's New Complete Medium for Resuscitation of Sublethally Injured E.coli* [online]. 2006 [citováno 2009-04-03]. <<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1054h3.php>>.

Merck. Mineral-modified glutamate agar (MMGA) acc. to ISO 16649. *Merck Microbiological Manual 12th Edition* [online]. [citováno 2008-12-13]. <http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/MMGA_Agar_109045_engl.pdf>.

Microbiological methods [online]. [citováno 2008-10-13]. <<http://www.microbiologyprocedure.com/microbiological-methods/microbiological-methods.htm>>.

Oxid. *Violet Red Bile Lactose Agar* [online]. [citováno 2009-04-12]. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0968&org=71&c=UK&lang=EN>.

Oxid. *Campylobacter Agar Base (KARMALI)* [online]. [citováno 2008c-12-03]. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0935&org=154&c=UK&lang=EN>.

Oxid. *Enterobacter sakazakii Agar* [online]. [citováno 2008b-11-18]. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1055&org=66&c=UK&lang=EN>.

Oxid. *Minerals Modified Medium Base (sodium glutamate LP0124)* [online]. [citováno 2008a-12-13]. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0607&org=154&c=UK&lang=EN>.

PLM Microbiologicals. *VAGINALIS AGAR (V AGAR)*. [online]. 2001 [citováno 2009-02-23]. <<http://www.pmlmicro.com/assets/TDS/805.pdf>>.

Říhová, Ambrožová, J. Metoda MPN. *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [citováno 2008-09-01]. <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=M013>.

Sigma - Aldrich. 92324 *Enterobacter sakazakii* HiChrome Agar [online]. 2009a [citováno 2009-03-23]. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=92324|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC>.

Sigma - Aldrich. 22091 *CHROME COLIFORM AGAR* [online]. [citováno 2009c-02-23]. <<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/datasheet/c4346dat.pdf>>.

Sigma - Aldrich. *Chromogenic Media* [online]. 2009b [citováno 2009-04-27]. <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/microbiology-products.html?TablePage=17972722>>.

Sigma - Aldrich. 22091 *Tryptic Soy Agar* [online]. [citováno 2008-12-05]. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6840/22091_2_Tryptic_Soy_Agar.pdf>.

Smith, A. History of the agar plate. *Labnews* [online]. [citováno 2009-02-10]. <http://www.labnews.co.uk/feature_archive.php/808/5/history-of-the-agar-plate/>.

TRIOS, spol. s.r.o. *CHROMagar Microbiology* [online]. [citováno 2009-02-11]. <http://www.trios.cz/_sgg/m7m2_1.htm>.

Západočeská univerzita v Plzni. Fakulta pedagogická. Katedra biologie. *Praktikum z mikrobiologie (KBI/MIKC)* [online]. 2008 [citováno 2009-04-10]. <http://www.kbi.zcu.cz/aktuality/mikc_08a.pdf>.