

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Rychlá detekce mikroorganismů ve farmaceutických materiálech

(diplomová práce)

Školitel: PharmDr. Petr Jílek, CSc.
Školitel specialista: RNDr. Otakar Beneš

Děkuji PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. vedoucímu diplomové práce za odborné vedení, četné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Děkuji RNDr. Otakaru Benešovi školiteli specialistovi za odborné vedení, četné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Šárce Žitkové a Mgr. Jiřímu Hermannovi za pomoc, poskytování rad během práce v laboratoři a za ochotu a poskytnutí příjemných podmínek k práci.

Dále bych chtěl poděkovat firmám Zentiva a.s. a O.K. SERVIS BioPro s.r.o za umožnění a poskytnutí prostor k vytvoření této diplomové práce.

V neposlední řadě chci také poděkovat mé rodině a přátelům za podporu a trpělivost během mého studia.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Novosád Aleš

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	SOUHRN	7
4	SUMMARY	8
5	TEORETICKÁ ČÁST	9
5.1	UVEDENÍ DO PROBLÉMU	9
5.2	ÚVOD	10
5.3	HISTORIE A DĚJINY	11
5.3.1	<i>Louis Pasteur</i>	11
5.3.2	<i>Robert Koch</i>	13
5.3.3	<i>Joseph Lister</i>	15
5.4	KULTIVAČNÍ METODY	16
5.4.1	<i>Kultivace druhů minoritně zastoupených v bakteriální populaci</i>	16
5.4.2	<i>Tradiční metody</i>	23
5.5	RYCHLÉ MIKROBIOLOGICKÉ METODY - RAPID MICROBIOLOGICAL METHODS (RMM).....	24
5.5.1	<i>Metody měřící růst mikroorganismů</i>	24
5.5.2	<i>Metody určující životaschopnost mikroorganismů</i>	26
5.5.3	<i>Metody zjišťující přítomnost nebo nepřítomnost buněčných komponent nebo artefaktů</i>	27
5.5.4	<i>Metody detekující nukleové kyseliny</i>	29
5.5.5	<i>Tradiční metody kombinované s počítačovým zobrazením</i>	30
5.5.6	<i>Kombinace různých metod</i>	30
5.5.7	<i>Doplňující metoda</i>	31
5.6	RYCHLÉ METODY VE FARMACEUTICKÉ MIKROBIOLOGII	34
5.6.1	<i>Aplikace rychlých mikrobiologických metod</i>	34
5.6.2	<i>Průtoková buněčná cytometrie ve farmaceutické mikrobiologii - historie</i>	35
5.6.3	<i>AES Chemunex – Francie</i>	37
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
6.1	KULTIVAČNÍ METODA.....	45
6.1.1	<i>Popis práce</i>	45
6.1.2	<i>Seznam surovin</i>	45
6.1.3	<i>Postup příprava inokula</i>	45
6.1.4	<i>Použité mikroorganismy</i>	46
6.1.5	<i>Příprava inokula aerobních bakterií</i>	46
6.1.6	<i>Příprava inokula kmene <i>Candida albicans</i></i>	47
6.2	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE BACTIFLOW ALS	47
6.2.1	<i>Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vodě</i>	47
6.2.2	<i>Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve farmaceutických produktech</i>	50
6.2.3	<i>Stanovení počtu kvasinek a plísní ve farmaceutických produktech</i>	53
7	VÝSLEDKY KULTIVAČNÍ METODY A RYCHLÉ MIKROBIOLOGICKÉ METODY – PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	58
7.1	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ POMOCÍ TABULEK.....	58
7.1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa – CCM 1961</i>	58
7.1.2	<i>Staphylococcus aureus – CCM 4516</i>	59

7.1.3	<i>Bacillus subtilis</i> – CCM 1999.....	60
7.1.4	<i>Candida albicans</i> – CMM 8226.....	61
7.2	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ POMOCÍ GRAFŮ.....	62
7.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
7.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	63
7.2.3	<i>Bacillus subtilis</i>	64
7.2.4	<i>Candida albicans</i>	65
8	DISKUZE	65
9	ZÁVĚR:	67
10	POUŽITÁ LITERATURA	68

Seznam zkratek

ALS	Automated labeling system
CFU	Colony forming unit
KTJ	Kolonii tvořící se jednotky
RMM	Rapid microbiological methods – rychlé mikrobiologické metody
MPA	Masopectonový agar
KA	Krevní agar
Caso	Tryptone soya broth (živná půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu)
ATB	Antibakteriální chemoterapeutika
EA	Endova selektivně diagnostická půda
DC	Dezoxycholátový agar
Ph. Eur.	Pharmacopea Europea
USP	United States Pharmacopeia
FDA	Food and Drug Administration
ATP	Adenosintrifosfát
RLU	Relative lights units
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EIA	Enzyme Immunoassay
LAL test	Limulus Amebocyte Lysate endotoxin test
RFLPs	Restriction fragment length polymorphisms
RNA	Ribonukleotidová kyselina
DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina
PCR	Polymerase Chain Reaction
DEFT	Direct Epifluorescent Filter Technique
PMT	Photomultiplier tube
RK	Referenční kultura
PK	Pracovní kultura
CCM	Czech collection of microorganisms - Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university Brno

1 Cíl práce

Cílem této práce je posoudit, zda-li rychlá mikrobiologická metoda konkrétně průtoková cytometrie, kterou zajišťuje přístroj BactiFlow ALS, je citlivější, popřípadě přínosnější pro stanovování absence, přítomnosti či počtu mikroorganismů ve farmaceutických produktech než-li klasická kultivační metoda.

2 Souhrn

Mnoho mikrobiologických laboratoří, ať už ve farmaceutických firmách či na půdě hygienických stanic a firem zabývajících se výrobou potravin používá k analýze velkého množství mikrobiologických vzorků tradiční techniky založené na kultivaci příslušné kultury. Tyto techniky trvají mnoho hodin až dnů než získáme výsledek. Jsou pomalé a nejsou vhodné pro nekultivační mikroorganismy. Kultivačně založené techniky navíc neposkytnou skutečnou informaci o fyziologickém stavu organismu in situ, který je důležitý v průmyslové výrobě mnoha mikrobiálních produktů (1) a často při vysokém počtu mikroorganismů, kdy není možno počet mikroorganismů stanovit, prodlužuje se tak celá doba kultivace o další ředění vzorku a o čas nárůstu daného mikroorganismu.

Průtoková cytometrie umožňuje získání skutečného mikrobiálního stanovení jednotlivých mikroorganismů bez závislosti na typu mikrobiální kultury. Nicméně, průtoková cytometrie nebyla široce využívána pro obvyklou mikrobiální analýzu. Důvodem je hlavně vysoká cena a složitosti vybavení přístroje, nutnost zapracování průtokového cytometru a nedostatek zkušebních vzorků s vhodnými biologickými vlastnostmi pro konkrétní použití. Mnoho moderních přístrojů jsou nyní relativně jednoduše obsluhovatelné, díky zlepšení uživatelského rozhraní (1). V současné době toto vybavení je velkou měrou omezeno na jednoduché rozbory, například zkouška čistoty pro přítomnost celkového nebo životaschopného množství mikroorganismů. Přístroj, který poskytl výsledky této práce se nazývá BactiFlow ALS. Tento přístroj poskytuje velké množství aplikací pro stanovení mnoha vzorků z nejrůznějších průmyslových odvětví. Využili jsme tyto aplikace: stanovení celkového počtu mikroorganismů ve farmaceutických produktech, stanovení počtu kvasinek a plísní ve farmaceutických produktech a stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vodě. Celá práce byla pojata jako srovnávací metoda mezi průtokovou cytometrií a klasickou kultivační metodou. V obou případech jsme měřili mikrobiologicky čisté farmaceutické produkty a vodu např. acidum citricum, natrii chloridum, aroma rubi idaei a další. Mikrobiologicky čisté vzorky jsme postupně zatěžovali mikroorganismy v koncentraci 10^2 , 10^3 a 10^4 CFU/ml. Použili jsme tyto mikroorganismy - Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Candida albicans.

Tato technologie umožňuje selektivně označit specifické druhy mikroorganismů, které prokazují metabolickou aktivitu a neporušenou buněčnou membránu. Mikroorganismy mohou být obsaženy v různých formách (např. voda, bláto, jídlo, nápoje) a tyto formy mohou být v přírodě vysoce proměnné (např. voda z vodovodu ve srovnání s říční vodou). Mnoho forem má vysoké pozadí autofluorescence (např. řasy a minerály ve vodních vzorcích) nebo se mohou nespecificky poutat do používaných fluorescenčních biologických reagensů (např. bílkovinné micely v mléce). Formulace biologických

reagencií a vzorově předběžné úpravy jsou rozhodující pro vývoj vhodných mikrobiologických zkoušek čistoty. Vývojové trendy ve vybavení a biologických reagentů pro mikrobiologické aplikace jsou revidovány se specifickými příklady z environmentální nebo průmyslové mikrobiologie. Zvážení širšího rozvoje mikrobiálních zkoušek čistoty díky cytometrii je dnes rozhodující v mnoha směrech (1).

3 Summary

Many microbiology laboratory, no matter what already in pharmaceutical firms or to hygienic stations ground and firms conversant food production used to analysis big quantity microbiology samples conventional techniques based on cultivation appropriate culture. These techniques take hours to days to yield a result, are tedious and are not suitable for non-culturable microorganisms. Further, culture-based techniques do not provide real-time information on the physiological status of the organism in situ which is important in the industrial manufacture of many microbial products (1) and often at high of the number of micro - organisms, when isn't possibility number micro - organisms determine, all time cultivation about next dilution sample elongate and about time growth this micro - organism.

Flow cytometry makes it possible to obtaining real microbial determination single micro - organisms, without dependencies on type microbial culture. Nevertheless, flow cytometry has not been extensively used as a tool for routine microbial analysis. Reason is mainly high cost and complexity of instrumentation, the need for trained flow cytometrists and the lack of assay kits with appropriate biological reagents for specific applications. Much modern instruments are now relatively simply serviceable, thanks improvement user's interface (1). At present, this equipment is largely limited on simple analyses, for example examination cleanness for present of the total or viable quantity micro - organisms. Apparatus which the give to results those work be called BactiFlow ALS and this apparatus offers big quantity application for determination to many samples from all sorts of industrial branch. We availed these applications: determination total count micro - organisms in pharmaceutical productions determination total count yeasts and moulds in pharmaceutical productions and determinations total count micro - organisms in water. All work was distributive like comparative method among flow cytometry and classical cultivation method. In either event we measured microbiology virgin pharmaceutical products and water e.g. acidum citricum, natrii chloridum, aroma rubi ideai and next. Microbiology virgin samples we step by step burden micro - organisms in concentration 10^2 , 10^3 and 10^4 CFU/ml. We used this micro - organisms - Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, and Candida albicans.

This technology make possible selectively label specific order micro - organisms that approve metabolism activity and intact cellulite membrane. Micro - organisms may be included in different forms (e.g. water, mud, food, drinks) and these forms may be outdoor highly variables (e.g. water from water supply in comparison with riverine water). Many matrices have high background autofluorescence (e.g., algae and minerals in water samples) or may bind non-specifically to the fluorescent biological reagents used (e.g., protein micelles in milk). Formulation of biological reagents and sample pre-treatments are critical to the development of suitable microbiological assays. Here, developments in

instrumentation and biological reagents for microbiological applications are reviewed with specific examples from environmental or industrial microbiology. The broader considerations for the development of microbial assays for flow cytometry are also considered (1).

4 Teoretická část

4.1 Uvedení do problému

22. prosince 1822 se narodil významný člověk, díky kterému si dovoluji říct, vzniká tato práce. V 1. polovině 19. století přichází na svět člověk, který za pár desítek let představuje lidstvu nový obor, mikrosvět ve světě. Ano, jedná se o bakteriologii a jejího zakladatele Louise Pastera. Na jeho práci navazuje a obor rozšiřuje německý vědec Robert Koch. Oba tuší, že se tento obor se bude dynamicky vyvíjet a je v něm ještě mnoho nepoznaného. Bakteriologie následně spadá do mikrobiologie a snaha určit v co nejkratší době a s co největší přesností původce nemoci se stává hlavním tématem na mnoho let. Uplynulo již 186 let od narození Louise Pastera a identifikace počtu a vlastností mikroorganismů se stále vyvíjí.

Klasické mikrobiologické metody jsou ve srovnání s jinými analytickými metodami relativně pomalé a to v mnoha případech právě kvůli potřebě kultivace mikroorganismů. Kromě toho je klasické pojetí obtížné pro nekultivované mikroorganismy. Ovšem v poslední době, objevením metod molekulární biologie, obzvláště těch, jež se týkají protilátek a nukleových kyselin, jejichž kombinace s dalšími podrobnostmi jiných metod, mají dodat rychleji a specifičtěji mikrobiologickou identifikaci. Průtoková cytometrie dovoluje samostatnou nebo hromadnou detekci mikroorganismů v klinických vzorcích snadnou, bezpečnou a rychlou cestou. Mikroby mohou být identifikovány na základě jejich charakteristických cytometrických rozměrů nebo pomocí jistých fluorochromů, které mohou být použity buď nezávisle nebo vázaně na specifické protilátky nebo oligonukleotidy. Průtoková cytometrie přináší vývoj kvantitativních procesů, hodnocení antimikrobiální citlivosti a lékové cytotoxicity v rychlou, přesnou a vysoce reprodukovatelnou cestou. Mimo jiné, tato technika dodává monitoring in vitro antimikrobiální aktivity a antimikrobiální působení ex vivo. Nejvýraznější přínos průtokové cytometrie je možnost detekce současné heterogenní populace s různou citlivostí k mikrobiálnímu působení. Navzdory tomu, aplikace průtokové cytometrie v klinické bakteriologii není ještě příliš rozšířená, pravděpodobně kvůli nedostatku přínosu průtokové cytometrie nebo nedostatku znalostí o potenciálu tohoto zařízení. Jeden z cílů této práce je pokusit se zmírnit tyto nedávné poměry. Jsem přesvědčen, že v blízké budoucnosti by dosažitelnost komerčních souprav a systémů mohla být rozšířena pro užití metod v klinických mikrobiálních laboratořích (2).

4.2 Úvod

Mikrobiologie v celku a mikrobiologie v detailu má být svědkem důležitosti změn v průběhu několika málo let (10). Otázkou pro mikrobiologické laboratoře v porovnání s jinými klinickými laboratořemi je relativní pomalost v konečném podání výsledků. Tradiční metody bakteriologie a mykologie požadují izolaci organismů dříve než identifikaci a jiné možné testování. V mnoha případech, kultivační výsledky jsou dostupné v rozmezí 48 – 72 hodin ovšem i déle. Izolace viru v buněčných kulturách a detekce specifických protilátek by měly široké užití pro diagnózu virových infekcí (11). Tyto metody jsou citlivé a specifické, ale proti času požadovaného pro izolaci viru jsou příliš dlouhé a jsou řízené časem virové replikace. Dodatečné, sérologické zkoušky v sérech z infikovaných pacientů jsou více prospěšné pro určení chronických nemocí, než-li u akutních infekcí. Život ohrožující infekce požadují okamžitou antimikrobiální terapii a pak je třeba rychlé a pečlivé diagnostiky. Procedury, které nevyžadují kultivaci a které detekují přítomné antigeny nebo specifické imunitní reakce hostitele napomáhají zkrátit čas diagnostiky. V novější době, vývoj molekulárních biologických technik, založených zvláště na nukleových kyselinách, získává výsledky v kombinaci s rozšířením techniky, a slouží k zrychlené a specifické mikrobiologické diagnóze (12). Tyto techniky vedly k revoluční změně v mnoha tradičních metodách používaných v klinických mikrobiologických laboratořích. Rychlé výsledky umožnily snadnější identifikaci obtížně kultivovaných patogenních mikroorganismů (13).

Na druhou stranu, aktuální uspořádání klinických mikrobiologických laboratoří je založeno na automatizaci a to podmiňuje rostoucí náklady (14,15). Zvýšené použití automatizace v klinických mikrobiologických laboratořích je nejlépe doloženo systémy užívanými pro detekci bakterií v moči a krvi, prověřování přítomnosti bakteriálních infekcí v močových cestách, dále u antimikrobiálních citlivostních testů a detekcí protilátek. Pro získávání lepší citlivosti a rychlosti výrobci spojitě modifikují všechny tyto systémy. Proto investiční náklady na vybavení a provoz laboratoře jsou velmi vysoké.

Cytometrie by mohla být a je úspěšně aplikovaná na většinu těchto situací. Přítomností bakterií v krvi a výskytem bakterií v moči by mohla cytometrie nejen rychle dokázat organismy odpovědné za infekce, ale také zpočátku identifikovat typ mikroorganismu na základě jejich cytometrických charakteristických rysů. Ačkoli cytometrie nabízí širokou škálu potenciálních aplikací, významnější příspěvek by byl v testování pro pomalu rostoucí mikroorganismy, jako mykobakterie a houby (16,17,18). Výsledky jsou získány rychle, často za méně než 4 hodiny, kdy vhodně v kombinaci s klasickými technikami, získáme z cytometrie výsledky ještě před tím, než byl mikroorganismus identifikovaný. Nejvýznamnějším testem, který cytometrie nabízí, je detekce smíšené populace, která může reagovat na antimikrobiální působení různým způsobem. (19)

Tato technika by mohla být aplikována na studii imunitní odpovědi organismu na antigen u pacientů, s možností zjistit specifické protilátky (20,21) a kontrolovat klinický stav po aplikaci antibiotik. (22,23) Navíc vhodné použití cytometrie, její přizpůsobení různým testům a definovaným parametrům, může pomoci klinické mikrobiologii ve výkladu specifických výsledků, zvláště na poli rychlých diagnostik.

4.3 Historie a dějiny

Metody používané nejvíce v mikrobiologických zkušebních laboratořích mají svůj původ v laboratořích Kocha, Listera a Pasteura. Jako takové, jsou velmi staré, typicky až přes sto let. Zatímco četné změny nastaly v chemické laboratoři, v mikrobiologickém testování a jednotlivých metodách se objevovalo zlepšení pouze omezené. V minulé dekádě, ohniskem z mnoha výzkumníků bylo studium a implementace zlepšených metod pro izolaci, brzkou detekci, charakterizaci a spočítání mikroorganismů a jejich produktů. Ve společném jazyce vše toto napomáhá lepším metodám, automatizovaným metodám, zmenšeným metodám a metodám, které vyžadují menší dobu trvání nebo výdaje. Všechny tyto metody jsou souhrnně seskupené do kategorie rychlých mikrobiologických metod (RMM). V některých kompenciích jsou tyto metody nazývány jako alternativní mikrobiologické metody. K dispozici byly různé typy metod v rozsahu od jednoduché měřicí tyčinky k pravým komplexním automatickým systémům, které vykonávají různorodost testů a používají různé druhy technik. Ceny pro tyto metody se značně mění z několika dolarů ke stovkám tisíc dolarů. Ačkoli tyto metody jsou nazývané rychlými mikrobiologickými metodami, mnoho jich má kořeny v dalších přírodních vědách - například chemie, molekulová biologie, imunologie, imunochemie, molekulová elektronika a zobrazování pomocí počítače.

Rychlé mikrobiologické metody poskytnou významné příležitosti pro farmaceutické společnosti získat data, která mohou být významně lepší než ta data, která se získala přes tradiční metody, mohou být více cenově příznivější, mohou poskytnout marketingové výhody a mohou počítat s koordinovaným zpracováním analytické technologie, která má být plně integrována uvnitř příslušenství.

4.3.1 Louis Pasteur – Obrázek 1 (4)



Louis Pasteur se narodil 27. prosince 1822 a zemřel 28. září roku 1895. Pasteur byl francouzský biolog, chemik a lékař, jeden z nejvýznačnějších vědců 19. století. Člen Francouzské akademie přírodních věd, Francouzské akademie lékařských věd a Francouzské akademie. Vystudoval chemii na École Normale Supérieure a Sorboně. Zakladatel nových vědeckých oborů stereochemie, mikrobiologie a imunologie, objevitel vakcín proti sněti slezinné a vzteklině.

Titul profesora si vysloužil objevem disimetrie molekul kyseliny hroznové, čímž založil nový vědecký obor – stereochemii.

Další významné výzkumy provedl v oblasti mléčného, octového a alkoholového kvašení. Prokázal, že kvašení je životní projev mikroorganismů, že různé mikroorganismy způsobují různé typy kvašení, a vypracoval metodu tepelné sterilizace, která brání nežádoucímu kvašení potravin – tzv. pasterizace.

Pokračoval ve výzkumu a vyhlásil teorii, že nemoci, hniloba a zánět jsou způsobeny rovněž živými mikroorganismy (anglický lékař Lister založil na jeho práci teorii aseptické operace). Vyvrátil též teorii abiogeneze.

Roku 1864 následovalo pověření profesora Pasteura vyšetřením tzv. bourcového moru, který kosil hedvábnický průmysl ve Francii. Navzdory těžké mozkové mrtvici, kterou v průběhu bádání utrpěl, pokračoval ve výzkumu a prokázal, že příčinou moru jsou dva typy mikroorganismů a stanovil a prosadil ve Francii zásady, jak zamezit jeho šíření, které později převzaly i ostatní státy.

Zbytek svého života věnoval výzkumu nebezpečných infekčních chorob a jejich prevenci. Byl prvním lékařem, který dokázal vytvořit vakcínu proti nějaké chorobě z původce choroby a ustanovil zásady, jak v této oblasti postupovat. Vyvinul a prováděl očkování proti anthraxu, slepičí choleře a prasečímu moru. Stanovil a prosadil nové a přísnější normy pro zacházení s dobytkem, který na anthrax zemřel.

Vrchol jeho kariéry nastal v roce 1885, kdy poprvé provedl očkování proti vzteklině (po předchozích pokusech na psech a pravděpodobně i na své vlastní osobě). Jím ustavený postup výroby vakcíny vysoušením králičí míchy se všeobecně používal až do konce 50. let 20. století. Založil Pasteurův ústav v Paříži, který dodnes představuje jeden z vrcholů mikrobiologického výzkumu.

Louis Pasteur se oženil 29. května 1849 a měl pět dětí, pouze dvě z nich se však dožily dospělosti.

Louis Pasteur byl po celý svůj život skalním a zbožným katolíkem a v řadě debat se otevřeně stavěl proti ateismu šířícímu se po francouzských vysokých školách a prohlašujícímu víru v Boha za nevědeckou. Hojně citován byl jeho výrok, stavící se proti údajnému rozporu mezi vědou a vírou: *„Poněvadž jsem hodně studoval, věřím jako bretoňský sedlák. Kdybych byl studoval ještě více, věřil bych jako bretoňská selka (4).“*

4.3.2 Robert Koch – Obrázek 2 (5)



R. Koch

Robert Koch se narodil 11. prosince 1843 a zemřel 27. května roku 1910. Koch byl německý lékař a mikrobiolog, zakladatel bakteriologie a nositel Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu (1905), objevil původce tuberkulózy a cholery.

Narodil se v Clausthalu v Německu v rodině důlního úředníka. Medicínu studoval pod vedením Jacoba Hentla na univerzitě v Göttingenu. Za Prusko-francouzské války sloužil jako vojenský lékař ve Wolsteinu.

Jako první prokázal, že *Bacillus anthrax* je původcem anthraxu (1876) a vypracoval tzv. Kochovy postuláty, soubor pravidel a postupů, které se při prokazování příčinné souvislosti mezi předpokládaným původcem choroby a chorobou samou používají dodnes. Objevil existenci spor anthraxu a popsal jejich stavbu, vysokou odolnost vůči nepříznivým vlivům a schopnost způsobit nákazu i po velmi dlouhé době a stanovil nové bezpečnostní limity, které by bránily rozvoji nemoci.

Vyvinul obrovské množství postupů fixace, barvení a fotografování preparátů a nové způsoby pěstování čistých bakteriálních kultur. V roce 1882 zveřejnil práci v níž jako první popsal *Mycobacterium tuberculosis*, kterému se také občas přezdívá „Kochův bacil“ a stanovil nová epidemiologická opatření, která měla udržet tuto nemoc pod kontrolou. V roce 1883 objevil *Vibrio cholerae* a prokázal jeho příčinnou souvislost s cholerou. V roce 1885 se stal profesorem hygieny na univerzitě v Berlíně. V roce 1891 se stal ředitelem Ústavu pro studium infekčních chorob a zůstal jím až do roku 1904.

V roce 1894 přišel na svět s tuberkulinem jakožto lékem a očkovací látkou proti tuberkulóze. Ale tento objev mu přinesl strašlivé zklamání. Nejenže se ukázal být neúčinný, navíc jeho vedlejší účinky vedly k úmrtím pacientů, což v souvislosti se zfalšováním výsledků laboratorních pokusů, které mělo urychlit zavedení léku, vedlo k dočasnému poklesu Kochovy reputace. (Koch do publikace výsledků zařadil i pokusy, které nestihl dokončit či které teprve plánoval. Ve skutečnosti provedl jen malou část z nich a to ke své velké smůle na objektech, které reagovaly na léčbu tuberkulinem zcela jinak než člověk. Zejména se u nich neobjevovaly prudké alergické reakce, na něž někteří

pacienti umírali.) Fakt, že se tuberkulin posléze ukázal jako výborný diagnostický prostředek pokud jde o přítomnost protilátek proti TBC v těle pacienta, představoval jen malé zadoštinění. Koch pokračoval ve svých výzkumech nemocí, hodně cestoval do Afriky, Indie a všude tam, kde se objevovaly epidemie nebezpečných chorob. Jeho práce o etiologii spavé nemoci, malárie, lepry a dalších chorob představují vrcholy lékařského výzkumu na přelomu století(5).

- Základní podoba Kochových postulátů

1. Mikroorganismus musí být pozorován ve všech nemocných jedincích a v žádném zdravém.
2. Musí být izolován z nemocného jedince a vypěstován mimo něj v laboratoři v čisté kultuře.
3. Zdravý pokusný objekt musí po naočkování dostatečného počtu jedinců této čisté kultury onemocnět a vykazovat stejné příznaky onemocnění jako v bodě 1.
4. Z tohoto onemocnělého pokusného objektu musí být izolován mikroorganismus identický s tím, který byl pozorován a izolován v původním nemocném jedinci.

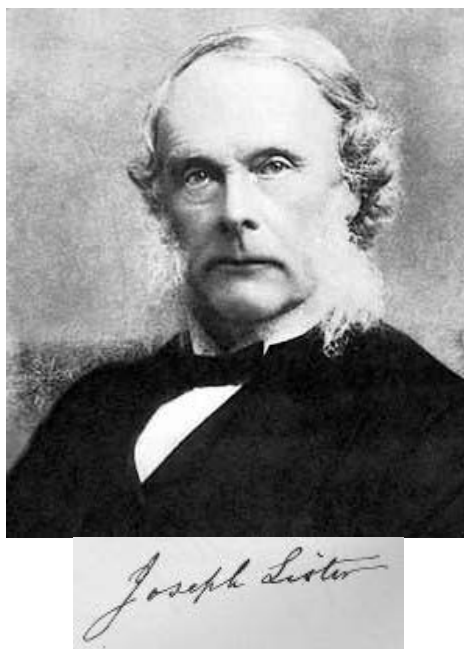
- Jevy, které způsobují výjimky z Kochových postulátů

o (Čísla zasahujících jevů souhlasí s číslem kroku, který ovlivňují).

1. Oportunistické patogeny - patogeny, které způsobují chorobu jen za určitých okolností. Příkladem může být *Escherichia coli*, která tvoří běžnou mikroflóru tlustého střeva, ale pokud by pronikla jinam do organismu, může způsobit těžké onemocnění a smrt.
2. Problém představují nebuněčné organismy plus několik výjimek z dalších mikroorganismů, kteří se nedokáží rozmnožovat mimo hostitelské buňky a tudíž je nelze v čisté kultuře na médiu pěstovat. Je třeba použít nějaký jiný živý organismus.
3. Je třeba odfiltrout jevy přirozené a získané imunity.

1. a 3. Velký problém mohou představovat případy, když onemocnění vzniká spoluprací více patogenů (6).

4.3.3 Joseph Lister – Obrázek 3 (3)



Joseph Lister se narodil 5. dubna 1827 a zemřel 10. února 1912. Lister byl anglický lékař, který způsobil převrat při chirurgických operacích objevením antiseptiky.

Chirurgické výkony bez antiseptiky si dnes už ani neumíme představit. Když se podíváme na úzkostlivou čistotu chirurgických sálů, kde se každý příchozí musí důkladně umýt a převléct se do desinfikovaného obleku, je až neuvěřitelné, že tato opatření se dějí ani ne od poloviny 19. století. Předtím se konaly operace bez zvláštního důrazu na čistotu. Proto byla tak častá pooperační hnisání a pochopitelně i pooperační úmrtí. Převrat v tom způsobil právě Joseph Lister vynálezem antiseptiky.

Lister byl ovlivněn Pasteurovými a Kochovými pracemi o bakteriích. Uvědomil si nebezpečí, jež hrozí otevřeným ranám od mikrobů přenášejících nemoci a mezi jiným způsobujících zánětlivé hnisání. A tak se rozhodl, že se nákaze při operaci musí předejít. Zrodil se pojem antiseptiky. Udává se, že první operaci pod antiseptikou provedl Lister v roce 1865. Antiseptiku docílil obvazem nasáklým karbolovou kyselinou. Nedlouho po tom, v roce 1867 na sjezdu anglických lékařů v Dublinu, přednesl Lister sdělení o antiseptice. Zde měl naprostý neúspěch, irští lékaři antiseptiku neuznali.

Lister se však nedal odradit. V témže roce publikoval své názory na zavádění antiseptiky v anglickém lékařském časopise *Lancet*.

Lister si v karbolové kyselině (fenolu) především myl ruce, myl i všechny chirurgické nástroje, přikládal na operační ránu hadry namočené v ní, ba dokonce ji rozprašoval po operačním sále. Zprvu se Lister setkával s nedůvěrou u většiny chirurgů, antiseptika pro ně znamenala cosi nezvyklého, ale v sedmdesátých letech 19. století už se našli chirurgové, kteří s ním souhlasili a přidávali se k němu. Antiseptika si klesla cestu do více a více operačních sálů a chirurgických pracovišť.

A tak byl v roce 1891 otevřen v Londýně Listerův ústav preventivního lékařství, jenž za něho víc než sto let vyprodukoval mnoho důležitých vědeckých prací. Po jeho vzoru se zařizovaly a zařizují jiné podobné ústavy, zejména v Evropě a Americe.

Antiseptice, již vynalezl Joseph Lister, způsobila revoluci v chirurgii a tím záchranu miliónů operovaných. Proto má Joseph Lister v dějinách světového lékařství své přední místo(3).

4.4 Kultivační metody

Některé mikroorganismy (většina bakterií) jsou schopny růst a množit se mimo živý organismus, a to na umělých živných půdách. Tato umělá kultivační média mohou být tekutá nebo pevná (agarová). Kultivace je nejvýznamnější metodou pro identifikaci mikroorganismů (7) .

4.4.1 Kultivace druhů minoritně zastoupených v bakteriální populaci

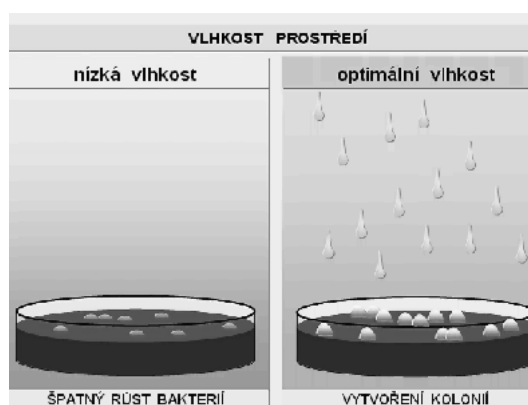
Musíme použít obohacenou živnou půdu. Ve složení média musí být přítomnost zdrojů energie, uhlíku, dusíku a kultivační podmínky (např. světelné) by měly zvýhodňovat růst bakterie, o kterou se zajímáme.

Můžeme také použít selektivní živná média. Tato média obsahují látky, které inhibují růst doprovodných mikroorganismů. Pro izolaci nutričně náročných mikroorganismů z populace používáme obohacená živná média.

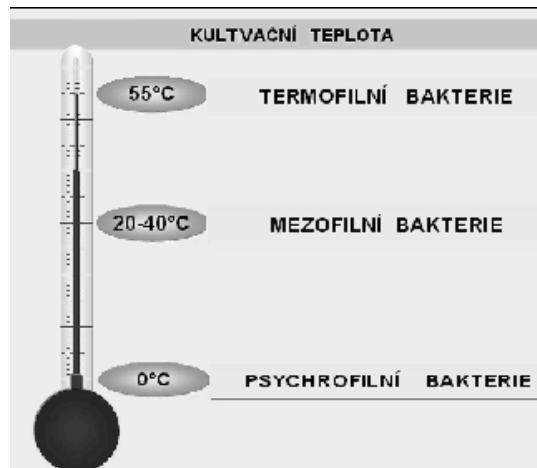
Další jsou indikátorová média. Používají se pro stanovení přítomnosti organismu bez jeho izolace. Využívá se specifických vlastností mikroorganismu na agarovém médiu (7).

4.4.1.1 Kultivační podmínky

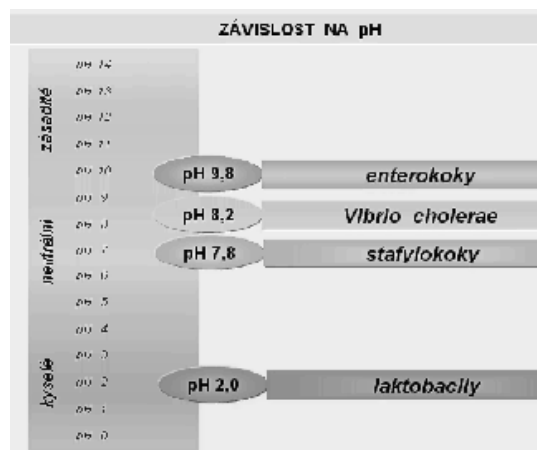
1. Dostatek biogenních prvků a živin (bílkoviny, cukry, tuky, soli, vitaminy a další) pro tvorbu bakteriální hmoty
2. Vlhkost pro rozpuštění a příjem živin - obrázek 4 (7)



3. Optimální kultivační teplota - obrázek 5 (7)



4. Optimální pH - obrázek 6 (7)



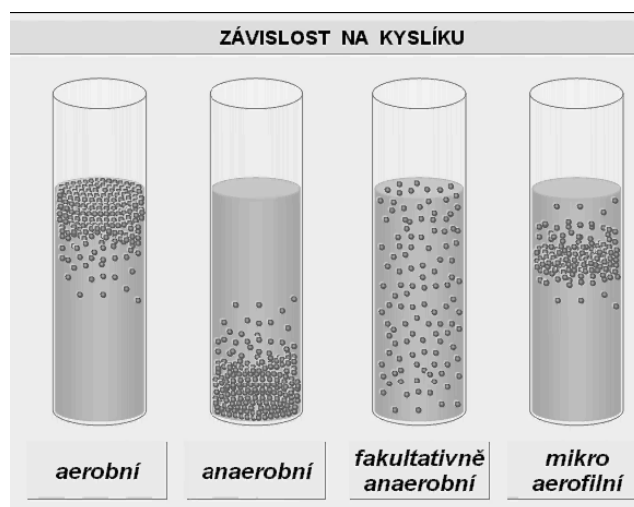
5. rH = Oxidoredukční potenciál :

- o snižuje - glukóza, kys. thioglykolová, kys. askorbová, var

6. Plynné prostředí

- o dle nároku na O₂ (obrázek 7)
 - aerobní bakterie
 - anaerobní bakterie
 - fakultativně anaerobní bakterie
 - mikroaerofilní bakterie

Obrázek 7 – závislost na kyslíku (7)



Poznámka: U anaerobních mikroorganismů probíhá kultivace v anaerobním prostředí, které je dosaženo buď vyvíječem anaerobní atmosféry a nebo přidáním chemikálií, které reagují s O₂. Jsou to thioglykolát sodný, cystein, kyselina askorbová a další.

7. Osmotický tlak:
 - izotonické prostředí umožňuje růst a množení buněk
8. Optimální světelné podmínky:
 - některé bakterie vyžadují zastínění, např. anaerobní bakterie (7)

4.4.1.2 Typy kultivačních metod

- Aerobní kultivace - nejběžněji používaná, bez omezení přístupu vzduchu k půdě, Po naočkování se vloží do termostatu při 37°C (35°C) na 18-24 hodin (běžná doba nárůstu kolonií).
- Mikroaerofilní kultivace - bakterie vyžaduje k růstu vyšší tenzi CO₂ a nižší tenzi O₂. Používá se exsikátor (zvon) se svíčkou (zapálená vypořebuje kyslík).
- Anaerobní kultivace - bakterie vyžaduje ke svému růstu anaerobní prostředí. Používáme tekuté i pevné půdy s redukujícími substancemi a vylité do vyšší vrstvy.
- Speciální kultivace - v mykologii, ve virologii, při kultivaci rodu Mycobacterium. Používají se speciální kultivační půdy a kultivační postupy, i délka kultivace je odlišná(7).

4.4.1.3 Kultivační půdy

Neexistuje univerzální médium, na kterém by rostly všechny bakterie(7)!

- a. **Tekuté kultivační půdy - pomnožovací** - jsou vylévány do zkumavek, tekutina umožňuje lepší difúzi živin. Růst bakterií se projevuje zákalem, sedimentem, vločkami

nebo blankou na povrchu. Tekutým kultivačním půdám se říká **bujóny**. Bakterie v nich tvoří buď povrchovou blanku (aerobní bakterie) nebo zákal (od cca 10^6 buněk/1ml - mikroaerofilní bakterie) nebo sediment (anaerobní bakterie.) Kultivace v tekutých půdách nám neumožňuje kvantitativní stanovení mikroorganismů.

Způsob kultivace u tekutých půd

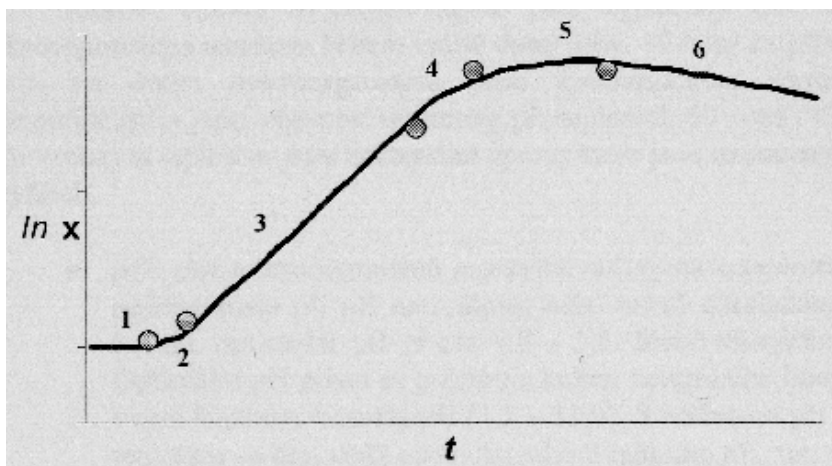
- Statická kultivace – za statických podmínek

Statická kultivace. Jedná se o ucelený, uzavřený systém, jehož složení a vlastnosti prostředí se mění činností bakterií. Vyskytují se zde samozřejmě faktory limitující růst bakterií, jako je vyčerpání živin, hromadění metabolitů nebo například fyzikálně-chemické změny, kdy probíhá množení ve fázi vzestupu a poklesu tzv. růstovou křivkou v závislosti na čase(7).

Růstová křivka (obrázek 8)

- 1. Lag fáze** – buňky se nemnoží, adaptují se, tvoří se enzymy a syntetizují se buněčné složky.
- 2. Fáze zrychleného růstu** - buňky se množí s narůstající rychlostí dělení a zvyšuje se intenzita buněčného metabolismu.
- 3. Fáze logaritmická, exponenciální** – intenzivní množení buněk, počet buněk narůstá geometrickou řadou, rychlost dělení je konstantní. Aktivní buňky se projevují metabolismem, objevují se metabolické produkty, nastává úbytek buněk a odumírání v poměru k přírůstku buněk je minimální.
- 4. Fáze zpomaleného růstu** – rychlost dělení se snižuje, narůstá počet odumírajících buněk, nastává vyčerpání živin a hromadění metabolitů (toxických látek).
- 5. Fáze stacionární** – nepříznivé změny - počet odumírajících buněk se vyrovnává počtu buněk v přírůstku, rychlost dělení dosahuje nulových hodnot a množství buněk je maximální.
- 6. Fáze poklesu, zrychleného odumírání** – úbytek buněk převažuje nad přírůstkem a rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotu. Nastává hromadné odumírání buněk(7).

Obrázek 8 – růstová křivka (7)



- **Kontinuální kultivace**

Je to ustálený stav, kde je ustanovena dynamická rovnováha. Systém bakterie versus prostředí je otevřený, nemění se koncentrace živin ani počet buněk a jejich hustota, nemění se ani objem média.

Nastává plynulý přívod živin, které zajišťuje čerstvé prostředí a odtok využitých látek. Rychlost průtoku závisí na rychlosti přírůstku nových buněk a úbytku buněk vyplavením. Počet buněk v kultivátoru je konstantní a nastává ustálený stav.

Typy technologie

- **Chemostat**

Využívá externí způsob regulace, která obnáší změnu koncentrace substrátu v prostředí, dále je důležitá hustota buněk, která je regulována limitní složkou média. Také závisí na regulaci rychlosti průtoku prostředí, kde změna rychlosti průtoku obnáší změnu koncentrace živin a tím pádem změnu rychlosti množení buněk. Rychlý průtok dosahuje koncentrace živin zvýšení a opět zrychlení množení buněk.

- **Turbidostat**

Využívá interní způsob regulace, kde průtok živin se řídí hustotou buněk. Po dosažení horní hranice hustoty buněk se zvýší rychlost průtoku a nastává úbytek buněk vyplavením.

- b. **Polotuhé půdy** - obsahují malé množství agarové řasy, určeny pro speciální účely.
- c. **Tuhé (pevné) kultivační půdy** - jsou vylévány do Petriho misek nebo zkumavek. Připravují se přidáním agarové řasy do tekutého základu. Bakterie na nich rostou ve formě kolonie (statisíce až miliony bakterií namnožených z 1 buňky), charakter těchto kolonií je často typický pro určitý rod či druh bakterie (obrázek 10). Tyto půdy slouží především ke kvantitativnímu stanovení mikroorganismů, dále k izolaci a identifikaci mikroorganismů. Barva půdy se mění i vlivem světla, proto ji musíme uchovávat v temnu.
 1. Půdy diagnostické - tyto půdy obsahují taková aditiva, která zviditelní určité (biochemické) vlastnosti narostlé bakterie pomocí nichž můžeme tuto bakterii předběžně identifikovat již podle vzhledu kolonie.
 2. Půdy selektivní jsou určeny ke kultivaci úzké skupiny bakterií. Růst doprovodné (nežádoucí) mikroflóry je potlačen různými inhibitory (např. antibiotika), k nimž je selektovaný mikroorganismus rezistentní.
 3. Půdy selektivně diagnostické – kombinace předešlých dvou půd (7)
 - **Masopeptonový agar (MPA)** - obsahuje pouze výtažek z masa, pepton, sole a 2% agarovou řasu. Je základem pro další půdy.
 - **Krevní agar (KA)** - připravuje se přidáním 5-10% defibrinované beraní krve k MPA základu. Je to nejvíce používaná půda, roste na ní většina bakterií. Na KA lze odečítat hemolýzu, pokud bakterie tvoří tzv. hemolýziny. U úplné hemolýzy dochází k lýze krvinek v okolí kolonií, což se projeví vznikem úplného projasnění. U neúplné hemolýzy není projasnění úplné. Viridace se projevuje zeleným zbarvením půdy kolem kolonií (přeměna hemoglobinu na methemoglobin).

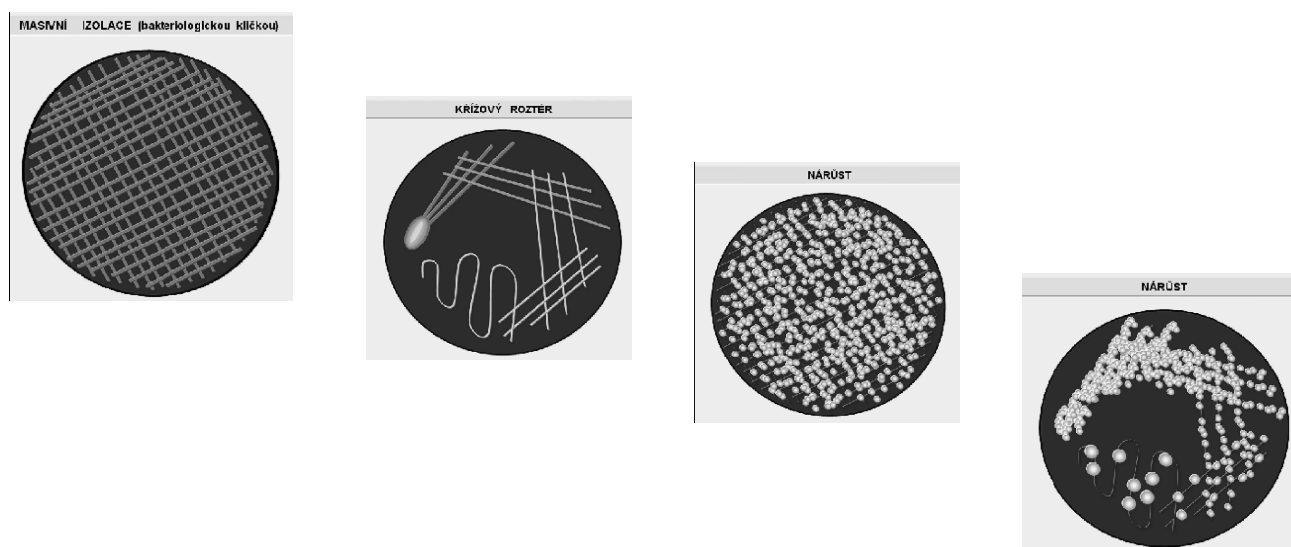
- **Sabouraudova půda** - selektivní půda pro kvasinky a plísně, obsahuje pepton, agar a cukry (glukózu nebo maltózu), pH 5,0.
- **Caso agar** – připraví se z 15 g pankreatického hydrolyzátu kaseinu a 5 g papainového hydrolyzátu sóji. Přidává se chlorid sodný a 5g agaru. pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo $7,3 \pm 0,2$. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.
- **Čokoládový agar** - obsahuje krev přidávanou do horkého agaru (80 °C), slouží ke kultivaci náročných mikrobů.

Existuje celá řada dalších tekutých i pevných půd přesně vyvážených podle požadavků a nároků na prostředí jednotlivých patogenů. Komerčně se vyrábí jednak základní agarové půdy a selektivní a růstové doplňky nebo už firmy zasílají přímo hotové Petriho misky s agarem (8,9).

Ve farmaceutické mikrobiologii se živné půdy dělí na lékopisné a nelékopisné. Lékopisné živné půdy se používají v metodách uvedených v lékopise. Lékopisné živné půdy jsou pevně dané pro jednotlivé kultivace bakterií podle metod uvedených v lékopise.

Chceme-li použít nelékopisné živné půdy, musíme provést jejich validaci, kterou dokážeme, že živné vlastnosti jsou minimálně stejné jako u lékopisných.

4.4.1.4 Očkování tuhých živných půd - obrázek 9 (7)



Technika očkování (zpracování materiálu)

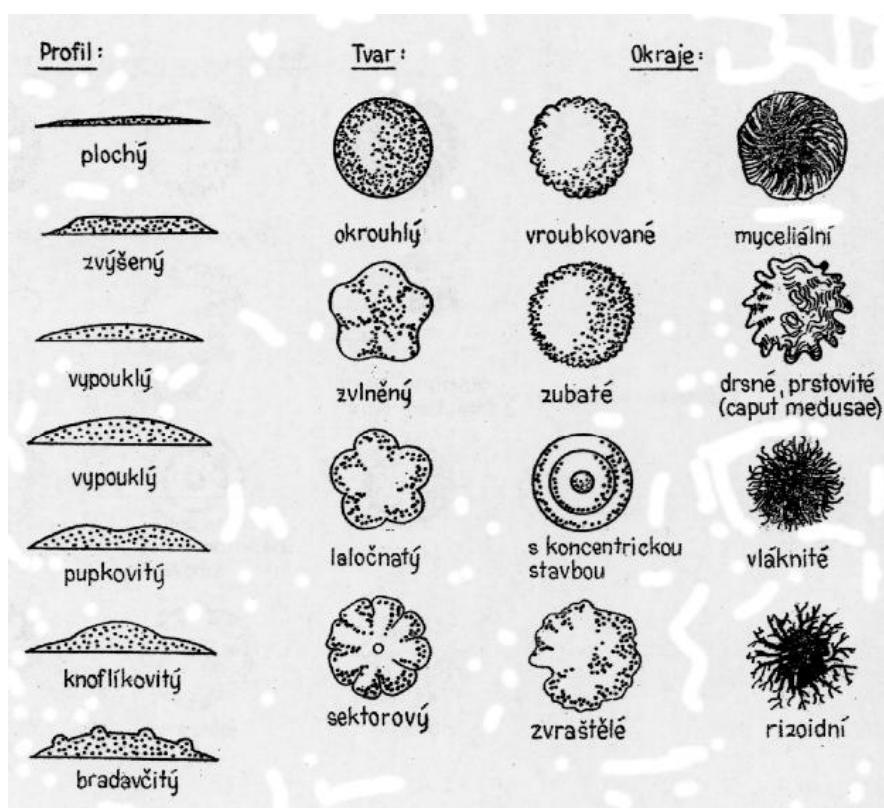
Při práci musíme postupovat asepticky, abychom půdu nekontaminovali jinými bakteriemi. Materiál se očkuje buď přímo výtěrkou, bakteriologickou kličkou nebo Pasteurovou pipetou (tekutý materiál). Materiál se nanese malou ploškou při okraji a pak se rozočkuje pomocí vypálené a vychladlé kličky tak, aby se z hustého nánosu bakterie roztáhly v očkovacích čarách do větší plochy a mohly vyrůstat v izolovaných koloniích. Po použití kličku vždy opálením sterilizujeme.

Tekuté půdy se očkují buď přímo vnořením tamponu nebo vstříknutím tekutého materiálu či vnořením kličky s částí pevného materiálu. Tekuté půdy slouží k pomnožení bakterií, druhý den po inokulaci vyočkováváme z tekuté na pevnou půdu a po nárůstu kolonií porovnáváme výsledky kultivace (7).

4.4.1.5 Růst kolonie na pevných půdách

Po naočkování bakteriální kultury a proběhnuvší kultivaci (obvykle 18-24 hodin) si u narostlých kolonií všimáme celé řady vlastností. V tzv. *primokultivaci* naroste většinou směs různých kolonií (patogenní, ale i fyziologická flóra), které musíme od sebe nejprve odlišit a pak je teprve jednotlivě popisujeme. Popis kolonie buď končí předběžným určením bakteriálního druhu a jeho patogenního významu vzhledem ke klinickému obrazu, které je nutno potvrdit nebo určením dalších postupů nutných k identifikaci - izolace (tzn. Jednu kolonii nabereme bakteriologickou kličkou a rozočkujeme na čistou půdu, po inkubaci získáme čistou kulturu 1 bakteriálního druhu.), identifikační testy a zjištění citlivosti na ATB (7).

a. Charakteristiky bakteriálních kolonií - obrázek 10 (7)



b. Popis kolonie na pevné půdě

- Druh vzorku, půdy, datum a délka inkubace
- Velikost kolonie - vyjádříme v mm velikost posledních izolovaných kolonií
- Tvar kolonie - hodnotíme pohledem shora (okrouhlý, nepravidelný, neohrazený = povlak)
- Profil kolonie - vypouklý, plochý, nepravidelný, plochý s propadlým středem,...
- Povrch kolonie - lesklý, hladký, matný, nerovný
- Barva kolonie - často našedlé, kolonie tvořící pigment s výraznější barvou - bílé, okrové, žluté, černé. Někdy pigment difunduje do půdy.

- Konzistence kolonie - konzistenci zkusíme kličkou, může být mazlavá, drobivá, gumovitá, hlenovitá konzistence bývá v M-fázi (pouzdro a slizová vrstva).
- Zápach - někdy může být typický pro bakterii (Pseudomonas - jasmín), příjemný nebo nepříjemný
- Vztah mikrobů k půdě - bývá často diagnosticky významný. Vrůstání do půdy, lýza erytrocytů v KA - hemolýza úplná či neúplná, přeměna hemoglobinu na methemoglobin - viridace. Vztah k diagnostickému principu půdy dle změny indikátoru - zkvašování laktózy na EA a DC agaru, tvorba H₂S na DC agaru
- Vztah mikrobů navzájem = podpora růstu sousedních kolonií značí sympiózu, inhibice antibiózu. *Příkladem je růst kolonií Haemophila pouze v zóně hemolýzy současně rostoucího Staphylococca aurea (= satelitismus) (7).*

4.4.2 Tradiční metody

Klasické mikrobiologické zkušební metody jsou často rozdělené do tří hlavních kategorií, které jsou založené na charakteru testu. Tyto kategorie jsou (24):

1. Přítomnost nebo nepřítomnost mikroorganismů například detekce patogenů, nepřítomnost nežádoucích organismů, testy sterility.
2. Kvantitativní stanovení mikroorganismů například testování biozátěže. Jedná se o stanovení biozátěže nebo o stanovení limitních testů ve farmaceutických vzorcích. Tyto vzorky vyžadují mikrobiologickou kontrolu během zpracování a kvantitativní stanovení nám určí, zda produkt vyhovuje lékopisným požadavkům (Ph. Eur. nebo USP).
Biozátěž, podle definice University of Rochester glossary, je počet mikroorganismů, kterým je vzorek kontaminovaný. Udává se jako CFU (colony forming unit) neboli KTJ (kolonii tvořící jednotky) na gram produktu (33). Limity bakteriálního zatížení u jednotlivých vzorků udávají lékopisy.
3. Identifikace mikroorganismů (24).

Toto rozdělení odpovídá **třem specifickým otázkám:**

1. Je ve vzorku přítomen mikroorganismus? (přítomnost nebo nepřítomnost)
 2. Jaký je počet mikroorganismů? (počet)
 3. Jaké druhy mikroorganismů se ve vzorku nacházejí? (identifikace)
- (24)

4.5 Rychlé mikrobiologické metody - rapid microbiological methods (RMM)

Klasické systémy pro rychlé metody jsou založené na tom, jak technologicky pracujeme (24).

4.5.1 Metody měřící růst mikroorganismů

Tyto metody jsou založené na měření biochemických nebo fyziologických parametrů, které odrážejí růst mikroorganismů. Patří k nim tyto metody:

a. *Adenosin trifosfonát (ATP) bioluminiscence*

Typ metody : Růstově založený

Předpoklad metody: ATP je přítomné ve všech žijících buňkách. V přítomnosti substrátu D-luciferinu, kyslíku a hořčnatých iontů, enzym luciferáza bude využívat energii z ATP, bude okysličovat D-luciferin a produkovat světlo. Množství světla nebo bioluminiscence vyprodukované může být měřena citlivým luminometrem a je úměrný množství ATP ve vzorku. Vydávané světlo je obvykle vyjádřené jako relativní světelné jednotky (RLU) spíše než jako přímý odhad mikrobiálních čísel. Výsledky těchto technologií vedly k vytvoření studií pro srovnání souvztažnosti mezi RLU ukazovanými údaji a přibližnému množství organismů.

Tyto kalibrační křivky jsou užívány pro překlad nezpracovaných RLU dat k lepšímu zpracování a popisu organismu - kvantitativní vyjádření dat. ATP bioluminiscence snižuje testovací dobu požadovanou v tradiční metodě o jednu třetinu. ATP bioluminiscence může být užívána pro analýzu filtrovaných i nefiltrovaných vzorků.

Komerční dostupnost systému: Pall Check (Pall Life Sciences), Milliflex (millipore Corporation), Rapiscreen (Celsis) a novaLUM (Charm).

Další informace: Většina z ATP - základních systémů jsou kvantitativní. Schopnost těchto přístrojů může zvýšit použití vhodného softwaru. (24).

b. *Kolorimetrická detekce vyprodukovaného oxidu uhličitého*

Typ metody: Růstově založený.

Předpoklad metody: Jak jednotlivé mikroorganismy rostou, produkují oxid uhličitý. U této metody se sleduje pomocí kolorimetrické detekce produkovaného CO₂ přítomnost mikroorganismů ve vzorku. Tato přítomnost se zjistí barevnou změnou a určíme pozitivní zkušební vzorek. Tyto přístroje jsou často považované za neinvazivní mikrobiální identifikační systémy a dovolují určit velké množství vzorků. Tyto přístroje jsou běžně užívány klinicky při hemokultivaci. V roce 2004 byla tato metoda schválena FDA a používá tuto metodu (s BacT/Alert systémem) pro testování sterility.

Komerční dostupnosti systému: BacT/Alert (bioMerieux) a ESP Microbial Detection System (AccuMed).

Další informace: Tato technologie může být užitečná pro pomalu rostoucí organismy, například mycobacteria (25).

c. *Fluorescenční detekce oxidu uhličitého*

Typ metody: Růstově založený.

Předpoklad metody: Tato metoda umožňuje nepřetržité sledování případné produkce CO₂ na základě znečištění používaného fluorescenčního oxidu uhličitého. pH citlivé, fluorescenční senzory CO₂ na základě počítačových algoritmů zachytí zvýšenou rychlost změny produkce CO₂ a jeho trvalé zvýšení.

Komerční dostupnosti systému: Bactec (Becton Dickinson a Company) (26).

d. *Měření změn prostorového tlaku plynů (head space pressure) v kultivačních nádobách*

Typ metody: Růstově založená.

Předpoklad metody: Elektronické snímače změní pozitivní nebo záporný tlak plynů měnící se v prostoru každé kultivační nádoby. Tyto změny jsou způsobené mikrobiálním růstem. Jestliže růst způsobuje významnou produkci nebo spotřebu plynu, vzorky jsou označeny jako pozitivní. Velká množství vzorků mohou být umístěny v těchto zkušebních přístrojích s rychlým monitorováním směrovaného prostorového tlaku. Tyto systémy umožňují nepřetržité a automatizované sledování mikrobiálních kultur.

Komerční dostupnosti systému: BacT/Alert (bioMerieux) a ESP Microbial Detection System (AccuMed) (25).

e. *Impedance (elektrochemické) metody*

Typ metody: Růstově založený.

Předpoklad metody: Rostoucí mikroorganismy metabolizují velké komplexní prvky jako proteiny a sacharidy, přeměňují je na menší elektricky nabitější produkty jako jsou aminokyseliny, oxid uhličitý a kyseliny. Tyto menší vedlejší produkty z výměny látek vytvoří a nakonec změny elektrické vodivé vlastnosti růstového prostředí. Při aplikaci střídavého elektrického proudu přes elektrody k těmto růstovým médiím, můžeme pozorovat změnu v impedanci. Impedance je rezistence k toku střídavého proudu skrz vodivý materiál. Mikrobiální identifikační systémy založené na technologii impedance jsou rozděleny do dvou typů systémů: přímá a nepřímá impedance. Přímé impedanční systémy fungují odhalováním změn v elektrické měrné vodivosti růstových médií, v době kdy střídavý proud prochází přes obě elektrody. Nepřímé impedanční systémy fungují na základě detekce vyprodukovaného oxidu uhličitého, organismy schopnými metabolismu, za použití chemických reagentů jako je hydroxid draselný. Když je oxid uhličitý ionizovaný, mění výslednou impedanci. Není zde žádný přímý kontakt mezi elektrodami a stadii mikroorganismů při zkoumání. Pokud se mikroorganismy množí, práh detekce dosahuje nad elektrický signál dosažitelným oběma druhy systémů. Obecně, tento limit detekce je přibližně 10⁶ CFU/ml pro mnoho mikrobiálních druhů.

Komerční dostupnosti systému: Bactometer (bioMerieux), BacTrac (Sy Lab), RABIT (don Whitley Scientific Ltd), a Malthus Microbial Detection System (Malthus Diagnostics, Inc.) (25).

4.5.2 Metody určující životaschopnost mikroorganismů

Tyto druhy metod nevyžadují růst mikroorganismů. Tyto metody jsou užívané pro detekci a počítání buněk, které jsou životaschopné. Tyto metody zahrnují (24):

a. *Cytometrie na pevné fázi*

Typ metody: Detekce životaschopných mikroorganismů.

Předpoklad metody: Cytometrie na pevné fázi používá membránovou filtraci pro oddělení potenciálních mikrobiálních kontaminujících látek z filtrovatelných vzorků před označením zachycené buňky s univerzálním životaschopným substrátem. Uvnitř cytoplazmy metabolicky aktivních mikroorganismů je nefluorescenční substrát ihned enzymaticky rozštěpený a uvolňuje se volný fluorochrom díky všudypřítomnému hydrolytickému enzymu esterasy. Jen životaschopné mikroorganismy s neporušenou membránou udrží ve vzorku markery použité pro označení. Laserový detektor poté automaticky skenuje membránu, a stanovuje počet fluorescenčně označených buněk. Cytometrie na pevné fázi eliminuje potřebu buněčného množení. Citlivost k jednotlivé buněčné úrovni je vhodná, nezávislá na objemu filtrovaného vzorku. Navíc u vegetativních buněk, můžeme touto technikou zachytit výtrusy (bakteriální a houbovitě), poškozené organismy a oslabené organismy. „Real – time“ získání výsledků je během dvou až pěti hodin od prvotní úpravy vzorků. Cytometrie na pevné fázi se používá pro testování farmaceutické čištěné vody (FDA schválila v únoru 2004 a ve Spojeném království v roce 2000).

Komerční dostupnosti systému: ScanRDI (AES Chemunex) (25).

b. *Průtoková fluorescenční cytometrie*

Typ metody: Detekce životaschopných mikroorganismů .

Předpoklad metody: Princip průtokové cytometrie – v roztoku jsou mikroorganismy označené s nefluorescenčním markrem. Marker proniká do buňky a rozštěpí se vnitrobuněčnou aktivitou enzymů a tím se produkuje fluoreskující substrát. Označený vzorek je automaticky vstříknutý do křemenné průtokové kyvety, kterou prochází každý mikroorganismus jednotlivě skrz laserový paprsek pro detekci. Zbarvené a identifikační mechanismy jsou podobné jako pevné fáze cytometru. Průtokový cytometr detekuje organismy v roztoku a ne v pevné fázi. Umožňuje testovat i nefiltrovatelné roztoky. Výsledky jsou získány do 2 hodin. Limit detekce je přibližně 100 CFU na ml.

Komerční dostupnosti systému: D-count (AES Chemunex) a RBD3000 (AATI).

Další informace: V praxi jsou dostupné jak jednoduché manuální systémy, tak vysoce automatizované jednotky s vysokou zkušební potenciální výkonností (27).

4.5.3 Metody zjišťující přítomnost nebo nepřítomnost buněčných komponent nebo artefaktů

Tyto metody hledají pro detekci nebo identifikaci specifickou buněčnou komponentu nebo artefakt uvnitř buňky. Tyto metody zahrnují (24):

a. Ramanova spektroskopie

Typ metody: Detekce buněčných komponent.

Předpoklad metody: Ramanův spektrofotometr může generovat jedinečné spektrum mikroorganismu. Vzorky se porovnávají s databází spekter známých mikroorganismů. Spektroskopická metoda měřící spektrum elektromagnetického rozptýleného záření díky Ramanově jevu. Ramanův jev (neelastický rozptyl) způsobuje, že rozptýlené záření má nepatrně odlišnou vlnovou délku od vstupujícího záření díky účasti vibračních přechodů v energetických stavech molekuly. Ramanova spektroskopie poskytuje informace o struktuře a prostorovém uspořádání molekuly a poskytuje v zásadě doplňkové informace k infračervené spektroskopii. Jako zdroj světla se používá obvykle výkonný pulsní laser.

Tato metoda má celou řadu aplikací. Jednou z nejznámějších je zjišťování rakovinných buněk v ranném stadiu. V blízké budoucnosti lze očekávat, že bude možné použít malé detekční sondy s optickými vlákny a automatizované mikroskopové systémy, které umožní pořízení spektra lidské tkáně, což u pacientů zrychlí ambulantní diagnózu potenciálních karcinomů (25).

b. Hmotnostní spektrometrie (Matrix - Assisted Laser Desorption - Time Flight, MALDI- TOF)

Typ metody: Detekce buněčných komponent.

Předpoklad metody: Když zahřejeme mikrobiologický izolát ve vakuu, mohou být plynné specifické produkty analyzovány hmotnostní spektrometrií. Spektrum může být vygenerováno a identifikováno ve srovnání s databází známých organismů. Když podrobíme intenzivní ionizaci (MALDI TOF) zdravé buňky, ve vzorcích se uvolní nabitě částice. Tyto vzorky se srovnávají s databází známých mikroorganismů.

Komerční dostupnosti systému: MALDI TOF (Kratos Analytical systems) a Voyager (Perspective Biosystem).

Další informace: Tato metoda je užívána pro mikrobiální identifikace. Velikost databáze je důležitá ve vyhodnocení efektivity systému (25).

c. *ELISA - Enzym-Immunsorbentní zkouška čistoty*

Typ metody: Založená na detekci buněčných komponent.

Předpoklad metody: **ELISA** (z angl. **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**), někdy také označovaná jako **EIA** (**Enzyme Immunoassay**) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek. Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a v druhé řadě pak schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. Pro průkaz specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu:

- Přímá ELISA - pro detekci antigenu.
- Nepřímá ELISA - pro detekci specifických protilátek.
- Přímá sendvičová ELISA - pro detekci antigenu.
- Nepřímá sendvičová ELISA - pro detekci specifických protilátek.

Vesměř se jedná o přesné a rychlé screeningové metody, které umožní získání výsledků několikanásobně dříve a levněji, než při použití tradičních metod. Používá se v potravinářském průmyslu a lékařské mikrobiologii. Komerční dostupnosti systému: VIDAS a Mini - VIDAS (bioMérieux), Tecra Salmonella ELISA (International Bioproducts), a Salmonella Tek ELISA (Organon Teknika) (25, 28, 29, 30).

d. *Fluorescenční sondové detekce*

Typ metody: Kombinace, detekce buněčných komponent a nukleových kyselin.

Předpoklad metody: Sondy nukleových kyselin jsou navrženy k tomu, aby přilnuly na specifická cílová místa na buňkách nebo na specifická cílová místa v buňkách samotných. Sondy obsahují molekulu, která je schopná fluoreskovat, když je povzbuzena zdrojem energií jako je např. laser. (s detekcí viditelné nukleové kyseliny)

Komerční dostupnosti systému: RBD3000 (AATI) (27).

e. *Limulus Amebocyte Lysate Endotoxin (LAL) Test*

Typ metody: Detekce buněčných komponent.

Předpoklad metody: Používaný lyzát améboctů získaný z ostrorepa amerického (*Limulus*) se využívá k detekci přítomnosti bakteriálních endotoxinů. Stanovení množství přítomných endotoxinů vyžaduje použití standardů, které byly při měření kvalifikované nebo licencované. Dostupné jsou tři různé metody: gelová sraženina, turbidometrická a chromogenní metoda.

Komerční dostupnosti systému: Pyrogen Gel Clot (BioWhittaker), Pyrotell (Associates Cape Cod), BioTek, a ruční jednotka (Charles Rivers Endosafe). Další informace: Tato metoda nahrazuje pyrogenní test na králících. Mnoho systémů je dostupných a získaly rozšířené regulační přijetí. Několik

charakteristických rysů jako pH a přítomné ionty mohou ovlivnit výsledky (25).

4.5.4 Metody detekující nukleové kyseliny

Jako základ jsou využity pro tyto technologie nukleové kyseliny. Technologie tohoto typu zahrnují (24):

a. *Ribotyping*

Typ metody: Nukleově acidobazický.

Předpoklad metody: Tato technologie využívá restriční fragmenty délkových polymorfismů (RFLPs) nukleových kyselin z bakteriálních genomů. Roztříděné RFLPs jsou hybridizované k sondě ribozomální ribonukleotidové kyseliny (RNA). Aplikujeme chemiluminescentní substrát. Pro přeměnu fluorescence RFLPs na digitalizovanou informaci se používá kamera. Datová digitalizovaná informace je zpracována a data extrahována. Vytvořený vzorek se dále identifikuje s databází známých vzorků. Ribotyp je stabilní epidemiologický ukazatel a poskytuje konečnou systematickou informaci.

Komerční dostupnosti systému: MicroSeq 16S rDNA Bacterial Identification System (Applied Biosystems) and Riboprinter (DuPont Qualicon).

Další informace: „Ribotyping“ je považovaný za standard pro identifikaci mikroorganismů (25).

b. *Detekce nukleotidů*

Typ metody: Nukleově acidobazický.

Předpoklad metody: Dostupná data ze sekvencí pořadí nukleových kyselin jsou využívána pro výběr požadované nukleové kyseliny. Požadované nukleové kyseliny jsou extrahovány, imobilizovány k pevné fázi, a hybridizovány k označení sondou. Alternativně, extrahované nukleové kyseliny mohou být označeny a hybridizovány k imobilnímu označení sondou.

Komerční dostupnosti systémů: Dostupnost systému závisí na typu požadovaného výsledku. Zahrnují Gene - Trak Systems (gen trak) a Gene - Probe Systems (gen probe).

Další informace: Tato technologie je často užívaná pro charakterizaci nebo identifikaci mikroorganismů a pro detekci patogenů (31).

c. *Detekce deoxyribonukleové kyseliny, Polymerázová řetězová reakce (PCR)*

Typ metody: Nukleově acidobazický.

Předpoklad metody: PCR množí fragmenty nukleových kyselin. Používají se namnožené části nukleových kyselin v dostačujícím množství. Fragment nukleové kyseliny je teplotně denaturován; reakční směs je pak ochlazována a polymeráza začíná vytvářet komplementární část. Následuje další denaturační krok, následovaný dalším polymeračním krokem -

zdvojnásobuje se množství DNA. Několik opakování tohoto procesu produkuje masivní množství DNA. Různorodost PCR metod využívá: opačnou transkripterázu PCR, zmnožení sekvencí nukleových kyselin nebo zmnožení zprostředkovanou transkripcí.

Komerční dostupnosti systému: BAX Microbial Identification System (Qualicon) and Probelia System (BioControl Systems).

Další informace: Tato technologie je široce použita v dalších přírodních vědách, jako antropologie a soudní lékařství (25).

4.5.5 Tradiční metody kombinované s počítačovým zobrazením

Tyto metody zahrnují používání klasické metody zpracování vzorku a následně se využívá zobrazovacího softwaru pro detekci růstu dříve než metoda umožní vizuální růstovou detekci. Ve většině případů se k detekci růstu používá lidských smyslů, které vyžadují růst 10^5 nebo 10^6 buněk. Počítačové zobrazení může detekovat mnohem nižší úroveň buněčného růstu, například méně než 100 buněk (24).

4.5.6 Kombinace různých metod

Tento termín je používán pro charakterizaci těch systémů, které zahrnují více než jednu metodologii nebo test pro dokončení finálního výsledku například systém, který je schopný nejen určit přítomnost a životaschopnost mikroorganismu, ale také mikroorganismus identifikovat (24).

a. *Soustředný oblouk Photovoltaic Detectors snímaný laserem*

Typ metody: Kombinace.

Předpoklad metody: Systém zahrnuje pět soustředných oblouků z photovoltaic detektorů v kruhu jako základ. Vzorek je obohacený suspenzí v kapalině nebo plynu uvnitř ampulky nebo vzorového sběrného zařízení, které je umístěné blízko centra kruhu. Červený laserový paprsek, polovodičového složení prochází vzorkem. Rozptýlené světelné intenzity generují spektrum, které je ve srovnání s knihovnou známých rozptýlených vzorků, které používají statistický klasifikační algoritmus. Znečištění může být identifikováno v sekundách. Díky tomuto rozptylu světla se vzorek stává "otiskem prstu"- typ identifikace pro mikroorganismus. Vzorek zahrnuje velikost částice, tvar částice, a optické charakteristické rysy. Vzorky světla jsou schopné ve vícenásobných úhlech zjistit a odlišit velikost mikroorganismu téměř okamžitě. Identifikace nastává během několika milisekund po té, co částicou prochází paprsek.

Komerční dostupnosti systému: MIT systém (MicroImaging Technologies, Inc.) (32).

4.5.7 Doplnující metoda

a. Barvení dle Grama - všeobecně

Barvení dle Grama je jednou z diagnostických metod, na jejímž základě je rozdělujeme na bakterie grampozitivní (G^+) a gramnegativní (G^-). V přírodě se vyskytují převážně bakterie gramnegativní, z nichž se jedná např. o pseudomonády, enterobakterie, meningokoky, gonokoky. Grampozitivní jsou např. bacily rodu *Clostridium* a *Bacillus*, aktinomycey, mikrokoky, stafylokoky, laktobacily (u virů bílkoviny, někteří prvoci). Tato metoda není ale 100 %, protože existují i variabilní kmeny a skupiny bakterií, které se zařazují do skupiny tzv. gramvariabilních (gramlabilních) bakterií. Jedná se o rody *Bacillus*, *Clostridium*, aktinomycey, korynebakterie, kaulobakterie. Mechanismus tohoto barvení vysvětlují rozdíly v propustnosti (tj. permeabilitě) buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií (krystalová violet a jod reagují uvnitř buňky, čímž vzniká sloučenina obsahující velké molekuly, které u grampozitivních bakterií neprojdou zpět membránou a nejsou rozpustné v alkoholu) a rozdílné vlastnosti protoplazmy (vnější vrstva u grampozitivních bakterií je grampozitivní a obsahuje magnesium ribonukleát, u gramnegativních bakterií tato vnější vrstva a magnesium ribonukleát chybí). V roce 1883 Christiam Gram náhodně objevil způsob, jak odlišit bakterie od buňky tkáně. V patologických preparátech z ledvin chtěl obarvit jejich jádra modře a ostatní cytoplazmu hnědě. Proto zvolil jako barvicí látku anilinovou genciánovou violet, pak Lugolův roztok (umožňující odbarvení a vyjasnění violeti) a výsledný preparát opláchl alkoholem. Na preparátech si všiml, že některé tkáně jsou značně rezistentní vůči odbarvení a jiné naopak se alkoholem snadno odbarvují. Takové preparáty musel ještě dodatečně dobarvovat. Christiam Gram sám nevěděl, jaký převratný objev pro diagnostiku bakterií vynalezl. Teprve až v roce 1886 tento způsob pro diagnostiku gonokoků využil Roux, který tímto způsobem odlišil grampozitivní (G^+ , neodbarvující se alkoholem) a gramnegativní (G^- , odbarvující se alkoholem) bakterie. Od té doby zaznamenalo Gramovo barvení mnoho modifikací. Bylo zjištěno, že Gramova reakce souvisí s vlastnostmi ribonukleových kyselin (ponořením buněk do cholátu sodného je Gramova reakce anulována a opětovně obnovena působením magnesium ribonukleátu). Ribonukleáza specificky odstraní grampozitivní charakter buňky. Neméně souvisí Gramova reakce s lipidy, mastnými kyselinami, bílkovinami, polysacharidy a fosforečnanovými estery. Gramovu reakci může též ovlivnit působení oxidačních činidel, žlučových solí, antibiotik, UV záření, lysozymu či mechanického poškození. Postup Gramova barvení: vzorek se přenesse na podložní sklo a nechá se na vzduchu zaschnout. Následuje fixace. Cílem fixace je kromě stabilizace preparátu i usmrcení buněk, neboť barvení mrtvých buněk dává lepší výsledek. Fixaci lze provést mechanickou či chemickou cestou - při mechanické fixaci se stěr fixuje dvojitým či trojitým protažením nad horní částí svítivého plamene hořáku, celková doba ohřevu nesmí přesáhnout dobu 2 sekund. Fixace se provede

přiložením preparátu k zápěstí - podložní sklíčko musí být horké, nikoliv žhavé (70-80 °C). Při chemické fixaci se preparát ponoří na 10-15 minut do nádoby s fixativem (metylakoholem, acetonem, nebo Nikiforovým činidlem) a po fixaci se usuší na vzduchu.

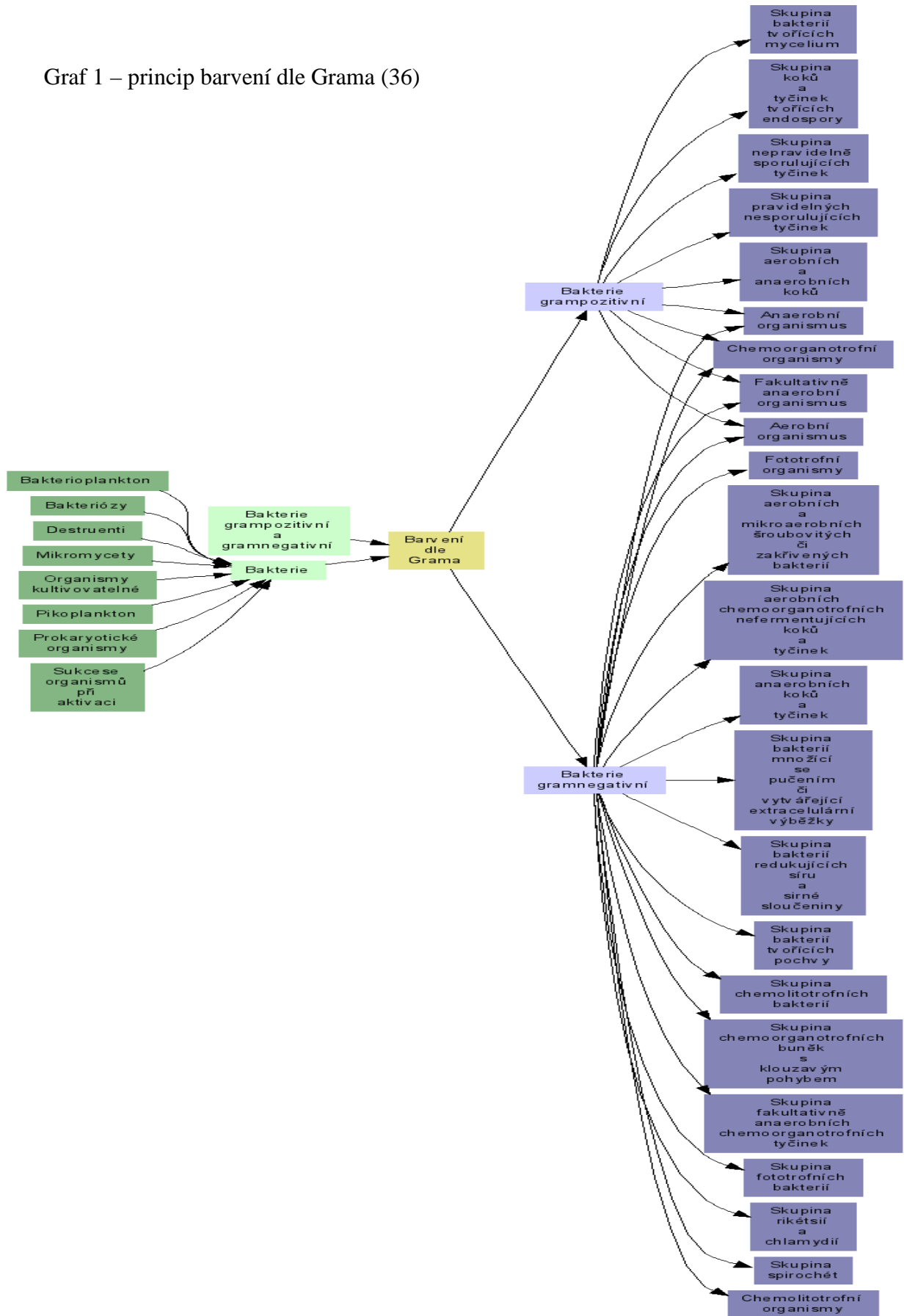
Poté se zaschlý vzorek překryje roztokem, vzniklým smícháním roztoků krystalové violeti (2 g $C_{25}H_{30}ClN_3$ – gentianviolet, crystalviolet s 20 ml 95 % ethanolu) a šťavelanu amonného (0,8 g $(NH_4)_2C_2O_4$ s 80 ml destilované vody). Převrstvení preparátu roztokem trvá 1 minutu, následované rychlým smytím destilovanou vodou během 1 sekundy. Dále se použije Lugolův roztok (1 g jodu, 2 g KI a 300 ml destilované vody), kterým se preparát převrství a poté opláchně vodou za stejných podmínek, jako ve výše popsaném případě. Následuje odbarvení 95 % ethanolem maximálně po dobu 25 sekund. Konečně se preparát dobarví roztokem safraninu (10 ml 2,5 % roztoku $OC_{20}H_{19}ClN_4$ v 95 % ethanolu a 100 ml destilované vody), jehož převrstvení probíhá 1 minutu a oplachuje se během 1 sekundy vodou. Preparát se ponechá zaschnout na vzduchu.

b. Barvení dle Grama jako RMM

Typ technologie: Detekce buněčných komponent.

Předpoklad technologie: Tato technologie užívá jednotlivé roztoky, bez fixace nebo čištění. Výsledky jsou získány za několik minut. Je používán Syto-9, je to fluorescenční červený hexidium jodid zbarvující nukleové kyseliny. Metoda může být použita se smíšenými kulturami. Používá se LIVE Bac Light Bacterial Gram Stain Kit, po kterém se Gram - pozitivní organismy zbarvují načervenalé až pomerančově, a Gram - negativní organismy se zbarvují zeleně až modře. Fluorescenční skvrny mohou být identifikovány a zhodnoceny za použití fluorescenčního mikroskopu (se standardním stanovením fluorescein optickým filtrem) nebo za použití průtokového cytometru. Reagencie byly navrženy k tomu, aby dokázaly odhalit snadno příčinu (skutečné) obarvení. Mrtvé buňky neukážou předpokládaný barevný efekt. Jsou také procedury specifikované pro použití s DEFT. Druhý barvicí prvek - red ViaGram Bacterial Gram stain and Viability Kit - je podobný jako výše popsaný postup, ale využívají se dvě skvrny a tři barvy, tak, že životaschopné a mrtvé buňky mohou být pohotově objeveny, vedle známe Gram reakce. Plazmová blánová integrita je používána jako charakteristický faktor živých bakteriálních buněk. Neporušené membrány jsou detekovány jako modré, zatímco poškozené membrány se barví zeleně. Červená skvrna identifikuje grampozitivní bakterii (36).

Graf 1 – princip barvení dle Grama (36)



4.6 Rychlé metody ve farmaceutické mikrobiologii

Použití rychlých mikrobiologických metod ve farmaceutických laboratořích zlepšilo kontrolu jakosti rozboru vody, produktů, surovin a zvětšila se antimikrobiální účinnost testování farmaceutických hotových produktů. Rychlé uvolnění vzorků umožňuje optimalizaci výroby, testů a umožňuje vysokou výrobní kapacitu a simultánní analýzu farmaceutických firem. ATP Bioluminescence, impedance, přímá detekce životaschopných mikroorganismů a průtoková cytometrie určuje celkový mikrobiální obsah v daném farmaceutickém vzorku zatímco PCR a měření založené na reakci protilátek zjistí přítomnost nebo nepřítomnost specifických mikrobiálních druhů. Rychlé metody poskytnou spolehlivou a cenově příznivou analýzu pro mikrobiologické vyhodnocení farmaceutického prostředí. Dramatické snížení identifikačního času a analýzy, například z 30 hodin na 90 minut, povede použitím rychlých metod ve farmaceutickém průmyslu blíže k reálnému času monitorování procesů a vzorků (38).

4.6.1 Aplikace rychlých mikrobiologických metod

Tabulka č. 1 poskytuje některé z cest rychlých mikrobiologických metod, které mohou být aplikovány ve farmaceutickém prostředí.

Při hodnotícím systému by se měla uvážít různorodost faktorů, které jsou následující:

- Typ požadované technologie a typ mikrobiologického vykonaného testu
- Cena pro nákup iniciovaného systému
- Cena za test na pokračujícím základu předešlého testování.
- Schopnost systému ovládat typ vyráběných produktů například filtrovatelnost, rozsah výběru a příslušné limity detekce při testování
- Požadovaná a dostupná výrobní kapacita systému a úroveň automatizace (37).

Tabulka č. 1 Rychlé metody pro určení mikrobiologického obsahu farmaceutických vzorků (38)

Typ metody	Analýzy	Čas detekce (hod)	Limit hraniční detekce (CFU/ml)
ATP Bioluminescence	Veškerý mikrobiologický obsah	24-27	<10*
Přímé počítání životaschopných mikroorganismů	Fyziologicky aktivní bakterie	24	<10
Průtoková cytometrie	Veškerý mikrobiologický obsah	2	<10
Impedance	Veškerý mikrobiologický obsah	24	10 ⁴
PCR	Specifické mikrobiální druhy	24-30	<10*
Detekce imunitních komplexů	Specifické mikrobiální druhy	24	<10*

*po 24 hodinové inkubaci

4.6.2 Průtoková buněčná cytometrie ve farmaceutické mikrobiologii - historie

Průtoková cytometrie od počátku (39) - Předchůdce moderního průtokového cytometru byl totožný s aerosolovým částicovým pultem, který byl navržený k tomu aby analyzoval důlní prach (40). Tento aparát byl používán ve druhé světové válce americkou armádou v experimentech pro detekci bakterií a spor. Gucker a spol. (40) oznámil, že přístroj by mohl být používán společně s biologickými vzorky (identifikace bakterií), také jako detektor částic ve vzduchové suspenzi a aerosolech. Před mnoha lety se průtoková cytometrie začala v mikrobiologii dále používat i jako nástroj pro studii savčích buněk. Původní zařízení mělo včleněno pouzdro filtrovaného vzduchu, které zachycovalo vzorek vzduchu tekoucí do centrální části průtokové komory. Zařízení používané k detekci bylo nedávno vylepšeno a nazváno photomultiplier tube (fotonásobič). Počítání částic je založeno na Coulterově objevu impedančního způsobu detekce částic, ve kterém rozdíl mezi elektrickou měrnou vodivostí mezi buňkami a prostředím, ve kterém jsou rozptýleny, je měřena změna elektrické impedance vyprodukovaná tím, jak buňky prochází skrz vstupní otvor. Počítání částic impedanční metodou je postup, který kombinuje počítání částic, např. buněk (vedoucí k druhu veličiny "počet entit") a určování jiných vlastností (objem buněk a podobně). Metoda měří počet částic na základě změny vodivosti prostředí při průchodu buňky mezi elektrodami. Vzorek je pro měření naředěn elektricky vodivým diluentem. Počet buněk je měřen ve velmi přesném malém množství ředěného vzorku. Na základě údajů o počtu buněk, počítaném objemu vzorku a ředění je vypočten výsledek, který lze vydat například jako početní koncentraci. Podle amplitudy signálu lze odvozovat velikost buněk, výsledek lze vydat například jako entitní objem.

Tyto přístroje byly a jsou široce aplikovány v hematologických studiích. Nicméně, první skutečný průtokový cytometr byl postavený Kamenským a spol. (41), využívá spektrofotometrické techniky, detekuje a měří nukleové kyseliny a rozptyl světla uvolněných buněk v pohyblivém toku. Ve stejnou dobu Fulwyler, pracující v Los Alamos Scientific laboratory, popisuje poprvé průtokový cytometr s tříděním kvalifikace. (42) Tento přístroj pracoval na principu měření buněčných částí, získaných z Coulterova impedančního způsobu detekce částic. Fulwyler upravil přístroj o inkoustový tryskový tiskařský princip, používající elektrostatického vychylování nabitých kapiček jako buněčně třídící mechanismus. Ve skutečnosti třídící schopnost byla zavedena demonstrováním přesností signálů získaných strojem a přičítání danou distribuci buněčného objemu detekovaného elektronickým signálem ke specifickému buněčnému typu. V průběhu sedmdesátých let, aplikace výsledků z průtokového cytometru přispěla k vyspělému a rychlému výzkumu savčích buněk, ovšem v této době bylo vyvinuto málo přístrojů pro mikrobiologické studie. Následující aplikace pro mikrobiologii z pohledu techniky průtokové cytometrie, byly z počátku vyvinuté tak, aby studie savčí buňky byly očekávané a přizpůsobené pro optické zlepšení průtokových cytometrů a nově vyvinutých fluorochromů. Vývoj obloukové patice žárovek Steenovou skupinou v roce 1979 (43,44) dovolil připustit použití průtokové cytometrie pro základní výzkum bakterií. Díky designu průtokové komory a použití fotonásobiče pro detekci rozptýleného světla je tento přístroj ideální pro studii mikroorganismů. (45,46). Slibný přístroj popisovaný Boyem a Steenem v roce 1983 se stal "silným zdrojem osvětlování" v 90. letech (47). Jako je uvedeno v knize

vydané Davidem Kloudem - Průtoková cytometrie v mikrobiologii (48), ze které se dá dovědět nejvíce mikrobiologických rozměrů buněk a jejich hodnoty. V 90. letech, aplikace průtokové cytometrie se v mikrobiologii významně zvýšil. (49,50,51,52,53).

4.6.2.1 Fluorescenční cytometrie jako prostředek pro detekci mikroorganismů

Flourescenční cytometrie je metoda, která dovoluje analyzovat buňky rychle a jednotlivě a umožňuje kvantitativní analýzu distribucí charakteristických vlastností nebo ostatních vlastností mikroorganismů obsažených ve zkoumaném vzorku. Z tohoto důvodu FCM nabízí mnoho výhod před tradičním měřením při analýze biologických buněk. Historicky byla tato technika široce použitá pro studium savčích buněk, ale její použití v mikrobiologii bylo omezené. Hlavní příčinou je menší velikost mikrobů, která má za následek menší optické signály, které můžou být od nich získány. Vývoj ve světelných zdrojích a optice, společně s jasnějším, druhově- různorodým barvivem redukovala tuto zábranu posledních let a průtokový cytometr je nyní nezbytný nástroj v mnoha mikrobiologických výzkumných organizacích. Fluorescenční cytometrie má rostoucí roli v detekci mikrobů v průmyslových a klinických nastaveních. Monitorování stavu životního prostředí má předejít propuknutí lidských nemocí jako kriptosporidióza a legionářské onemocnění a detekovat biozbraně nebo bioterorismus. K tomu všemu se používá studium průtokové cytometrie. (54).

Je známé, že heterotrofní kultivační metody, nemusí podporovat růst všech životaschopných bakterií přítomných ve vodních vzorcích. Alternativní procedury používající životaschopných ukazatelů a cytometrie byly demonstrující, jak je účinná cytometrie pro rychlý výpočet mikroorganismů ve farmaceutické zkoušené vodě. Chemchrome B který po té, co byl vstřebán buňkami, je přeměněn na fluorescenční produkt esterásovou aktivitou. Je užíván pro barvení životaschopné bakterie zachycenou membránovou filtrací. Označené bakterie jsou spočítány použitím laserového přístroje, ChemScan RDI (Chemunex, Paříž, Francie), který je natolik citlivý, že dokáže zachytit jednotlivé buňky ve vzorku během 90 minut a demonstruje podstatně širší lineární rozsah než konvenční heterotrofní kultivační metoda. (38).

4.6.2.2 Průtoková cytometrie a fluorescenční barvení používané k monitorování mikrobiálních buněk

Ročně jsou analyzována velká množství mikrobiologických vzorků používáním tradičních technik založených na kultivaci příslušné kultury. Tyto techniky trvají hodiny až dny než získáme výsledek, jsou pomalé a nejsou vhodné pro obtížně kultivované mikroorganismy. Dále, kultivačně založené techniky neposkytnou skutečnou informaci o fyziologickém stavu organismu in situ, který je důležitý v průmyslové výrobě mnoha mikrobiálních produktů. Průtoková cytometrie nabízí získání skutečné mikrobiální analýzy jednotlivých mikroorganismů, bez závislosti na mikrobiální kultuře. V současné době, je metoda průtokové cytometrie omezena na jednoduché rozbory, například zkouška čistoty pro přítomnost celkového nebo životaschopného množství mikroorganismů. Nicméně, metody umožňují selektivně označit specifické druhy mikroorganismů. Například, fluorescenční protilátky mohou být užívány pro označení mikroorganismů podle exprese zvláštních antigenů, fluorescenční in situ hybridizace označující se podle fylogeneze

enzymatických substrátů, které se označují podle exprese specifických aktivit enzymů. Jsou také dostupné ty, které barví dostatečně a jasně viry a umožňují jejich přímou detekci v prostředích jako je např. mořská voda. Mikroorganismy mohou být detekovány v různých vzorcích (například., voda, bláto, jídlo, nápoje) a tyto vzorky mohou být v přírodě vysoce proměnné (například., voda z vodovodu ve srovnání s říční vodou). Mnoho vzorků má vysoké pozadí autofluorescence (například., řasy a minerály ve vodních vzorcích) nebo se mohou nespecificky poutat do používaných fluorescenčních biologických reagensů (například., bílkovinné micely v mléce). Formulace biologických reagensů a vzorově předběžné úpravy jsou rozhodující pro vývoj vhodných mikrobiologických zkoušek čistoty (1).

4.6.2.3 Validace cytometrické metody pro mikrobiologickou kontrolu jakosti farmaceutických produktů

Proces a kontrola hotových výrobků vyžaduje implementaci přísných a regulovaných mikrobiologických analýz. Všechny metody analýzy definovány v evropském a US lékopisu jsou založené na růstu mikroorganismů s inkubační fází na Petriho miskách po několik dnů; za těchto podmínek, se mikrobiologický výsledek stává rozhodujícím bodem, který ovlivňuje celou logistiku. Firma SPI Pharma Company, začala instalovat a validovat nové rychlé mikrobiologické metody založené na technologii označení životaschopnosti v kombinaci s detekcí průtokové cytometrie, který poskytuje firma Chemunex. S instalací této rychlé metody v laboratořích kontroly kvality, jsou nyní mikrobiologické výsledky pro zpracování dostupné už ve 24 hodinách. Při zachování úrovně kvality dochází k snižování výdajů skladování a logistiky.

V evropském lékopisu jsou popsány a také citované i jiné způsoby, které byly užívány a schopny rovnocennosti mezi rychlou metodou a konvenční metodou demonstrační. Implementace této nové metody průtokové cytometrie (BactiFlow) byla validována odstavcem 5.1.6 ze současně platného Evropského lékopisu (55,56).

4.6.3 AES Chemunex – Francie

AES Chemunex je první výrobce, který má od roku 1980 vyvinutou celou řadu přístrojů pro mikrobiologické laboratoře. Společnost získala osvědčení validací hlavních metod jako je skenování laserem - cytometrie, molekulární biologie, kultivační média nebo metrologie. Tyto různé metody se provádějí v 6 specializovaných odděleních (57).

4.6.3.1 ChemScan RDI

Představuje kombinaci rychlosti a přesnosti. ChemScan zahrnuje tři kroky: membránovou filtraci, označení buňky a měření laserem. Celkový životaschopný počet byl založený na důkazu aktivity enzymů a membránové integrity. Zkoumání membrány laserem odhalilo přítomnost mikroorganismů a zpracování signálů z fotonové trubice (PMT) bylo založeno na rozlišování barev, signálních tvarech a světelné intenzitě. Mikroskop měl automatizovaný stupeň a výsledkem byla snímací mapa. Možná byla i detekce jednotlivých buněk bakterií, kvasinek, plísní nebo výtrusů, výsledky byly získané po 2 hodinách a byly

nezávislé na stavu kultury. Dobře byly zobrazeny zraněné, přetížené a choulostivé organismy a analýza mohla být automatizovaná. Omezením bylo, že médium muselo být filtrovatelné, úprava vzorků byla pouze manuální, nebyla zde žádná identifikace mikroorganismů a úpravou vzorků bylo další vyhodnocení obtížné.

ChemScan byl aplikován na obvyklou analýzu farmaceutické vody, k ověřování sterility a mikrobiálního monitoringu během výrobního procesu. Falešné pozitivní výsledky jsou minimální.

ChemScan metoda byla ve srovnání se standardní kultivační metodou sedmkrát citlivější u bakteriové a houbovité kultury. To vše vylepšuje výsledky z hlediska linearit, preciznosti, přesnosti, rozsahu a limitu detekce. V rovnocennosti testování, ChemScan metoda podala lepší výsledky než standardní kultivační metoda v obvyklém monitorování vod.

ChemScan metoda byla užívána pro detekci a spočítání organismů uvnitř biovrstev z *in vivo* a *in vitro* experimentů, a samozřejmě byly získány vyšší počty než ve standardních kultivačních metodách. Vše bylo uzavřeno tím, že ChemScan je výrazně citlivější technologie než kultivace.

V testování sterility je ChemScan ohodnocený jako důkaz správné výrobní praxe, použité technologie, správného principu a vyvinutého zkušebního protokolu. Pro mikrobiologický monitoring byl vyvinutý nový rozpustný mikrobiální snímací materiál pro použití k zachycení na miskách, dále kontaktní povrchové monitorování, aktivní vzorek vzduchu a štěteček na výtěry. Počty byly podobné nebo vyšší než počty kultivačních metod.

Další potenciální aplikace testovaly suroviny a produkty, vzorky prostředí, biozátěž a biologické indikátory. V shrnutí, ChemScan je jedna z aktuálních technologií s citlivostí a „real-time“ výsledky, umožňující monitorování během procesu. Toto vše může potenciálně zvyšovat kvalitu farmaceutických produktů během zpracování a umožňovat rychlé parametrické uvolnění výrobků (58).

- Laser scanning cytometry (ChemScan aparatura)

Optické a elektronické komponenty tohoto systému jsou složeny v kompaktním přístroji.

o *Charakteristika*

Jakmile je vzorek přefiltrován a mikroorganismy jsou zachyceny na filtru, je filtr umístěn do tmavé komory s odpovídající teplotou.

Optický systém: Zdroj excitace je 40mW argonový laser chlazený vodou ve vlnové délce 488nm. Laser provádí kompletní snímání filtru. Snímání je indukované dvěma kmitavými zrcadly, emise jsou detekované ve dvou až třech různých vlnových délkách a snímány dvěma až třemi fotonásobiči.

o *Zpracování dat*

Díky rozdílným kritériím fluorescence jednotlivých elementů můžeme odlišit z celkového počtu ty bakterie, které mají být spočteny a ty, které jsou pro snímání lhostejné. Toto zařízení je založené na optických charakteristických rysech markru, velikosti částice a signálních tvarech.

o *Výsledky*

Výsledky jsou graficky reprezentovány přehledně z filtru s přesnou pozicí objeveného mikroorganismu. Výpočet je vyjádřený mikroorganicky v gramech nebo mililitrech (filtrátu). Výsledky jsou kontrolovány přímým mikroskopickým pozorováním membrány, které dovoluje vizuální detekci mikroorganismů.

○ *Limit detekce*

V nejlepším případě, tato technika je schopná detekce jednoho mikroorganismu na membráně (po filtraci).

○ *Aplikace*

Pro několik aplikací existují různé nástroje detekce a výpočty mikroorganismů epifluorescencí, které zažívají silný rozvoj ve farmaceutickém a potravinovém průmyslovém odvětví.

○ *Proces sterility*

Membránová epifluorescence je specificky přizpůsobená k rozboru vody v různých výrobních stupních pro spočítání celkové životaschopnosti aerobní flóry stejně jako pro kvasinky a plísně. Cytometrické snímání pomocí laseru mohlo být použito pro hodnocení znečištění v produktech před sterilizací a pro provedení testu na sterilitu hotových výrobků.

○ *Nesterilní produkty*

Filtrační cytometrie je vhodná pro kontrolu filtrovatelných produktů bez předešlé inkubace. Průtoková cytometrie je přizpůsobená pro kontrolu nefiltrovatelných produktů, s cíleným obohacením na selektivních či neselektivních médiích, v závislosti na hledaných mikroorganismech.

○ *Zkoušky účinnosti ochranných prostředků, zkoušky z dezinfekčních prostředků a dezinfekce*

Epifluorescence přidružená k životaschopným ukazatelům dovoluje odhad účinnosti ochranných prostředků nebo dezinfekčních prostředků počítáním mikroorganismů v různých časech bez velkého množství kontrolních roztoků.

○ *Studium antibiotik*

Některé aplikace průtokové cytometrie jsou užívané pro zhodnocení efektivity antibiotik na mikrobiální fyziologii použitím specifických životaschopných ukazatelů ve specifických celulárních funkcích.

○ *Produkty biotechnologie*

Cytometrie je užívána pro kontrolování a monitorování kvašení. Cytometrie dovoluje výpočet celkového množství populace nebo životaschopné populace. V některých případech, detekce inokulí kontaminovaných látek během kvašení by mohla být detekována v krátkém časovém intervalu.

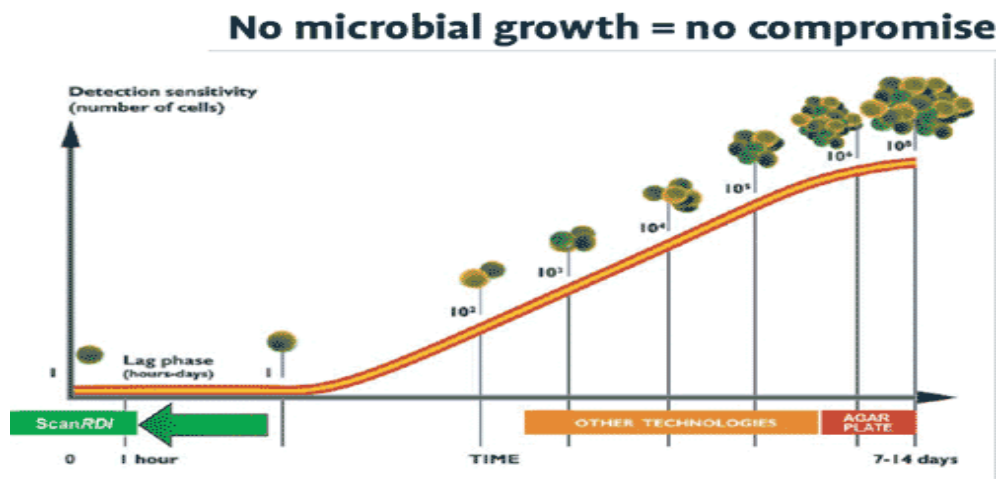
- **Obecný přehled**

S touto jedinečnou kombinací rychlosti a citlivosti, ScanRDI reprezentuje revoluci v mikrobiální detekci. Poprvé, přímé buněčné počítání snižuje čas pro detekci jedné mikrobiální buňky, kdy výsledky mohou být dodány za méně než 90 minut a to jak pro bakterie, tak houby. Dokonce výtrusy, stresované buňky a citlivé organismy mohou být detekovány během 90 minut.

- **ScanRDI: jedinečná kombinace klíčových výkonů**

- Od vzorkování k výsledku během 90 minut
- Citlivost snížena od jedné mikrobiální buňky ve vzorku
- Citlivost nezávislá na objemu filtrování (mohou být testována i velká množství vzorku)
- Není požadované žádné buněčné množení
- Přímá detekce bakterií, kvasinek, plísní a výtrusů
- Přímé buněčné počítání odstraňuje potřebu kalibrování a interpretaci
- Lineární odezva od 1 do 10^5 buněk bakterií a 1 až 10^4 pro kvasinky a další formy
- Nedestruktivní testovací protokol povoluje mikroskopické potvrzení
- Robustní a snadno použitelný (57)

Graf 2 – zobrazení principu závislosti detekce na růstu mikroorganismů (57)



4.6.3.2 Alternativní metody

4.6.3.2.1 BactiFlow, průtoková cytometrie

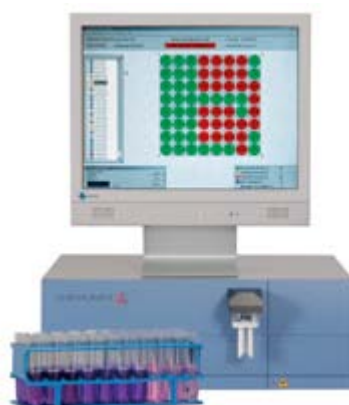
Alternivní způsob užívaný pro validaci je průtokový cytometr přizpůsobený pro mikrobiologii : BactiFlow (Chemunex, Ivry Sur-Seine, Francie). BactiFlow je vybavený zdrojem pevného excitačního laseru s vlnovou délkou 488 nm (obrázek 11). Všechny reagenty a materiál jsou poskytnuté od Chemunex a AES Laboratoire.

Obrázek 11 – BactiFlow (57)



Dvě fotonky s násobičem zachycují fluorescenční světlo vydávané každou označenou buňkou. Získané signály jsou pak automaticky rozlišeny zpracováním dat a tak docílíme poskytnutí rozdílu mezi významnými signály pro výpočet (označené životaschopné mikroorganismy), a pozadím (autofluorescenční částičky). Detekované a spočítatelné mikroorganismy jsou pak zaznamenány a přeloženy bez operátorského tlumočení do odpovědi formou "zeleného" a "červeného světla".

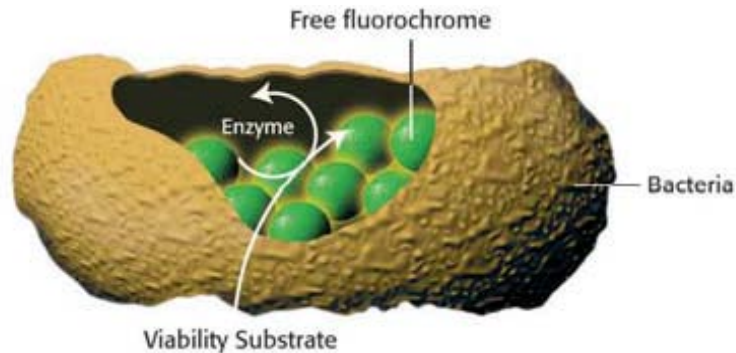
Obrázek 12 – BactiFlow (57)



- *BactiFlow protokol : Test na přítomnost/nepřítomnost mikroorganismů*
Vzorky jsou připravené podle doporučení výrobce. 10 g produktu , který má být analyzovaný je zředěn na 90 ml neutrálním bujonem (ředění dle Evropského lékopisu). Po 2 hodinách od ředění se 10 ml zneutralizovaného produktu umístí do 90 ml výživného bujonu za účelem získat obohacení jednoho gramu produktu. Připravený vzorek je pak inkubovaný 24 hodin při teplotě 32 °C +/- 2 °C předtím, než se použije BactiFlow analýza.

Po obohacení fáze, se vezme 200 µl obohaceného vzorku a podrobí se označení životaschopných mikroorganismů. Falešná skvrna je podána k odstranění profilu indukované matrix. Po té je přidán obarvený roztok umožňující označení životaschopných buněk přeměněn vnitrobuněčnou aktivitou enzymů u mikroorganismů s membránovou integritou. Po 12 minutách se označí při teplotě 30 +/- 2 °C, druhá falešná skvrna obsahující vnitřní standardní kontrolu, která je přidána před vstříknutím vzorku do analyzátoru pro automatické snímání.

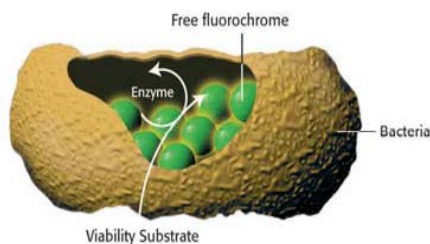
Obrázek 13 a 14 – princip rozkladu fluoreskujících částic u živých mikroorganismů (57)



- *Jedinečná osvědčená technologie*

Chemunex fluorescenční barvicí buněčná technologie byla široce užívána průmyslem více než 15 let a je to zchovalá technologie pro univerzální označení životaschopných bakterií, kvasinek a plísní. ChemScan aplikace využívá stejných fluorescenčních markrů, které jsou schválené FDA. Všechny a také životaschopné mikroorganismy jsou označené, dokonce i při stresových podmínkách, při nedostatku potravy či vody nebo v přítomnosti růstových inhibitorů a nebo pokud jsou zcela nedotčené.

Chemunex technologie poskytuje přímé barvení a detekci, buňku po buňce. To vše poskytuje výsledek spočítání barevných mikroorganismů bez potřeby kalibrační křivky nebo interpretace.



Kritéria životaschopnosti

- Enzymatická aktivita
- Neporušená membrána

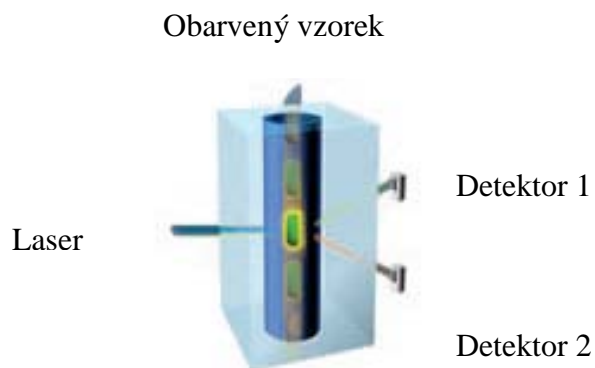
Substrát není mimo buňku fluorescentní

V buňce se substrát štěpí za součinnosti enzymu buňky, který má esterázovou aktivitu a uvolňuje se fluorescenční látka = buňka fluoreskuje.

2 způsoby fluorescence

- a. je fluorescenční celá buňka
- b. je fluorescenční pouze membrána – specifické enzymy, NK sondy, antipody – identifikační testy

Obrázek 15 – princip snímání obarvených bakterií (57)



Jedinečná osvědčená technologie počítá každou životaschopnou buňku po buňce pomocí laseru. Do kapiláry se dávkuje dvě kapaliny (vzorek + kapalina vytvářející kolem proudu vzorku obal – Chemsol S) – Obě kapaliny tečou stejným směrem, ale různými rychlostmi – díky tomu se buňky oddělí a jdou jedna za druhou = princip cytometrie

- *BactiFlow dostupná real - time mikrobiologická analýza*
 - o Kombinování rychlosti a flexibility, tohoto kompaktního mikrobiálního analyzátoru umožňuje real - time analýzu v minutách. *BactiFlow* byl speciálně určený pro malé až střední laboratoře, nabízející vysokou citlivost a snadnou uživatelskou orientaci.
 - o Poloautomatický Real - Time Analyzer (ruční barvení - automatizované snímání)
 - o Až 15 testů za hodinu
 - o Identifikační citlivost snížena ke 100 buňkám na 1 gramu vzorku
 - o Přímé počítání během 1 minuty po označení
 - o Určený pro malé až střední laboratoře
 - o Ideál pro výzkum a vývoj metody (59,60,61)

4.6.3.2.2 *Bacti Flow ALS* (obrázek 16)

Obrázek 16 – *BactiFlow ALS* (57)



- Plně automatizovaný analyzátor (automatické barvení - automatické snímání)
- Kvantitativní výsledky za několik minut
- Kapacita až 23 vzorků na jednu dávku
- Analýza až 25 vzorků za hodinu
- Rychlý výpočet výsledků přítomnosti/nepřítomnosti bakterií
- Identifikační citlivost snížena ke 100 buňkám na 1 gram vzorku
- Určený pro malé až střední laboratoře (57)

4.6.3.2.3 *D-Count*

- plně automatizovaný vysoce průchodnostní analyzátor
- automatizované barvení, snímání a zaznamenávání
- kapacita až 48 vzorků na jednu dávku
- analýza až 50 testů za hodinu (57)

Obrázek 17 – D-Count (57)



5 Experimentální část

5.1 Kultivační metoda

5.1.1 Popis práce:

Vybrali jsme dle vlastností a předpokladu zajímavosti naší práce 10 vzorků – farmaceutických surovin – které jsme podrobily srovnávací zkoušce za použití kultivační metody a rychlé mikrobiologické metody pro stanovení mikroorganismů – průtokové cytometrie. Tyto suroviny jsme nejdříve stanovovali jako sterilní a mikrobiologicky čisté, po té jsme je zatěžovali přibližnou koncentrací v rámci řádu mikroorganismů v 1ml vzorku.

5.1.2 Seznam surovin:

Acidum citricum
Natrii chloridum
Saccharosum
Natrii benzoas
Aroma rubi idaei
Alcoholum isopropylicum
Kapsle modrobílá
Aqua conservans
Aqua purificata
Aqua pro iniectioe

5.1.3 Postup příprava inokula:

- K přípravě inokula používáme kmeny ve formě želatinového disku
- Referenční kultura (RK) je skladovaná v chladničce při 2 – 8°C
- Ožívování kultur ze želatinových disků
 - o lahvičk u s RK vyn dáme z chladničky a necháme 10 min. při pokojové teplotě, aby při otevření nedošlo ke kondenzaci vody v lahvičce.
 - o oživení RK:vyžíhanou a ochlazenou očkovací kličkou nabereme jeden želatinový disk a vložíme do zkumavky s Caso bujonem. Inkubujeme 18-24 hod. při 30-35°C (bakterie).nebo 42-48 hod. při 20-25°C (kvasinky a vláknité houby).
 - o vyočkování oživené RK, ověření čistoty a kvality kmene a příprava pracovní kultury (PK)
 - o bakterie: narostlou kulturu vyočkujeme na Krevní agar a na příslušný selektivní agar a inkubujeme 18 - 24 hod. při 30-35°C.
 - o kvasinky: narostlou kulturu vyočkujeme na Sabouraudův agar a inkubujeme 48 hod při 20 - 25°C.
 - o vláknité houby: narostlou kulturu vyočkujeme na Sabouraudův agar a inkubujeme 5 - 7 dní při 20 - 25°C.

- každá Petriho miska je označena sbírkovým číslem, názvem kmene a pořadovým číslem PK.
 - v případě pochybností o kvalitě RK provedeme mikroskopické zhodnocení a určíme biochemické vlastnosti.
- Použití pracovní kultury (PK)
- takto připravené PK kmenů používáme pro stanovení růstových vlastností hromadně vyráběných živných půd, pro stanovení účinnosti konzervačních látek v přípravných a při validačních zkouškách.
 - každou PK připravenou z RK na želatinového disku lze max. 5x přeočkovat, každé přeočkování značíme římskou číslicí za sbírkovým číslem RK.
 - PK je skladovaná v chladničce při 2 – 8°C
- Doba uchovávání RK
- každá lahvička se želatinovými disky má na obalu vyznačenou
 - dobu použitelnosti. Po uplynutí této doby se zbytek RK dekontaminuje parní sterilizací.

5.1.4 Použité mikroorganismy

K testům byly použity níže uvedené kmeny z České sbírky mikroorganismů (Czech collection of microorganisms = CCM) vydanou Masarykovou univerzitou v Brně

Staphylococcus aureus – CCM 4516
Pseudomonas aeruginosa – CCM 1961
Bacillus subtilis – CCM 1999
Candida albicans – CCM 8226

5.1.5 Příprava inokula aerobních bakterií:

1-3 izolované kolonie z pevné plotny (cca 1 mm³) se naočkuje do 2ml Caso bujonu předeřátého na 36±1°C. Po 4 hod. inkubaci (pro gram pozitivní koky) , po 2 hod. inkubaci (pro gram negativní tyčky) a po 6-ti hod. inkubaci (pro Bacillus subtilis) se přidá 0,05 ml takto narostlé bujónové kultury do 100 ml roztoku NaCl s peptonem a promíchá. Z této suspenze se odebere 0,05 ml a přidá do 100 ml roztoku NaCl s peptonem a rozmíchá. Tímto ředěním (tj. 10²-10³ CFU/ml) se naočkují příslušné testované půdy (viz. 4.4). Plotny se inkubují 24 hod. při 36±1°C, pouze Caso agar se inkubuje při 30-35°C. Kmeny musí vykazovat typický růst (viz 4.5). Současně se provede kontrola velikosti inokula vyočkováním na již prověřené plotny.

5.1.6 Příprava inokula kmene *Candida albicans*

Kmen se naočkuje na Petriho misku se Sabouraudovým agarem a po 48-96 hod. kultivaci při 20 -25°C se odeberou 1-3 narostlé kolonie (cca 1 mm³) a rozmíchají v 10 ml Caso bujonu. Po 48 hod. kultivaci při 20-25°C se přidá 1 ml takto narostlé suspenze do 100 ml roztoku NaCl s peptonem a promíchá. Z této suspenze se odebere 0,1 ml a přidá do 100 ml roztoku NaCl s peptonem. Tímto ředěním se očkují příslušné testované půdy.

Po uplynutí kultivační doby se odečte počet kolonií na pevných půdách.

Počet kolonií na testované půdě se nesmí lišit od počtu kolonií na prověřené půdě max. o ± 30%.

Testovací kmeny musí vykazovat typický růst pro danou selektivní půdu.

Veškeré práce, které byly při kultivační metodě provedeny, byly udělány duplicitně. Výsledky byly sečteny a po té se z nich vytvořil průměr.

5.2 Průtoková cytometrie BactiFlow ALS

5.2.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vodě

5.2.1.1 Použité vzorky:

Aqua conservans
Aqua purificata
Aqua pro iniectioe

5.2.1.2 Princip:

Tento test dovoluje detekci bakterií a kvasinek v mikrobiologickém testování vody. Vzorky jsou ošetřené reagensy, které jsou schopné označit životaschopné mikroorganismy, které jsou potenciálně ve vodě přítomné. Jen životaschopné mikroorganismy jsou schopny enzymaticky rozložit nefluorescenční substrát uvnitř buňky. Uvolňují a kumulují vytvořený fluorochrom. Po té, je vzorek vstříknutý do křemenné průtokové cely BactiFlow ALS, který tvoří úzký a laminární tekoucí proud, který zabezpečí snímání laserem jednoho mikroorganismu po druhém. Citlivé detektory sbírají fluorescenční signály z každé buňky.

5.2.1.3 Přístrojové vybavení

- BactiFlow ALS. Je vyráběn firmou AES Chemunex. Tento analytický systém musí být užíván v souladu s instrukcemi přiložené v manuálu.
- Vortex – Vibromix 104 EV

5.2.1.4 Reagencie

AES Chemunex reagencie potřebné k vykonávání zkoušky čistoty.

- Barvicí činidla

ChemSol B26/1 - tato reagencie je barvicí roztok.

ChemChrome V26 - tato reagencie je barvicí substrát.

CSV a CS26B

CSV - tato reagencie je užívána pro minimalizování fluorescenčního pozadí a validaci analýzy (přítomný fluorescenční projev v roztoku).

CS26B - tato reagencie je užívána pro optimální barvicí krok.

CS26B musí být zředěný do CSV těsně před použitím.

Diluent R a CSR ampulka s práškem - tyto reagencie jsou užívány jako redukční roztok pro volný fluorescein.

CSR musí být rozpuštěný do Diluent R těsně před použitím. Tento finální roztok je stabilní během 2 hodin v přítomnosti reagencie Isored.

NB - změna prachové účinnosti se může vyskytnout pokud se nachází ve vlhkém prostředí. Při skladování musí být ampulka pevně zavřenou.

Isored - tato reagencie je užívána jako zábrana oxidaci ředícího roztoku.

- Reagencie pro úpravu vzorků analyzátozem.

ChemSol S - tato reagencie je užívána jako promývací kapalina pro BactiFlow ALS pro jednotku úpravy vzorků a jako opouzdřovací tekutina pro BactiFlow ALS analyzátor. Vnější opouzdřující tekutina vyvíjí laminární průtok nutný pro analýzu v průtokové kyvetě.

ChemSol S 50X - tato reagencie je koncentrovaná forma ChemSol S. Musí být zředěná před použitím 50krát v 0,2 µm filtrované demineralizované vodě.

Odpěňovač - tato reagencie je užívána v odpadních láhvích (analyzátor a jednotka úpravy vzorků) jako předejití tvorby pěny.

Cleaning 5 - tato reagencie je čistící roztok užíváný pro čištění a asanuje vstříkovací jehlu a průtokovou kyvetu mezi každou analýzou.

Cleaning 3 - tato reagencie je čistící roztok užíváný na konci dne.

- Reagencie denní kontroly.

Standard G - tato reagencie je užívána pro denní kalibraci analyzátoru (fluorescenční kuličky).

5.2.1.5 Technický materiál

- AES Chemunex materiál potřebný k vykonávání zkoušky na čistoty.
- 20 ml zkumavky
- Stojan na 20 ml zkumavky
- ChemFilter D17

5.2.1.6 Postup metody:

Příprava samotného přístroje sestává v umístění potřebných reagensů do daných pozic. K automatickému zařízení jsme připojili roztok ChemSol S a stejně tak i samotnému analyzátoru. K obou jednotkám jsme připojili též prázdné odpadní lahve. Po spuštění přístroje jsme provedli čištění a čekali jsme 10 minut na zahřívání laseru. Po té jsme mohli provést kalibraci pomocí předepsaného roztoku Standart G (protřepat na vortexu po dobu 30 sekund). Po kalibraci jsme se připravili vzorky:

- homogenizovali jsme vzorek vody na vortexu
- odebrali jsme 1 ml vzorku do 20 ml zkumavky (plastová, jednorázová)
- pro negativní kontrolu jsme použili 1 ml roztoku ChemSol B26/1
- ke vzorkům označeným zátěží 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml jsme přidali nainkubované mikroorganismy dané koncentrace v množství 0,1 ml dle stejného postupu jako u kultivační metody.
- zkontrovali jsme teplotu v inkubační mřížce BactiFlow ALS
- vložili jsme jednotlivé zkumavky do inkubační mřížky

Po vložení vzorků do přístroje jsme zadali v softwaru počítače údaje k jednotlivým vzorkům. (zobrazení stejné mřížky v počítači jako samotná mřížka v automatu – možnost popisu každého vzorku zvlášť s potřebnými parametry.) Po té jsme připravovali jednotlivé reagenty pro samotnou analýzu. Dle návodu jsme umístili Cleaning 5 do černého kruhového držáku, ChemSol B26/1 do panelu pro reagenty v automatu do 4.místa zleva a ChemChrom V26, který je umístěn v chladicí jednotce, která udržuje teplotu $2,5^{\circ}\text{C}$ - 5°C . Dále jsme smíchali roztoky CSV a CS 26B, protřepali na vortexu a umístili do panelu pro reagenty v automatu do 3. polohy zleva. Po té jsme připravili redukční roztok rozpuštěním CSR (prášku z jedné ampule) v Diluent R – opatrným otáčením lahvičky o 180° - nesmí se zpěnit. Po rozpuštění jsme přidali 15 kapek Isored, který brání oxidaci. Po té se roztok již nesmí míchat a nesmí být starší než 2 hodiny. Po té jsme umístili roztok Diluent R do panelu pro reagenty v automatu do 2. polohy zleva.

Po těchto krocích se spouští samotná aplikace měření, která trvá kolem 90 minut, pokud máme plnou šarži vzorků, tedy 23 (inkubační mřížka je pro 25 vzorků, ovšem v každé šarži musíme použít negativní a pozitivní kontrolu).

5.2.1.7 BactiFlow ALS barvení, analýza a zobrazování výsledků

Barvení je sekvenční. Příprava vzorku se realizuje v těchto krocích:

- a. Přidání 20 μl ChemChromu V26 a 1000 μl ChemSolu B26/1
- b. Inkubace 10 minut při teplotě $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- c. Přidání 110 μl CSV + CSB26
- d. Inkubace 10 minut při teplotě $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- e. Přidání 13 μl redukčního roztoku Diluent R + CSR + Isored
- f. Homogenizace vzorku
- g. Aplikování do průtokové cely analyzátoru

BactiFlow analyzuje 250 µl obarveného vzorku. Průtok vzorku celou je 180µl za minutu. Po té aplikační rameno BactiFlow ALS nabere 2 ml čistícího roztoku Cleanig 5 a promyje analyzátor mezi jednotlivými vzorky.

Výsledky jsou zobrazovány na počítačové jednotce jednotlivě a postupně v průběhu měření. Výsledky se ukládají automaticky dle času a data měření a dají se vytisknout na příslušný protokol, nikoliv přenést do jiného počítače. Výsledek je počet mikroorganismů v 1 ml vzorku.

Negativní vzorky jsou ve výsledkovém protokolu zobrazovány pomocí zelené barvy, pozitivní pomocí červené. Modrá barva značí špatné provedení analýzy a následné nestanovení výsledku a šedá barva určuje počet dosud nestanovených vzorků. V každém barevném kolečku se ještě objevuje písmeno “V”, které značí, správný průběh analýzy. Hraniční počet mezi pozitivním a negativním vzorkem je v této aplikaci 50 CFU/ml.

V průběhu měření na průtokovém cytometru jsme dělali kontrolní kultivační nárůst, kde jsme vyočkovávali na Caso agar vzorky se zátěží 10^3 CFU/ml.

5.2.2 Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve farmaceutických produktech

5.2.2.1 Použité vzorky

Acidum citricum
Natrii chloridum
Saccharosum
Natrii benzoas
Aroma rubi idaei
Alcoholum isopropylicum
Kapsle modrobílá

5.2.2.2 Princip:

Vzorky jsou ošetřené reagensy, které označí mikroorganismus pokud je přítomen. Jen životaschopné mikroorganismy jsou schopny enzymaticky rozložit nefluorescenční substrát uvnitř buňky. Uvolňují a kumulují vytvořený fluorochrom. Po té, je vzorek vstříknutý do křemenné průtokové cely BactiFlow ALS, který tvoří úzký a laminární tekoucí proud, který zabezpečí snímání laserem jednoho mikroorganismu po druhém. Citlivé detektory sbírají fluorescenční signály z každé buňky.

5.2.2.3 Přístrojové vybavení

- BactiFlow ALS. Je vyráběn firmou AES Chemunex. Tento analytický systém musí být užíván v souladu s instrukcemi přiložené v manuálu.
- Vortex - Vibromix 104 EV
- Inkubátor nastavený na $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.2.2.4 Reagencie

ChemSol S - tato reagencie je užívána jako promývací kapalina pro BactiFlow ALS pro jednotku úpravy vzorků a jako opouzdřovací tekutina pro BactiFlow ALS analyzátor. Vnější opouzdřující tekutina vyvíjí laminární průtok nutný pro analýzu v průtokové kyvetě.

ChemSol S 50X - tato reagencie je koncentrovaná forma ChemSol S. Musí být zředěna před použitím 50krát v 0,2 µm filtrované demineralizované vodě.

Standart G – tato reagencie je používána jako kalibrační roztok.

ChemSol B13 – tato reagencie je používána jako barvicí roztok.

ChemChrome V13 – tato reagencie je barvicí substrát.

CSV - tato reagencie je užívána pro minimalizování fluorescenčního pozadí a validaci analýzy (přítomný fluorescenční projev v roztoku).

CS 13 – je používán k minimalizaci nespecifického záření.

Diluent R a CSR ampulka s práškem - tyto reagencie jsou užívány jako redukční roztok pro volný fluorescein.

CSR musí být rozpuštěný do Diluent R těsně před použitím. Tento finální roztok je stabilní během 2 hodin v přítomnosti reagencie Isored.

NB - změna prachové účinnosti se může vyskytnout pokud se nachází ve vlhkém prostředí. Při skladování musí být ampulka pevně zavřenou.

Isored - tato reagencie je užívána jako zábrana oxidaci ředícího roztoku.

Odpěňovač - tato reagencie je užívána v odpadních láhvích (analyzátor a jednotka úpravy vzorků) jako předejití tvorby pěny.

Positivní kontrola B – tato reagencie je složena ze dvou bakteriálních druhů (G- a G+) a je používána jako pozitivní kontrola v průběhu každé dávky. To vše je zajištěno 5 lenticely, které obsahují živé zamražené mikroorganismy.

Cleaning 5 - tato reagencie je čistící roztok užíváný pro čištění a asanuje vstříkovací jehlu a průtokovou kyvetu mezi každou analýzou.

Cleaning 3 - tato reagencie je čistící roztok užíváný na konci dne.

ChemBoost C - Sterilní bujón ve 100 ml lahvičce – tento bujón je používán pro zajištění neutralizace a pro růst mikroorganismů.

5.2.2.5 Technický materiál

- AES Chemunex materiál potřebný k vykonávání zkoušky na čistoty.
- 20 ml zkumavky
- Stojan na 20 ml zkumavky
- ChemFiltr D17
- ChemFiltr 25

5.2.2.6 Postup metody:

Příprava samotného přístroje sestává v umístění potřebných reagensů do daných pozic. K automatickému zařízení jsme připojili roztok ChemSol S a stejně tak i samotnému analyzátoru. K obou jednotkám jsme připojili též prázdné odpadní lahve. Po spuštění přístroje jsme provedli čištění a čekali jsme 10 minut na zahřívání laseru. Po té jsme mohli provést kalibraci pomocí předepsaného roztoku Standart G (protřepat na vortexu po dobu 30 sekund). Po kalibraci jsme se připravili vzorky:

5.2.2.6.1 Růst mikroorganismů:

- 1g vzorku jsme přidali do 100 ml ChemBoostu C. Lahvičku jsme nechali inkubovat 24 hodin při teplotě $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Positivní kontrolu jsme připravili obdobným způsobem za použití předepsané lenticely pozitivní kontroly, které obsahuje fluoreskující částice a živé mikroorganismy a nechali jsme jí také inkubovat 24 hodin v ChemBoostu C při teplotě $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Negativní kontrola byla samotný ChemBoost C, který se inkuboval také 24 hodin při teplotě $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Po té příprava vzorků a reagensů probíhala obdobně jako při stanovení vody.

5.2.2.7 Příprava vzorku

- po 24 hodinové inkubaci jsme lahvičky s ChemBoostem C a 1g vzorku protřepali a odebrali jsme přes ChemFiltr 25 50 μl vzorku a napipetovali jsme toto množství do 20 ml zkumavky.
- přidali jsme ke vzorkům označeným zátěží 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml nainkubované mikroorganismy dané koncentrace v množství 0,1 ml dle stejného postupu jako u kultivační metody.
- zatížení vzorků jednotlivými koncentracemi mikroorganismů proběhla těsně před samotným měřením.
- zkontrovali jsme teplotu v inkubační mřížce BactiFlow ALS
- vložili jsme jednotlivé zkumavky do inkubační mřížky

Po vložení vzorků do přístroje jsme zadali v softwaru počítače údaje k jednotlivým vzorkům. (zobrazení stejné mřížky v počítači jako samotná mřížka v automatu – možnost popisu každého vzorku zvlášť s potřebnými parametry.) Po té jsme připravovali jednotlivé reagensie pro samotnou analýzu. Dle návodu jsme umístili Cleaning 5 do černého kruhového držáku, ChemSol B13 do panelu pro reagensie v automatu do 4.místa zleva a ChemChrom V13, který je umístěn v chladicí jednotce, která udržuje teplotu $2,5^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$. Dále jsme umístili po 30 vteřinovém protřepání na vortexu roztok CSV do panelu pro reagensie v automatu do 3. polohy zleva. Po té jsme připravili redukční roztok rozpuštěním CSR (prášku z jedné ampule) v Diluent R – opatrným otáčením lahvičky o 180° - nesmí se zpěnit. Po rozpuštění jsme přidali 15 kapek reagensie Isored, který brání oxidaci. Po té se roztok již nesmí míchat a nesmí být starší než 2 hodiny. Po té jsme umístili roztok Diluent R

do panelu pro reagentie v automatu do 2. polohy zleva. Po té jsme umístili poslední reagentii CS 13 do panelu pro reagentie v automatu do 1. polohy zleva.

Po těchto krocích se spouští samotná aplikace měření, která trvá kolem 60 minut, pokud máme plnou šarži vzorků, tedy 23 (inkubační mřížka je pro 25 vzorků, každá šarže musí obsahovat negativní a pozitivní kontrolu).

5.2.2.8 BactiFlow ALS barvení, analýza a zobrazování výsledků

- do každého vzorku rameno naaplikuje $25 \mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}$ CS 13

Barvení je sekvenční. Příprava vzorku se realizuje v těchto krocích:

- a. přidání $10 \mu\text{l} \pm 2 \mu\text{l}$ ChemChromu V13 a $875 \mu\text{l} \pm 90 \mu\text{l}$ ChemSolu B13
- b. Inkubace $12 \text{ minut} \pm 60 \text{ sekund}$
- c. Přidání $50 \mu\text{l} \pm 5 \mu\text{l}$ CSV
- d. Přidání $30 \mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}$ redukčního roztoku Diluent R
- e. Inkubace $150 \text{ sekund} \pm 15 \text{ sekund}$
- f. Aplikování do průtokové cely analyzátoru

BactiFlow analyzuje $100 \mu\text{l}$ obarveného vzorku. Průtok vzorku celou je $180 \mu\text{l}$ za minutu. Po té aplikační rameno BactiFlow ALS nabere 2 ml čistícího roztoku Cleanig 5 a promyje analyzátor mezi jednotlivými vzorky.

Výsledky jsou zobrazovány na počítačové jednotce jednotlivě a postupně v průběhu měření. Výsledky se ukládají automaticky dle času a data měření a dají se vytisknout na příslušný protokol, nikoliv přenést do jiného počítače. Výsledek je počet mikroorganismů (CFU) v 1 ml vzorku.

Negativní vzorky jsou ve výsledkovém protokolu zobrazovány pomocí zelené barvy, pozitivní pomocí červené. Modrá barva značí špatné provedení analýzy a tím nestanovení výsledku a šedá barva určuje počet dosud nestanovených vzorků. V každém barevném kolečku se ještě objevuje písmeno "V", které značí, správný průběh analýzy. Hraniční počet mezi pozitivním a negativním vzorkem je v této aplikaci 499 CFU/ml .

V průběhu měření na průtokovém cytometru jsme dělali kontrolní kultivační nárůst, kde jsme vyočkovávali na Caso agar vzorky se zátěží 10^3 CFU/ml .

5.2.3 Stanovení počtu kvasinek a plísní ve farmaceutických produktech

5.2.3.1 Použité vzorky

Acidum citricum
Natrii chloridum
Saccharosum
Natrii benzoas
Aroma rubi idaei
Alcoholum isopropylicum
Kapsle modrobílá

5.2.3.2 Princip

Vzorky jsou v prvním kroku předloženy míchání a ošetřeny reagensy, které označí životaschopné mikroorganismy pokud jsou přítomny. Jen životaschopné mikroorganismy jsou schopny enzymaticky rozložit nefluorescenční substrát uvnitř buňky. Uvolňují a kumulují vytvořený fluorochrom. Po té, je vzorek vstříknutý do křemenné průtokové cely BactiFlow ALS, který tvoří úzký a laminární tekoucí proud, který zabezpečí snímání laserem jednoho mikroorganismu po druhém. Citlivé detektory sbírají fluorescenční signály z každé buňky.

5.2.3.3 Přístrojové vybavení

- BactiFlow ALS. Je vyráběn firmou AES Chemunex. Tento analytický systém by měl být užíván v souladu s instrukcemi přiložené v manuálu.
- Vortex - Vibromix 104 EV
- Inkubátor poskytující teplotu $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Mixer Fast 2 dodaný firmou AES Chemunex

5.2.3.4 Reagencie:

ChemSol S - tato reagencie je užívána jako promývací kapalina pro BactiFlow ALS pro jednotku úpravy vzorků a jako opouzdřovací tekutina pro BactiFlow ALS analyzátor. Vnější opouzdřující tekutina vyvíjí laminární průtok nutný pro analýzu v průtokové kyvetě.

ChemSol S 50X - tato reagencie je koncentrovaná forma ChemSol S. Musí být zředěná před použitím 50krát v 0,2 μm filtrované demineralizované vodě.

ChemBoost F – tato reagencie je obohacující růstový a barvicí bujón používaný k selektivnímu růstu kvasinek a plísní.

ChemBoost C - Sterilní bujón ve 100 ml lahvičce – tento bujón je používán pro zajištění neutralizace a pro růst mikroorganismů.

ChemChrome V23 – tato reagencie je barvicí substrát.

CSV - tato reagencie je užívána pro minimalizování fluorescenčního pozadí a validaci analýzy (přítomný fluorescenční projev v roztoku).

Diluent R a CSR ampulka s práškem - tyto reagencie jsou užívány jako redukční roztok pro volný fluorescein.

CSR musí být rozpuštěný do Diluent R těsně před použitím. Tento finální roztok je stabilní během 2 hodin v přítomnosti IsoREDu.

NB - změna prachové účinnosti se může vyskytnout pokud se nachází ve vlhkém prostředí. Při skladování musí být ampulka pevně zavřenou.

IsoRED - tato reagencie je užívána jako zábrana oxidaci ředícího roztoku.

Odpěňovač - tato reagencie je užívána v odpadních láhvích (analyzátor a jednotka úpravy vzorků) jako předejití tvorby pěny.

Standard A – tato reagencie je užívána pro denní kalibraci analyzátoru (fluorescenční kuličky).

Cleaning 5 - tato reagencie je čistící roztok užíváný pro čištění a asanuje vstříkovací jehlu a průtokovou kyvetu mezi každou analýzou.

Cleaning 3 - tato reagentie je čistící roztok užívaný na konci dne.

5.2.3.5 Technický materiál

- AES Chemunex materiál potřebný k vykonávání zkoušky na čistoty.
- 20 ml zkumavky
- Stojan na 20 m zkumavky
- 35 ml zkumavky
- Stojan na 35 ml zkumavky
- ChemFilter D17
- ChemFilter 60

5.2.3.6 Postup metody:

Příprava samotného přístroje sestává v umístění potřebných reagentů do daných pozic. K automatickému zařízení jsme připojili roztok ChemSol S a stejně tak i samotnému analyzátoru. K obou jednotkám jsme připojili též prázdné odpadní lahve. Po spuštění přístroje jsme provedli čištění a čekali jsme 10 minut na zahřívání laseru. Po té jsme mohli provést kalibraci pomocí předepsaného roztoku Standart A (protřepat na vortexu po dobu 30 sekund). Po kalibraci jsme se připravili vzorky:

5.2.3.7 Příprava vzorku

- Neutralizace a obohacení produktu:
 - neutralizace produktu: 10 g nebo 10 ml produktu jsme rozpustili ve 100 ml ChemBoostu C a homogenizovali (vortex). Lahvičku jsme nechali inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
 - obohacení produktu: 1 ml rozpuštěného produktu jsme napipetovali do 20 ml ChemBoostu F a homogenizovali (vortex). Lahvičku jsme nechali inkubovat 50 hodin při teplotě $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - pozitivní kontrola: do 20 ml ChemBoostu F jsme napipetovali 1 ml růstového CASO bujónu s Candida Albicans při očekávané koncentraci mikroorganismu 10^8 CFU/ml a nechali jsme inkubovat 50 hodin při teplotě $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - negativní kontrola: samotnou lahvičku ChemBoostu F jsme nechali inkubovat 50 hodin při teplotě $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Krok mixování
 - po inkubaci jsme promíchali lahvičku za účelem homogenizace produktu.
 - přenesli jsme objem vzorku do otevřené míchací jednotky ChemMix
 - po umístění do ChemMixu jsme umístili tuto míchací jednotku do Mixer Fasth 2 a zapnuli jsme míchání na program 3, který nám zajišťoval míchání na 75 sekund a 3000 otáček za minutu (mohou být použity dvě míchací jednotky současně).
 - po promíchání jsme přenesli veškerý obsah do zkumavky o objemu 35 ml.

- následně jsme ponořili ChemFiltr 60 do zkumavky se vzorkem
 - rychle jsme odebrali 2 ml zfiltrované suspenze a přenesli do 20 ml zkumavky (poslední dva kroky jsme prováděli rychle, aby se nám suspenze neusadila).
- Pokračování přípravy vzorků:
- přidali jsme ke vzorkům označeným zátěží 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml nainkubované mikroorganismy dané koncentrace v množství 0,1 ml dle stejného postupu jako u kultivační metody.
 - zatížení vzorků jednotlivými koncentracemi mikroorganismů proběhla těsně před samotným měřením.
 - zkontrovali jsme teplotu v inkubační mřížce BactiFlow ALS (pro tuto aplikaci $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
 - vložili jsme jednotlivé zkumavky do inkubační mřížky

Po vložení vzorků do přístroje jsme zadali v softwaru počítače údaje k jednotlivým vzorkům. (zobrazení stejné mřížky v počítači jako samotná mřížka v automatu – možnost popisu každého vzorku zvlášť s potřebnými parametry.) Po té jsme připravovali jednotlivé reagentie pro samotnou analýzu. Dle návodu jsme umístili Cleaning 5 do černého kruhového držáku, ChemChrom V23, který je umístěn v chladicí jednotce, která udržuje teplotu $2,5^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$. Dále jsme umístili po 30 vteřinovém protřepání na vortexu roztok CSV do panelu pro reagentie v automatu do 3. polohy zleva. Po té jsme připravili redukční roztok rozpuštěním CSR (prášku z jedné ampule) v Diluent R – opatrným otáčením lahvičky o 180° - nesmí se zpěnit. Po rozpuštění jsme přidali 15 kapek Isored, který brání oxidaci. Po té se roztok již nesmí míchat a nesmí být starší než 2 hodiny. Po té jsme umístili roztok Diluent R do panelu pro reagentie v automatu do 2. polohy zleva.

Po těchto krocích se spouští samotná aplikace měření, která trvá kolem 45 minut, pokud máme plnou šarži vzorků, tedy 23 (inkubační mřížka je pro 25 vzorků, ovšem v každé šarži musíme použít negativní a pozitivní kontrolu).

5.2.3.8 BactiFlow ALS barvení, analýza a zobrazování výsledků

- teplota inkubační mřížky roste na $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - do každého vzorku rameno naaplikuje $70 \mu\text{l} \pm 7 \mu\text{l}$ CSV
- Barvení je sekvenční. Příprava vzorku se realizuje v těchto krocích:

- a. přidání $20 \mu\text{l} \pm 2 \mu\text{l}$ ChemChromu V23
- b. homogenizace vzorku
- c. inkubace 10 minut \pm 1 minuta při teplotě $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- d. přidání $60 \mu\text{l} \pm 6 \mu\text{l}$ redukčního roztoku a homogenizace vzorku
- e. Aplikování do průtokové cely analyzátoru

BactiFlow analyzuje 200 μl obarveného vzorku. Průtok vzorku celou je 360 μl za minutu. Po té aplikační rameno BactiFlow ALS nabere 2 ml čistícího roztoku Cleanig 5 a promyje analyzátor mezi jednotlivými vzorky.

Výsledky jsou zobrazovány na počítačové jednotce jednotlivě a postupně v průběhu měření. Výsledky se ukládají automaticky dle času a data měření a dají se

vytisknout na příslušný protokol, nikoliv přenést do jiného počítače. Výsledek je počet mikroorganismů (CFU) v 1 ml vzorku.

Negativní vzorky jsou ve výsledkové protokolu zobrazovány pomocí zelené barvy, pozitivní pomocí červené. Hraniční počet mezi pozitivním a negativním vzorkem je v této aplikaci 25 CFU/ml.

V průběhu měření na průtokovém cytometru jsme dělali kontrolní kultivační nárůst, kde jsme vyočkovávali na Caso agar vzorky se zátěží 10^3 CFU/ml.

6 Výsledky kultivační metody a rychlé mikrobiologické metody – průtoková cytometrie

6.1 Vyhodnocení výsledků pomocí tabulek

6.1.1 Pseudomonas aeruginosa – CCM 1961

Tab. 2 – výsledky kultivační metody u Pseudomonas aeruginosa

Kultivační metoda	Pseudomonas aeruginosa CFU/ml			
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴
Acidum citricum	0	0	0	0
Natrii chloridum	0	70	358	1 758
Saccharosum	0	65	658	2 586
Natrii benzoas	0	4	41	442
Aroma rubi ideai	0	69	656	1 688
Kapsle modrobílá	0	72	426	1 874
Alcoholum isopropylicum	0	15	320	1 384
Aqua pro iniectione	0	45	456	1 832
Aqua conservans	0	80	846	1 756
Aqua purificata	0	69	684	1 648

Tab. 3 – výsledky průtokové cytometrie u Pseudomonas aeruginosa

Průtoková cytometrie	Pseudomonas aeruginosa CFU/ml				Kontrolní kultivační nárůst
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ³ CFU/ml
Acidum citricum	0	0	0	0	0
Natrii chloridum	0	109	793	6 756	569
Saccharosum	10	70	742	2 874	486
Natrii benzoas	79	99	951	7 333	90
Aroma rubi ideai	0	74	658	1 733	542
Kapsle modrobílá	0	80	652	1 978	506
Alcoholum isopropylicum	0	70	386	3 627	294
Aqua pro iniectione	0	56	549	1 862	421
Aqua conservans	16	90	970	2 431	530
Aqua purificata	71	180	950	2 112	580

Hodnocení výsledků pro daný mikroorganismus: Jak je z tabulky zřejmé, acidum citricum působí baktericidně a při odečtení výsledků na Petřino misce nebyl pozorován žádný nárůst, stejně tak průtokový cytometr nezachytil žádné živé mikroorganismy, kromě při koncentraci 10⁴ CFU/ml, kdy bylo zachyceno 10 CFU/ml. Acidum citricum byla ve styku

s mikroorganismy pouhých pár desítek minut. Baktericidní účinek acidum citricum nám v dané aplikaci a zkoušení nikterak nevaří. Natrii benzoas omezil růst všech čtyřech vybraných mikroorganismů a počty CFU/ml vycházely snižené v celém průběhu kultivačních metod. V případě průtokové cytometrie u natrii benzoas došlo k evidentní kontaminaci, kde nám sice jednotlivá zatížení vyšly na hranici správnosti, ovšem negativní vzorek byl vysoce pozitivně zatížen. Kontrolní kultivační nárůst tuto skutečnost vůbec nezachytil. V případě aqua purificata se jedná o růst mikroorganismů v této vodě, která byla pořízena těsně před kultivační metodou, ovšem na průtokový cytometr se jako vzorek dostala o 7 dní déle, kde kontaminace živými mikroorganismy již byla značná. Opět kontrolní kultivační nárůst zachytil pouze určitý počet vybraných mikroorganismů. Ostatní negativní vzorky, které vyšly s obsahem živých mikroorganismů do počtu 50 CFU/ml, je lze považovat za negativní. Při kultivační metodě, byly tyto vzorky negativní zcela a zde se pouze ukazuje citlivost průtokové cytometru BactiFlow ALS.

6.1.2 Staphylococcus aureus – CCM 4516

Tab. 4 - výsledky kultivační metody u Staphylococcus aureus

Kultivační metoda	Staphylococcus aureus CFU/ml			
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴
Acidum citricum	0	0	0	0
Natrii chloridum	0	47	348	3 231
Saccharosum	0	34	335	3 354
Natrii benzoas	0	28	275	2 756
Aroma rubi ideai	0	48	482	4 822
Kapsle modrobílá	0	40	397	3 976
Alcoholum isopropylicum	0	37	372	3 726
Aqua pro iniectione	0	42	320	3 270
Aqua conservans	0	33	325	3 256
Aqau purificata	0	40	348	3 482

Tab. 5 - výsledky průtokové cytometrie u Staphylococcus aureus

Průtoková cytometrie	Staphylococcus aureus CFU/ml				Kontrolní kultivační nárůst
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ³ CFU/ml
Acidum citricum	0	0	0	0	0
Natrii chloridum	0	50	357	3 665	270
Saccharosum	0	50	470	3 790	372
Natrii benzoas	0	69	297	3 685	202
Aroma rubi ideai	0	72	542	5 280	390
Kapsle modrobílá	0	58	498	4 580	329
Alcoholum isopropylicum	0	50	387	4 647	291
Aqua pro iniectione	0	87	690	5 680	412
Aqua conservans	8	34	326	3 268	250
Aqua purificata	197	254	1 170	5 270	378

Hodnocení výsledků pro daný mikroorganismus: Zde opět vidíme baktericidní účinek acidum citricum, který se projevil výslednými negativními výsledky ve všech vzorcích. Aqua purificata je opět zatížena kontaminací živých mikroorganismů, která se při kontrolním kultivačním růstu nikterak neprojevila.

6.1.3 Bacillus subtilis – CCM 1999

Tab. 6 - výsledky kultivační metody u Bacillus subtilis

Kultivační metoda	Bacillus subtilis CFU/ml			
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴
Acidum citricum	0	0	0	0
Natrii chloridum	0	16	147	1 654
Saccharosum	0	26	155	1 790
Natrii benzoas	0	16	164	1 720
Aroma rubi ideai	0	17	172	1 782
Kapsle modrobílá	0	43	432	4 352
Alcoholum isopropylicum	0	36	198	1 930
Aqua pro iniectione	0	39	396	3 152
Aqua conservans	0	38	384	3 872
Aqua purificata	0	40	402	3 074

Tab. 7 - výsledky průtokové cytometrie u Bacillus subtilis

Průtoková cytometrie	Bacillus subtilis CFU/ml				Kontrolní kultivační nárůst
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ³ CFU/ml
Acidum citricum	0	0	0	0	0
Natrii chloridum	10	16	149	2 160	110
Saccharosum	0	30	159	1 814	94
Natrii benzoas	32 627	7 957	8 885	9 117	75
Aroma rubi ideai	0	28	276	1 890	150
Kapsle modrobílá	0	46	486	4 580	269
Alcoholum isopropylicum	10	40	208	2 021	138
Aqua pro iniectione	0	39	438	3 270	302
Aqua conservans	0	40	390	4 180	241
Aqua purificata	181	205	370	3 490	212

Hodnocení výsledků pro daný mikroorganismus: Bacillus subtilis prokazoval velice dobrý růst, i když se očekávalo, že tento mikroorganismus poroste velmi problematičticky. Acidum citricum i tentokrát prokázala své baktericidní vlastnosti a opět veškeré mikroorganismy zahubila. Ani průtokový cytometr nezachytil jediný živý mikroorganismus. U natrii benzoas se jedná opět o kontaminaci. Toto velice zvláštní zatížení, které by mělo být velice

nepravděpodobné, vzniklo pravděpodobně kontaminací negativní vzorkem, kde se nacházejí fluoreskující částice a nebo nevysušenou šarží zkumavek, ve kterých se namnožily mikroorganismy. V praxi by se tento výsledek nevyhodnotil a celé měření bychom opakovali. Pokud se ovšem na tyto výsledky podíváme zblízka, je možné konstatovat, že i přes tuto kontaminaci je nárůst v jednotlivých zatížení pravidelný směrem nahoru. Negativní vzorek Aqua purificata opět na BactiFlow ALS vyšel vysoce pozitivní, opět díky namnožení živých mikroorganismů v tomto vzorku, který byl po dobu 7 dnů od prvního odběru uložen v lednici. Kontrolní kultivační nárůst kontaminaci neprokázal.

6.1.4 Candida albicans – CMM 8226

Tab. 8 - výsledky kultivační metody u Candida albicans

Kultivační metoda	Candida albicans CFU/ml			
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴
Acidum citricum	0	34	240	1 658
Natrii chloridum	0	40	208	1 144
Saccharosum	0	30	256	1 520
Natrii benzoas	0	4	65	704
Aroma rubi ideai	0	35	224	1 264
Kapsle modrobílá	0	62	192	1 006
Alcoholum isopropylicum	0	27	290	1 310
Aqua pro iniectione	0	50	492	1 462
Aqua conservans	0	43	376	1 674
Aqua purificata	0	36	328	1 286

Tab. 9 - výsledky průtokové cytometrie u Candida albicans

Průtoková cytometrie	Candida albicans CFU/ml				Kontrolní kultivační nárůst
	NEG	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ³ CFU/ml
Acidum citricum	0	35	496	3 820	274
Natrii chloridum	0	55	565	5 912	360
Saccharosum	0	94	595	5 435	375
Natrii benzoas	0	55	317	2 408	93
Aroma rubi ideai	0	65	686	4 980	394
Kapsle modrobílá	0	72	306	2 476	270
Alcoholum isopropylicum	0	84	585	5 325	347
Aqua pro iniectione	0	71	643	3 120	365
Aqua conservans	8	63	378	3 924	234
Aqua purificata	24	95	370	3 813	264

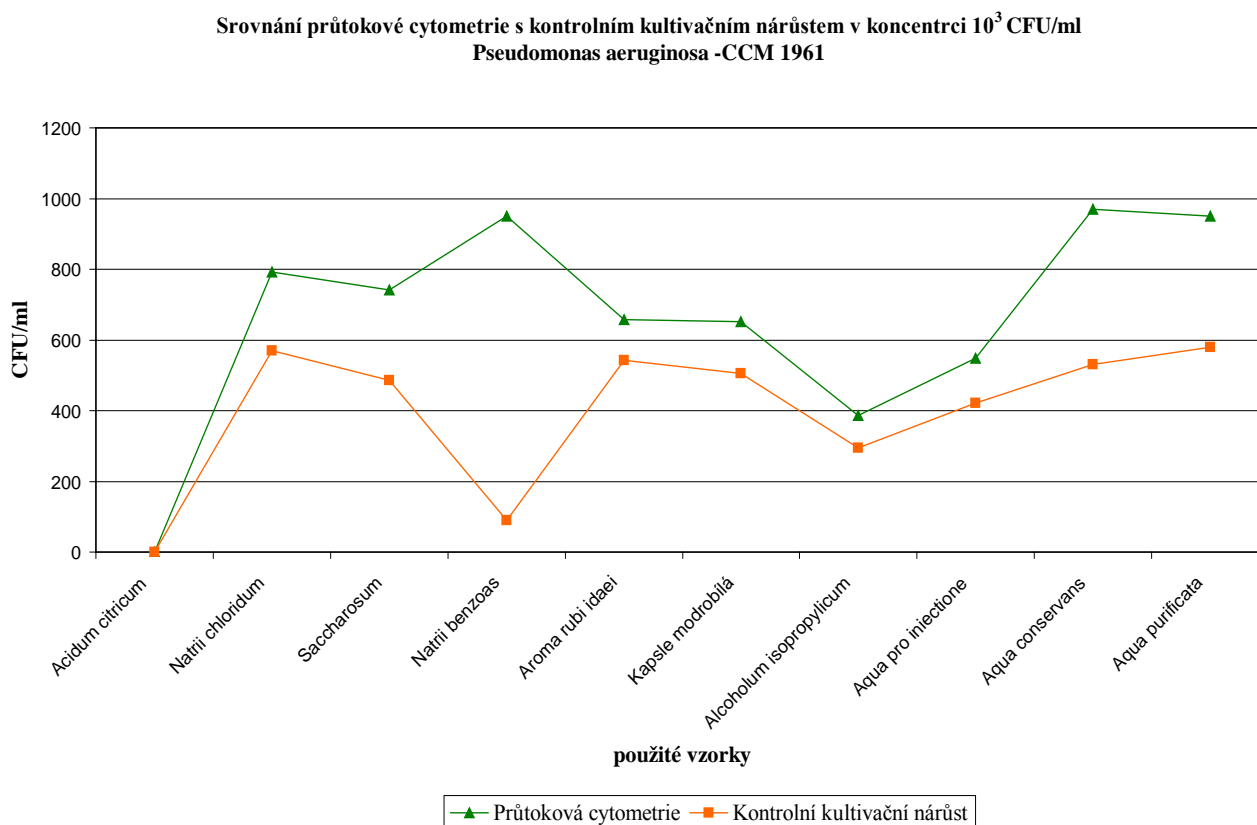
Hodnocení výsledků pro daný mikroorganismus: Candida albicans jako jediný zástupce kvasinek a plísní, požadovala zvláštní postup přípravy (viz. Stanovení počtu kvasinek a

plísni ve farmaceutických produktech). Acidum citricum tentokrát neovlivnila růst mikroorganismu a výsledky jak v kultivační metodě, tak v průtokové cytometrii prokázaly předpokládaný nárůst kolonií ve vzorku. Natrii benzoas ovlivnil růst *Candida albicans* v kultivační metodě, kde počet kolonií vyšel řádově nižší než předpokládaný nárůst. Při měření na BactiFlow ALS růst omezen nikterak nebyl a počet kolonií ve vzorku vyšel dle předpokladů. Aqua purificata tentokrát byla naměřena s nižším zatížením negativního vzorku.

6.2 Vyhodnocení výsledků pomocí grafů

6.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Graf. 3

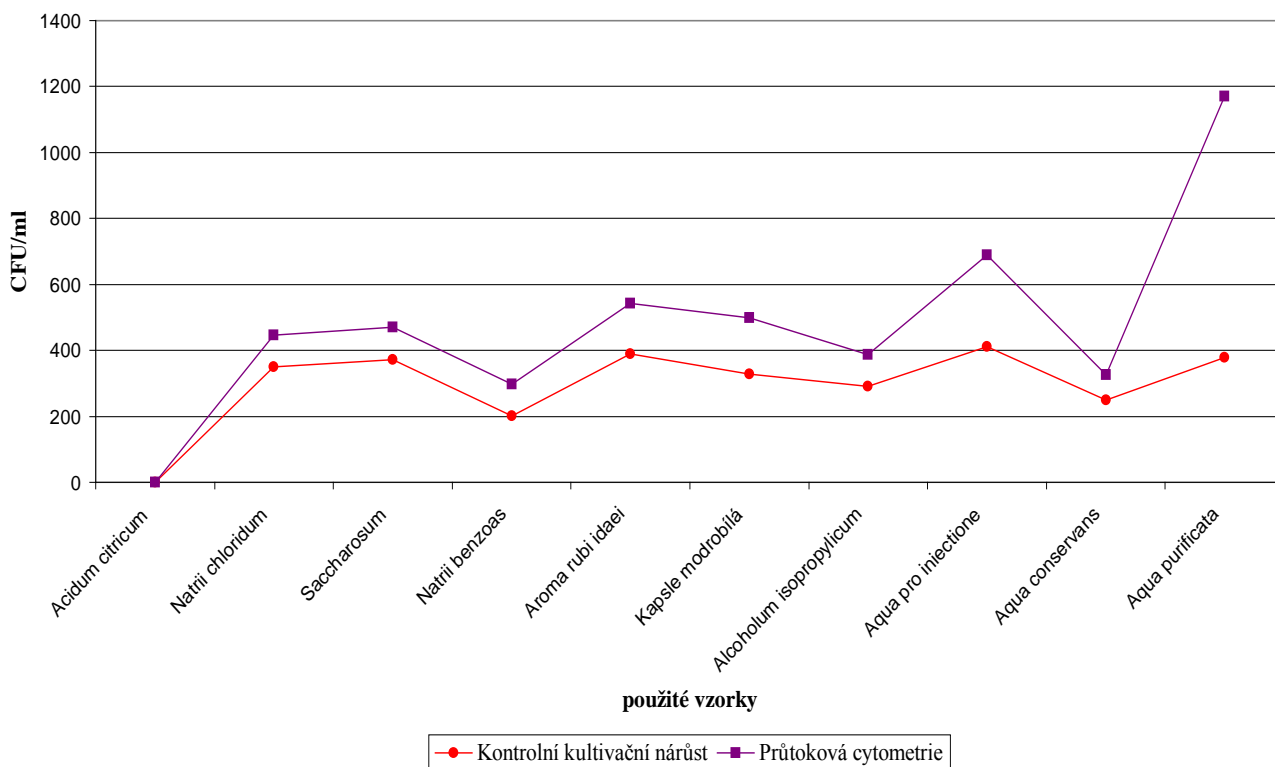


Zde na grafu vidíme srovnání průtokové cytometrie s kontrolním kultivačním nárůstem mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa*, kde z vložených dat vyplývá větší citlivost průtokové cytometrie naproti klasické kultivační metody. Surovina natrii benzoas, kterou jsme použili, dosti v kultivační metodě, která trvala 48 hodin omezovala růst mikroorganismů, kdežto průtokový cytometr vyhodnotil kontaminaci živými mikroorganismy, která se ovšem na kontrolním kultivačním nárůstu neprojevila. Průměrně v této koncentraci vycházela průtoková cytometrie oproti kultivační metodě o 154 CFU/ml citlivěji, pokud do průměru nezahrneme již zmíněnou kontaminaci natrii benzoas.

6.2.2 Staphylococcus aureus

Graf 4

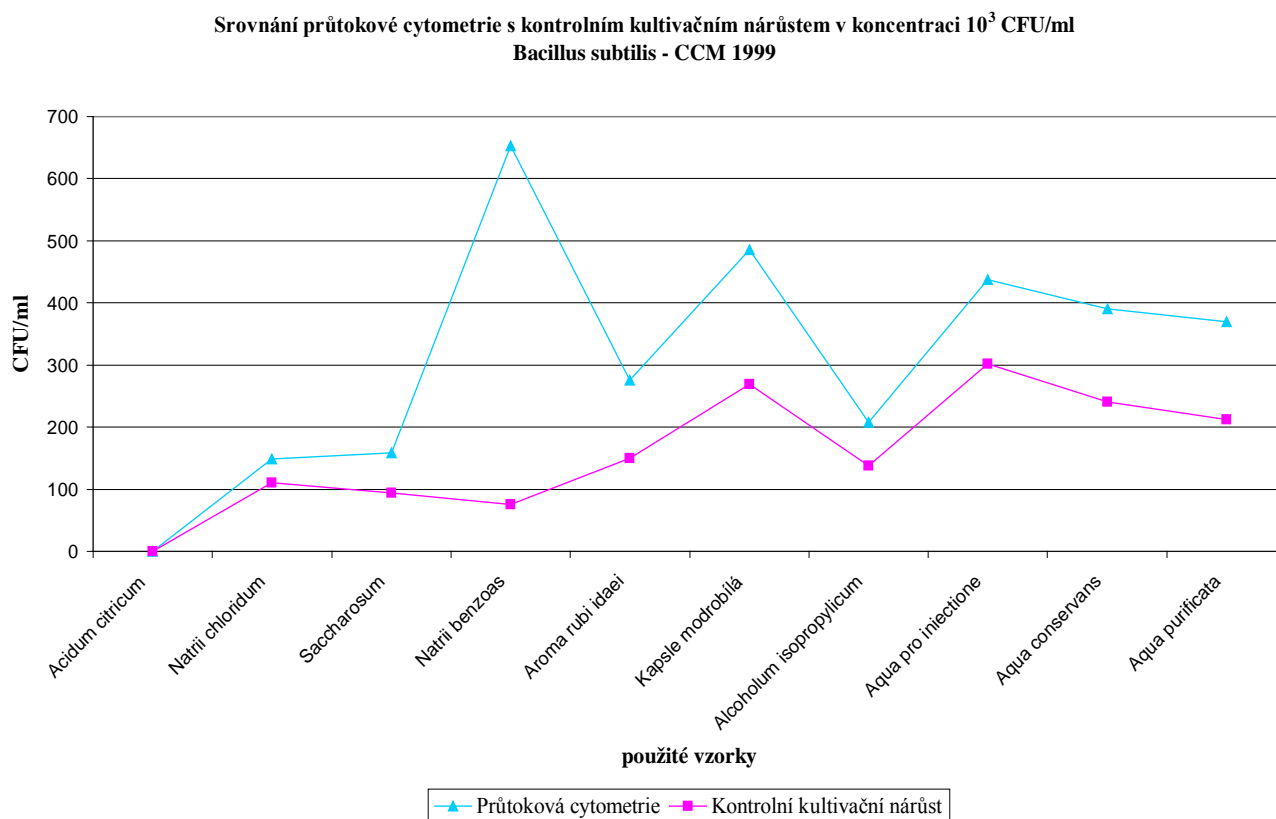
Srovnání průtokové cytometrie s kontrolním kultivačním nárůstem v koncentraci 10^3 CFU/ml
Staphylococcus aureus - CCM 4516



Zde na grafu vidíme srovnání průtokové cytometrie s kontrolním kultivačním nárůstem mikroorganismu Staphylococcus aureus, kde z vložených dat vyplývá větší citlivost průtokové cytometrie naproti klasické kultivační metody. Průměrně v této koncentraci vycházela průtoková cytometrie oproti kultivační metodě o 96 CFU/ml citlivěji. Mikrobiologicky zatíženější Aqua purificata se projevila pouze na průtokovém cytometru nikoliv na kultivační metodě, kde se opět předpokládá přednostní nárůst patogenního mikroorganismu.

6.2.3 Bacillus subtilis

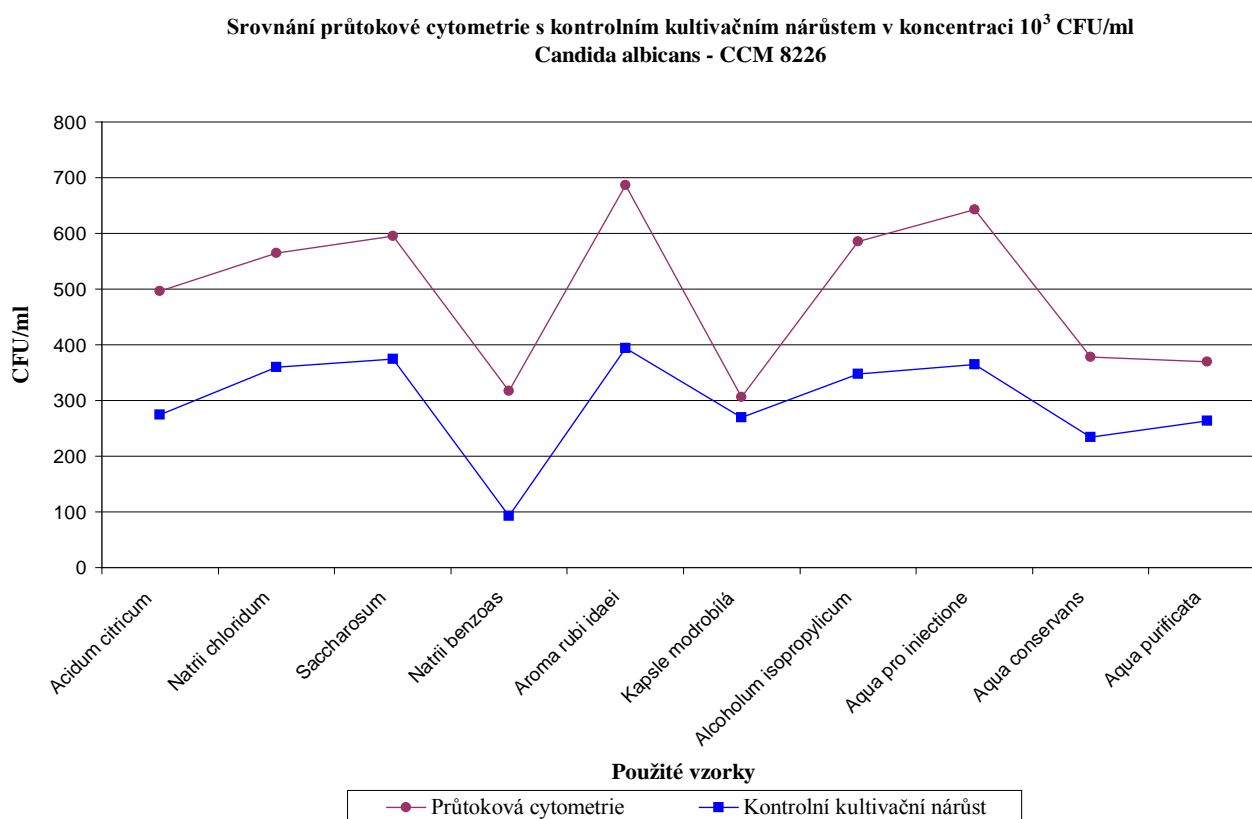
Graf 5



Zde na grafu vidíme srovnání průtokové cytometrie s kontrolním kultivačním nárůstem mikroorganismu *Bacillus subtilis*, kde z vložených dat vyplývá větší citlivost průtokové cytometrie naproti klasické kultivační metodě. Surovina natrii benzoas, kterou jsme použili, dosti v kultivační metodě, která trvala 48 hodin omezovala růst mikroorganismů, kdežto průtokový cytometr vyhodnotil kontaminaci živými mikroorganismy, která se ovšem na kontrolním kultivačním nárůstu neprojevila. Průměrně v této koncentraci vycházela průtoková cytometrie oproti kultivační metodě o 138 CFU/ml citlivěji, pokud do průměru nezahrnujeme již zmíněnou kontaminaci natrii benzoas. Do grafu jsme použili hodnotu přepočítanou na předpokládaný počet mikroorganismů v roztoku vzorku (počet pouze předpokládaný nikoliv přesný) z důvodu lepší orientace v grafu.

6.2.4 Candida albicans

Graf 6



Zde na grafu vidíme srovnání průtokové cytometrie s kontrolním kultivačním nárůstem mikroorganismu *Candida albicans*, kde z vložených dat vyplývá větší citlivost průtokové cytometrie naproti klasické kultivační metody. Průměrně v této koncentraci vycházela průtoková cytometrie oproti kultivační metodě o 189 CFU/ml citlivěji.

7 Diskuze

V diskuzi bychom se rádi vrátili k problému zachycení kontaminace na průtokovém cytometru, která se neprojevila na kontrolním kultivačním nárůstu. Tato zdánlivá a nebo velice přesná citlivost je ovšem ovlivněna faktem, že průtokový cytometr BactiFlow ALS zachytí všechny živé mikroorganismy, včetně mikroorganismů vybraných. Živné půdy použité pro kultivaci mikroorganismů nejsou jejich přirozené prostředí a to se projevuje nižší záchytností. Pokud bychom chtěli tuto metodu zavést ve farmaceutické mikrobiologii nebo mikrobiologických laboratořích, kde se musí dodržovat platný lékopis a správné operační postupy, je nutné zjistit, jaký typ mikroorganismu se v produktu nachází. U některých typů testování se nevyžadují zkoušky na vybrané mikroorganismy, ale pouze stanovení celkového počtu mikroorganismů. U testů, kde se vyžaduje zkouška na vybrané mikroorganismy a testování na BactiFlow ALS vyjde negativní, je konečný výsledek znám do 3 hodin. V případě pozitivního výsledku BactiFlow ALS provádíme

kultivaci pouze na vybrané mikroorganismy, která trvá 48 hodin, takže i zde je časová úspora a rychlá mikrobiologická metody má i v tomto případě smysl.

Další otázkou ovšem je, zda-li prokázaná zátěž je opravdu mikrobiologického původu, a nikoliv zátěží přítomných fluoreskujících částic. V našem případě vycházely kontaminovány dvě suroviny:

1. Aqua purificata, měla pozitivní potenciální negativní vzorky. Pozitivně pravděpodobně vyšly díky namnožení živých mikroorganismů v tomto vzorku, který byl po dobu 7 dnů od prvního odběru uložen v lednici. Kontrolní kultivační nárůst kontaminaci neprokázal. Zatížení negativního vzorku bylo natolik malé, že přidané mikroorganismy do zkumavek se zatížením potlačili jakékoliv další množení mikroorganismů způsobující kontaminaci v negativním vzorku. Z tohoto důvodu se pravděpodobně neprojevil nárůst ani na Petriho misce kultivační metody.
2. U natrii benzoas vzniká hned několik dalších možných odpovědí a spekulací, které v tomto případě mohly nastat. BactiFlow ALS poskytuje zobrazení výsledků třemi způsoby. Dva ze tří způsobů ukazují číselný počet CFU/ml v daném vzorku. Třetí způsob je zobrazování na základě grafu, ve kterém se projevují různé vlastnosti daných měřených částic. Tento graf má několik určitých oblastí, ve které by se měly zobrazovat jednotlivé typy částic dle jejich vlastností. Vybral bych dvě nejdůležitější oblasti. Jedna z nich určuje obarvené mikroorganismy a druhá z nich obarvené fluoreskující částice, které nejčastěji způsobují falešně pozitivní výsledky. V případě této suroviny graf ukazoval spíše na kontaminaci mikroorganismy, ovšem každá nová látka, by se nejdříve měla validovat několika přesnými měřeními, než se stanoví konečný závěr. Firma AES Chemunex nabízí několik možných standardních postupů pro různé produkty. Vzorky se zpracují v testovacích laboratořích firmy AES Chemunex a tam je určen optimální postup pro stanovení Vámi zaslaných testovaných produktů. Dále se také zvažuje fakt, že vzorek může mít vysoké fluorescenční pozadí. Sedm z deseti produktů v mé práci se na tomto přístroji měřilo na území České republiky poprvé a z časových důvodů, jsme neměli čas zaslat naše suroviny do pobočky zmiňované firmy. Proběhla ovšem konzultace s odborníkem na danou problematiku a byli jsme upozorněni na případné problémy tohoto směru. Tedy kontaminace, která nám vyšla při stanovení celkového počtu mikroorganismů ve farmaceutických produktech konkrétně u suroviny natrii benzoas ve dvou ze třech případů, se nedá s přesností určit, zda-li se jedná o kontaminaci mikrobiologickou či kontaminaci fluoreskujících částic.

Další otázkou do diskuze je finanční rozvaha vzhledem k vysoké pořizovací ceně tohoto přístroje, která činí dle typu 1-5 miliónů korun. Pro velké farmaceutické firmy s velkým množstvím testovaných vzorků se určitě investice tímto směrem vyplatí. Kultivační metody s častým přeočkováním a nebo naopak vyočkováním do mnoho typů půd trvají příliš dlouho. Naproti tomu rychlá mikrobiologická metoda v tomto případě průtoková cytometrie po zvalidování jednotlivých operačních postupů je velice rychlá i s případnou 24 hodinovou kultivací. Samotné stanovení trvá dle typu aplikace od 45 do 90 minut. Malé mikrobiologické laboratoře s největší pravděpodobností neuplatní takto drahý, ale přesný přístroj. Navíc ve většině mikrobiologických laboratořích se spíše jedná o identifikaci mikroorganismu než o jeho přítomnost či absenci.

8 Závěr:

Pokud bychom měli zhodnotit, zda-li bylo dosaženo cílů naší práce, myslím si, že můžeme říct, že ano. Rychlá mikrobiologická metoda, konkrétně průtoková cytometrie zajištěná přístrojem BactiFlow ALS, je u daných farmaceutických surovin, které jsme vybrali, výrazně rychlejší oproti minimálně pěti denní klasické kultivaci. U rychlé mikrobiologické metody byl výsledek znám ještě týž den, u kvasinek a plísní se metoda protáhla do druhého dne. A dále se rychlé mikrobiologické metody konkrétně průtoková cytometrie jeví citlivější než metoda kultivační. Konečné počty mikroorganismů, které jsme získali díky průtokovému cytometru, byly pravděpodobně přesnější, i když je nutné udělat spoustu dalších měření, které ověří přesnost měření daných surovin. V případě stanovení vody je metoda osvědčená a spolehlivá. V případě stanovení kvasinek a plísní, kdy je daná kvasinka nebo plíseň co do velikosti buňky větší než bakterie, je stanovení celkového počtu pro tento přístroj o něco „snazší“. Stanovení celkového počtu mikroorganismů je metoda velice citlivá a pokud není prověřená mnoha měřeními, mohou být výsledky v některých případech zavádějící.

Dále bychom měli zmínit, že pokud bychom chtěli udělat zcela přesnou srovnávací metodu mezi kultivační metodou a průtokovou cytometrií, museli bychom obě metody dělat paralelně a jednom pracovišti. To ovšem z časových a provozních důvodů nebylo zatím možné. Nejdříve proběhla kultivační metoda a po sedmi dnech až měření na průtokovém cytometru. V průběhu měření na průtokovém cytometru jsme dělali kontrolní kultivační nárůst, kde jsme vyočkovávali na Caso agar vzorky se zátěží 10^3 CFU/ml. Toto srovnání je pro tuto diplomovou práci pravděpodobně nejcennější. Z prostorových důvodů, jsme nemohli dělat více kontrolních nárůstů. Umístění průtokového cytometru BactiFlow ALS je mimo mikrobiologickou laboratoř, kde probíhala klasická kultivační metoda.

9 Použitá literatura

1. Veal, DA., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., Attfield, PV.: Immunol methods., centre for development of fluorimetric applications in biotechnology, Department of biological sciences, Macquarie University, 2109, Sydney, NSW, Australia, 2000 Sep 21; s. 243(1-2): s. 191-210. Abstrakt z databáze Medline
2. Alberto Álvarez-Barrientos,^{1,2} Javier Arroyo,^{1,3} Rafael Cantón,^{1,4} César Nombela,¹ and Miguel Sánchez-Pérez^{1,2}: Applications of flow cytometry to clinical microbiology, Departamento de microbiología II, Facultad de Farmacia,¹ Centro de citometría de flujo y microscopía confocal,² and Centro de secuenciación automatizada de DNA,³ Universidad Complutense de Madrid, and Servicio de microbiología del hospital Ramón y Cajal, Carretera Colmenar,⁴ Madrid, Spain, April 2000, s. 167-195, Vol. 13, No. 2
3. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Joseph Lister [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Joseph_Lister&oldid=2484182>
4. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Louis Pasteur [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Louis_Pasteur&oldid=2355584>
5. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Robert Koch [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Robert_Koch&oldid=2412210>
6. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Kochovy postuláty [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Kochovy_postul%C3%A1ty&oldid=2225846>
7. Internet: M.Sedlářová & J. Medková (KB PřF UP) 2007: Metody identifikace mikroorganismů: [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/kultivtech.pdf> >
8. Internet: Typy kultivačních půd: [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <<http://www.biology.estranky.cz/clanky/mikrobiologie-a-virologie/typy-kultivacnich-pud> >
9. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Živná půda [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=%C5%BDivn%C3%A1_p%C5%AFda&oldid=2219768>
10. Doern, G. V., Diagnostic technologies in clinical microbiology, 1995, s. 14-43. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Lennette, D. A., Collection and preparation of specimens for virological examination, 1995, s. 868-875. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.

12. Ieven, M., and H. Goossens, Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin. Microbiol.*, 1997 Rev. 10: s. 242-256, abstrakt z databáze Medline
13. Gao, S. J., P. S. More, and M. Phil, Molecular approaches to the identification of unculturable infectious agents. *Emerg. Infect.*, 1996 Dis. 2: s. 159-167 abstrakt z databáze Medline
14. Rubin, F. A., and S. W. Rothman., Extinction or revitalization: clinical microbiologists look to the future, 1996 *ASM News* 63: s.530-531.
15. Woods, G. L., Automation in clinical microbiology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1992 98:S22-S30, abstrakt z databáze Medline
16. Gant, V. A., G. Warnes, I. Phillips, and G. F. Savidge, The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol.*, 1993, 39: s.147-154, abstrakt z databáze Medline
17. Kirk, S. M., S. M. Callister, L. C. Lim, and R. F. Schell, Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35: s.358-363, abstrakt z databáze Medline
18. Pore, R. S., Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1994, 34: s.613-627, použito z databáze Medline
19. Walberg, M., P. Gaustad, and H. B. Steen. Rapid discrimination of bacterial species with different ampicillin susceptibility levels by means of flow cytometry. *Cytometry*, 1997, 29: s.267-272, použito z databáze Medline
20. Best, L. M., S. J. Veldhuyzen van Zanten, G. S. Bezanson, D. J. Haldane, and D. A. Malatjalian. Serological detection of *Helicobacter pylori* by a flow microsphere immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30: s.2311-2317, použito z databáze Medline
21. Hu, Y. W., P. Birch, E. Balaskas, A. Zeibdawi, V. Scalia, S. A. Theriault-Valin, P. Gill, and M. T. Aye., Flow cytometric immunofluorescence assay for detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 using insoluble precursor forms of recombinant polyproteins as carriers and antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34: s.1412-1419, abstrakt z databáze Medline
22. Cohen, C. Y., and E. Sahar, Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27: s.1250-1256
23. Patterson, B. K., V. L. Mosiman, L. Cantarero, M. Furtado, M. Bhattacharya, and C. Goolsby, Detection of HIV-RNA-positive monocytes in peripheral blood of HIV- positive patients by simultaneous flow cytometric analysis of intracellular HIV RNA and cellular immunophenotype. *Cytometry*, 1998, 31: s.265-274
24. Kricka LJ. New technologies for microbiological assays. In: Easter MC, ed. *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry*. Washington, DC: Interpharm/CRC; 2003: s.233-248.
25. 5.1.6.: *Alternative Methods for Control of Microbiological Quality*. Pharmeuropa. 2004; 16: s.555-565.
26. Meszaros A., *Alternative technologies for sterility testing*. In: Easter MC, ed. *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry*. Washington, DC: Interpharm/CRC; 2003: s. 179-185.

27. Tools for microbiology. BioProbes. 2003;43:11-13. Available at: <http://probes.invitrogen.com/lit/bioprob43/4.pdf>.
28. Toman M. a kol.: Veterinární imunologie. Grada Publishing, Praha, 2000.
29. Tijssen P.: Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam, 1985.
30. Tizard, I.R.: Veterinary immunology - an introduction. Saunders co., Philadelphia, 1996.
31. Rudi K. Application of nucleic acid probes for analyses of microbial communities. In: Olson WP, ed. Rapid analytical microbiology: The chemistry and physics of microbial identification. Bethesda, MD and Godalming Surrey, UK: Parenteral drug association and Davis Horwood International Publishing; 2003: s.13-40.
32. DeSorbo MA. Rapid contamination detection technology patent granted. CleanRooms. August 2002. Available at: http://cr.pennnet.com/Articles/Article_Display.cfm?Section=Archives&Subsection=Display&ARTICLE_ID=150543&KEYWORD=%22patent%20granted%22
33. Bioburden. (2008, February 26). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 20:40, April 20, 2008, from <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Bioburden&oldid=194111681>
34. Internet: Krab podkovovitý: [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://krab-podkovy.navajo.cz/>
35. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Laser [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Laser&oldid=2493430>
36. Internet: Barvení dle Grama: [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B012
37. Internet: Rapid Microbiological Methods and the PAT Initiative : [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=185482&pageID=1&sk=&date=>
38. Jimenez, L.: Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals, Microbiology Division, Consumer Product Testing Co., Fairfield, New Jersey, USA, PDA J Pharm Sci Technol. 2001 Sep-Oct;55(5): s. 278-85.
39. Davey, H. M., and D. B. Kell., Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses, 1996, Microbiol. Rev. 60: s. 641-696
40. Gucker, F., C. O. O'Konski, H. B. Pickard, and J. Pitts., A photoelectric counter for colloidal particles. Am. J. Chem, 1947, 69: s. 2422-2431.
41. Kamentsky, L. M., M. R. Melamed, and H. Derman., Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis., 1965, Science 150: s. 630-631
42. Fulwyler, M. J., Electronic separation of biological cells by volume, 1965, Science 150: s. 910-911
43. Steen, H. B., Simultaneous separate detection of low angle and large angle light scattering in an arc lamp-based flow cytometer. Cytometry, 1985, 7: s. 445-449, použito z databáze Medline

44. Steen, H. B., and T. Lindmo, Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone, 1974, Science 204:404
45. Allman, R., A. C. Hann, R. Manchee, and D. Lloyd, Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometry. J. Appl. Bacteriol, 1992, 73: s. 438-444, použito z databáze Medline
46. Boye, E., and H. E. Steen, Flow cytometry of bacteria: a promising tool in experimental and clinical microbiology. J. Gen. Microbiol, 1993, 129: s. 973-980, použito z databáze Medline
47. Boye, E., and A. Lobner-Olesen, Flow cytometry: illuminating microbiology. New Biol, 1990, 2: s. 119-125, použito z databáze Medline
48. Lloyd, D., Flow cytometry in microbiology. Springer-Verlag, London, United Kingdom, 1993
49. Álvarez-Barrientos, A., J. O'Connor Blasco, and M. Sánchez Pérez, La citometría de flujo y el estudio de microorganismos de importancia industrial y clínica. Ind. Farm, 1996, 5: s. 87-90.
50. Betz, J. W., W. Aretz, and W. Hartel, Use of flow cytometry in industrial microbiology for strain improvement programs. Cytometry, 1984, 5: s. 145-150, použito z databáze Medline
51. Frelat, G., C. Laplace-Builhe, and D. Grunwald, Microbial analysis by flow cytometry: present and future, s. 256-279. In A. Yen (ed.), Flow cytometry: advanced research and clinical applications. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1989
52. Jansson, J. K., and J. I. Prosser, Quantification of the presence and activity of specific microorganisms in nature. Mol. Biotechnol, 1997 7: s. 103-120, použito z databáze Medline
53. Shapiro, H. M., Practical flow cytometry, 3rd ed. Wiley-Liss, New York, N.Y., 1995
54. Hazel M. Davey, Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms, Institute of Biological Sciences, University of Wales, Aberystwyth, Ceredigion, SY23 3DD Wales, UK, Volume 24, No. 1-3, March, 2002, s. 91-97
55. Validation of the alternative microbiological methods, chapter 1223. Pharmacopeial forum 28 (1): Janv-Fev 2002
56. Technical Report No 33 : Evaluation, Validation and implementation of new microbiology testing methods, PDA Newspaper of pharmaceutical Sciences and technology. Supplement TR33, 2000: 54: No.3
57. Internet: AESChemunex : [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://www.aeschemunex.com/Pages/flowcytometer.html>
58. Internet: New Technologies Forum 6: Rapid methods in microbiology : [online]. c2008 [citováno 20. 04. 2008]. Dostupný z WWW: <http://www.rpsgb.org.uk/pdfs/ntf6.pdf>
59. Alternative methods for the microbiology quality control, section 3.2. Validation of the qualitative detection tests of micro-organisms in sample. Pharmeuropa Vol.16, 5.1.6. No.4, October 2004

60. Brailsford MA, Gatley micro S. Rapid analysis of organisms using flow cytometry. Flow cytometry in Microbiology 1993. ED. Lloyd D: Springer-Verlag, London: s. 171-180
61. Johnson B Evaluation of has new system for rapid microbiological detection in non-sterile pharmaceutical products. European Pharmaceutical Review 1999; 4(1): s. 55-59