

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Klára Nemčková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Metoda FISH pro detekci biofilmu

Klára Nemčková

Bakalářská práce

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Nemčecová**
Osobní číslo: **C14051**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Metoda FISH pro detekci biofilmu**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Zpracujte literární rešerši na metodu FISH (princip, postup, modifikace, využití v praxi).
2. Zaměřte se hlavně na využití metody pro detekci biofilmu a popište způsob detekce v nejnovějších odborných publikacích (které mikroorganismy byly v biofilmu pomocí FISH detekovány, jakých výsledků autoři dosáhli).
3. Popište výhody a nevýhody stanovení biofilmu pomocí fluorescenční hybridizace "in situ".
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petra Mořková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Věntura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29.6. 2017

.....

Klára Nemčeková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Ing. Petře Mořkové Ph.D. za výběr tématu, které posunulo hranici mých znalostí a cenné rady a doporučení, bez kterých bych se neobešla. Poté také mé rodině, která mi poskytla pochopení a podporu po celou dobu studia.

Anotace:

Tato bakalářská práce se zabývá využitím metody FISH pro detekci biofilmů. V úvodní části jsou popsány základní postupy a modifikace metody. Dále jsou uvedeny možnosti využití metody v různých odvětvích. Hlavní část práce popisuje konkrétní případy detekce biofilmů metodou FISH.

Klíčová slova: FISH, biofilm, hybridizace, bakterie

Title: Fluorescence “in situ“ hybridization for the detection of biofilm

Annotation:

This thesis deals with the use of the FISH method for the detection of biofilms. The first part describes basic procedures and modifications of method. The possibilities of using the method in different sectors are listed below. The main part describes specific cases of biofilm detection using FISH method.

Key words: FISH, biofilm, hybridization, bacteria

Obsah

Úvod.....	12
1 Historie Fluorescenční in situ hybridizace.....	13
2 Princip metody FISH	14
2.1 Sondy.....	14
2.1.1 Rozdělení sond.....	14
2.1.2 Značení sond	15
3 Základní postup při FISH	17
3.1 Fixace a denaturace vzorku	17
3.2 Hybridizace sondy a cílové DNA.....	17
3.3 Odstranění nespecifických signálů.....	18
3.4 Vyhodnocení hybridizačního signálu	18
4 Modifikace a využití FISH	19
4.1 Modifikace.....	19
4.1.1 CARD-FISH (TSA)	19
4.1.2 CLASI-FISH	20
4.1.3 DOPE-FISH	20
4.1.4 RING-FISH.....	21
4.1.5 Fiber-FISH	21
4.1.6 LNA a PNA FISH	22
4.2 Využití FISH	22
4.2.1 Medicína.....	22
4.2.2 Potravinářství	23
4.2.3 Průmysl	23
4.2.4 Životní prostředí.....	24
5 Praktická měření	25
5.1 DOPE-FISH pro detekci šesti mikrobiálních populací	25
5.1.1 Kultury	25
5.1.2 Sondy.....	25
5.1.3 Hybridizace	26
5.1.4 Výsledky experimentu	26
5.2 Detekce biofilmu pomocí LNA-FISH	28
5.2.1 Kultury	28
5.2.2 Sondy.....	29
5.2.3 Hybridizace	29
5.2.4 Validace metody LNA-FISH	30

5.2.5	Výsledky experimentu	31
5.3	Detekce rodu <i>Pseudomonas</i> v roztocích pro obrábění kovů	32
5.3.1	Kultury	32
5.3.2	Sondy.....	33
5.3.3	Hybridizace	33
5.3.4	Výsledky experimentu	34
5.4	PNA-FISH pro detekci <i>Lactobacillus</i> a <i>Gardnerella</i> spp.	35
5.4.1	Kultury	35
5.4.2	Sondy.....	35
5.4.3	Hybridizace	36
5.4.4	Výsledky experimentu	36
5.5	Detekce rodů <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Inquilinus limosus</i>	37
5.5.1	Kultury	38
5.5.2	Sondy.....	38
5.5.3	Hybridizace	38
5.5.4	Výsledky experimentu	39
5.6	Detekce anaerobních patogenů na hlasových protézách	40
5.6.1	Kultury	40
5.6.2	Sondy.....	41
5.6.3	Hybridizace	41
5.6.4	Výsledky experimentu	42
6	Závěr	43
7	Seznam zdrojů.....	44

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 Grafické znázornění umístění jednotlivých typů sond.....	15
Obrázek 2 Nepřímé značení pomocí dvou protilátek	16
Obrázek 3 Schéma CARD-FISH	20
Obrázek 4 Halo-efekt RING-FISH	21
Obrázek 5 Záznam z CLSM smíšené kultury 1	27
Obrázek 6 Záznam z CLSM smíšené kultury 2	28
Obrázek 7 Epifluorescenční záznam smíšené kultury	34
Obrázek 8 Epifluorescenční záznam vybraných kultur	37
Obrázek 9 Specifická fluorescence sond Paer565 a Ilim569.....	40
Obrázek 10 Výsledky měření pomocí FISH	42
Tabulka 1 Značení sond pro jednotlivé rody při DOPE-FISH.	26
Tabulka 2 Teoretická specifická a citlivost LNA sond.	30
Tabulka 3 Rovnice lineární regrese a Pearsonova korelace	32
Tabulka 4 Seznam kultur pro potvrzení selektivity sond	38
Tabulka 5 Bakterie a komplementární sondy	41

Seznam zkratek

BBA	Brucella krevní agar
BHI	mozkosrdcový bujón
bp	páry bazí (base pares)
CARD-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace pomocí sondy značené enzymem křenové peroxidázy (Catalized Reported Deposition-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)
CF	cystická fibróza
CFU	kolonie tvořící jednotky (Colony Forming Units)
CLASI-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s kombinatorickým značením a spektrální detekcí (Combinatorial Labeling and Spectral Paging-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)
CLSM	konfokální laserový skenovací mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope)
Cy3 apod.	kabrokyanatická barviva
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPE-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s dvojitě značenými oligonukleotidovými sondami (Double Labeling of Oligonucleotide Probes-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HRP	křenová peroxidáza (Horseradish Peroxidase)
Kb	kilo bazí (1 000 bazí)
Mb	mega báze (1 000 000 bazí)
mRNA	mediátorová RNA

MRS	Man, Rogosa a Sharpe agar
MWF	kapaliny využívané při obrábění kovů (Metal Working Fluid)
PBS	fosfátový pufr
PFA	paraformaldehyd
PI	propidium jod
PNA	peptidová nukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
RING-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s využitím mnohonásobně značených polyribonukleotidových sond (Recognition of Individual Genes-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridizace)
tmRNA	ribonukleová kyselina s rysy transferové i mediátorové ribonukleové kyseliny
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSA	trypton sojový agar
TSB	trypton sojový bujón

Úvod

Biofilmy se vyskytují ve všech odvětvích lidské činnosti, ale mnohdy je jejich přítomnost nežádoucí. Mohou způsobovat technické problémy ve výrobních procesech, kontaminovat výrobky potravinářství, či dokonce způsobovat onemocnění, pokud se vyskytnou v lidském organismu. Bakterie tyto biofilmy vytváří pro posílení své odolnosti.

FISH je perspektivní metoda, která využívá značených sond k hybridizaci cílové genetické informace. Pokud se tento postup využije při detekcích biofilmů, tak dojde k navázání sondy na rRNA a tím k vizualizaci buňky. Navázání na rRNA se využívá z důvodu většího počtu ribozomů v buňce, díky čemuž je větší pravděpodobnost specifického navázání a také vyššího signálu. Tento proces probíhá rychle, v řádu hodin, na rozdíl od klasických kultivačních metod, které mohou probíhat i několik dní a mnohdy je nemožné některé bakterie kultivovat.

1 Historie Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je diagnostická metoda která využívá značenou sondu pro vizualizaci sekvencí DNA či celé buňky. Počátek metody FISH se datuje k roku 1970, kdy začaly být využívány sondy s radioizotopovým značením. Tyto sondy se vázaly na repetitivní sekvence na centromeře chromozomu. Výsledný záznam byl odečítán z autoradiogramů, což bylo nevýhodou pro slabší signály, které byly málo patrné (Kočárek, 2007).

Se značením radioaktivními izotopy se ovšem vyskytovalo hned několik problémů. Jedním z těchto problémů bylo že při tomto značení izotop podléhá rozpadu, což způsobuje že samotná sonda se stává nestabilní. Dalším úskalím při radioizotopové detekci je dlouhá doba expozice, která zpomaluje samotné získání výsledku. V neposlední řadě je problémem sama radioaktivita izotopů, která je nebezpečná a je proto potřeba aby s izotopy bylo zacházeno v souladu s přísnými předpisy (Levsky a Singer, 2003).

Tyto problémy byly vyřešeny příchodem fluoroforem značené sondy. Sonda byla vytvořena navázáním fluoroforu na RNA z 3' konce. Dříve byly sondy značeny enzymem po celé délce. Později byly využity amino-aryl modifikované báze, které byly důležité pro vývoj *in situ* technologií. Takto vytvářené sondy totiž mohly být později spojeny s fluoroforem. To přineslo možnost vytvářet sondy jednoduše chemickou cestou (Levsky a Singer, 2003).

Dalším krokem ve vývoji byla výměna nepřímé detekce za přímou. Nepřímá detekce probíhala, tak že se výstupní signál zvyšoval. Přímá detekce byla použita přibližně kolem roku 1990. Zakládala se na tom, že na jednovláknovou DNA sondu bylo možné navázat více fluoroforů a to posléze poskytlo větší odezvu, a tedy i možnost přímé detekce (Levsky a Singer, 2003).

Problematikou předešlých sond byla jejich délka. Pokud se totiž navázala dlouhá sonda nespecificky na vzorek, tak poskytovala falešný signál. Díky zkrácení sond se zlepšilo ovlivňování signálu šumem (Levsky a Singer, 2003).

2 Princip metody FISH

Metoda FISH je diagnostická metoda pro lokalizaci či identifikaci specifických úseků DNA či RNA a jejich následnou vizualizaci pomocí značených oligonukleotidových sond (Křížková *et al.*, 2003).

Tato metoda je velice důležitá pro lékařské účely, a to především v genetice, dále pak v mikrobiologii. Výhodou této metody je především její rychlost a možnost identifikovat bakterie, které je náročné nebo nemožné kultivovat. (Schweickert *et al.*, 2004).

Důležitým krokem při metodě FISH je provedení denaturace. Při denaturaci se totiž dvoušroubovice DNA rozvolní a vznikne jednovláknová DNA. Takto se denaturuje vzorek i sonda. Denaturace se provádí buď teplem, nebo alkáliemi, v prostředí malého objemu pufru.

Podmínky při denaturaci (teplota, čas, koncentrace solí apod.) se liší podle typu sondy i podle typu vzorku který detekujeme. Důležité je přizpůsobit vnější podmínky tak, aby při následné hybridizaci došlo k maximálnímu navázání a také aby se neporušila pospolitost buněk, či tkáně. Hybridizací se rozumí samotné navázání značené sondy na templátovou DNA/RNA (Price, 1993).

2.1 Sondy

Sondou se rozumí úsek genetické informace, nejčastěji úsek DNA, který je uměle připraven. Tento úsek je klonován pomocí vektoru. Jako vektor se používají plazmidy, kosmidy, bakteriofágy, fasmidy atd.

Délka sond se pohybuje mezi několika kb (kilobáze) až Mb (megabáze) ty jsou ovšem následně naštěpeny na kratší úseky (15-30 bází). Je samozřejmé že pro úspěšnou hybridizaci je potřebné mít vyšší koncentraci sondy než cílové DNA-zvyšuje se tím pravděpodobnost hybridizování. K jejich značení se využívá velkého množství barviv (Schweickert *et al.*, 2004; Kočárek, 2007).

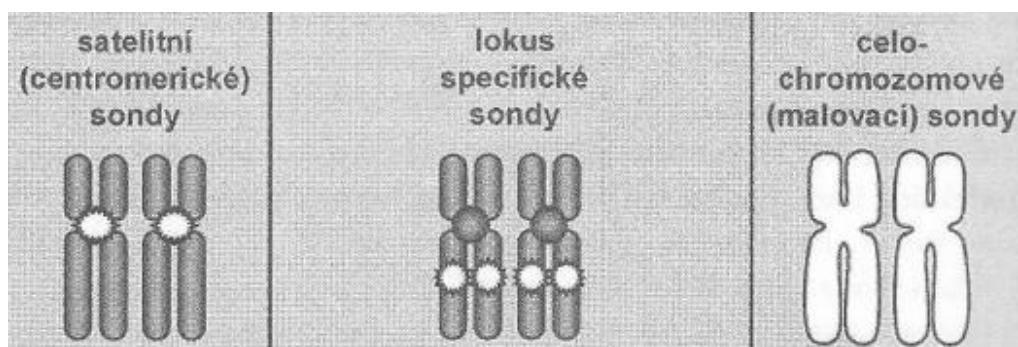
2.1.1 Rozdělení sond

Sondy můžeme dělit do tří základních skupin podle místa na chromozomu, na které se navazují. Dělí se na satelitní, lokus-specifické a celochromozomové (viz. obrázek 1).

Mezi satelitní sondy patří centromerické a telomerické sondy, které se váží na repetitivní úseky DNA na centromerách, nebo telomerech. Tyto repetitivní úseky mohou obsahovat až tisíce opakování, díky čemuž poskytují širokou oblast pro navázání sondy. Častěji používaným sondami jsou centromerické, protože telomerické neposkytují dostatečnou specifickou (Price, 1993; Kočárek, 2007).

Lokus-specifické sondy hybridizují na specifickou sekvenci genu, která není repetitivní. Jsou schopny hybridizovat i s celým genem či skupinou (Kočárek, 2007).

Celochromozomové (malovací) sondy hybridizují na specifickém místě chromozomu. To způsobí, že při pozorování, na chromozomu nezáří pouze jedno místo, ale celý chromozom (Kočárek, 2007).



Obrázek 1 Grafické znázornění umístění jednotlivých typů sond (Kočárek, 2007)

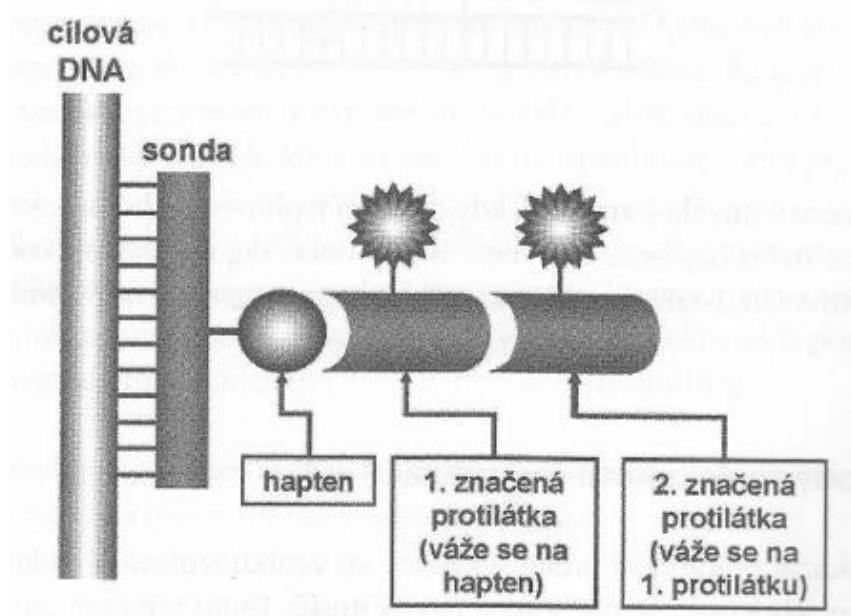
2.1.2 Značení sond

Sondy lze rozdělit podle jejich značení na přímo či nepřímo značené.

Při přímém značení může být použito fluorescenční barvivo (fluoresceinisothiokyanát, tetramethylrhodamin, texaská červeň, cyamin), radioaktivní izotop (^{32}P , ^3H , ^{14}C) nebo enzym (katalyzuje vznik barevného nebo fluoreskujícího produktu). Při značení fluorescenčním barvivem je běžným postupem použití dvou barviv na jednu sondu. Tím vznikne smíšený signál. Ovšem jedním problémem při použití dvou barev může být jejich vzájemná kompetice, kdy bude sonda s jedním druhem barviva spíše navázána, než sonda bez tohoto barviva (příkladem může být značení Cy3 popřípadě Cy5 a Fluosem, kdy se sondy značené barvy Cy navazují lépe). Příkladem enzymového značení je využití křenové peroxidázy (HRP) na kterou je poté navázána fluorescenčně označená molekula tyraminu.

Dalšími způsoby, jak značit enzym je pomocí fluorochromu, biotinu či digoxigeninu. Někdy je signál po značení stále malý. V tom případě je možné označit sondu nejen na 5'konci, ale i na 3'konci (Křížková *et al.*, 2003; Kočárek, 2007; Pernthaler, 2002; Behnam, *et al.* 2012; Hougaard *et al.* 1997; Schweickert *et al.*, 2004).

Nepřímé značení probíhá haptenem nebo biotinem, kdy je poté vzorek inkubován s protilátkou značenou fluoroforem. I při této metodě je možné navázat více fluoroforů na protilátku. Výhodou nepřímé detekce je její vyšší citlivost (cca 10-15%), ale naopak nevýhodou je delší doba inkubace pro navázání protilátky. Signál lze ještě zvýšit navázáním druhé protilátky (viz obrázek 2). Dalším problémem může být větší fluorescence pozadí, která je způsobena nespecifickým navazováním protilátek na ostatní části buňky (Křížková *et al.*, 2003; Kočárek, 2007; Ried, 1992; Morison, 2003).



Obrázek 2 Nepřímé značení pomocí dvou protilátek (Kočárek, 2007)

3 Základní postup při FISH

Nejčastějším cílem pro navání sondy je 16S rRNA. Jedná se o sekvenci nukleotidů v malé podjednotce ribozomu, která se vyskytuje u všech prokaryotických organismů. Toto místo však nemusí poskytovat dostatečný prostor pro druhově specifické sondy. Dalšími cílová místa, která se využívají jsou: 23S rRNA, 16S-23S rRNA, 18S rRNA, 26S rRNA, tmRNA a mRNA. Metoda FISH je výhodná jak pro kvalitativní analýzu vzorků, tak i pro kvantitativní vyhodnocení počtu jednotlivých mikroorganismů, aniž by došlo k narušení biofilmu (Azevedo, *et al.*, 2015; Schweickert *et al.*, 2004).

Základními kroky při FISH je fixace a denaturace vzorku, poté hybridizace sondy na cílovou genetickou informaci. Po hybridizaci je provedeno promývání pro odstranění nehybridizovaných sond a poté odečítání signálu. Tyto kroky jsou podrobněji popsány níže.

3.1 Fixace a denaturace vzorku

Tento krok je důležitý pro přichycení vzorku a následný průnik sondy do buňky. Průnik sondy do buňky musí být dostatečný, při malém průniku totiž v buňce nedojde k dostatečnému fluorescenčnímu signálu. Nejčastěji používané roztoky pro fixaci jsou buď srážecí (ethanol nebo methanol) nebo ze síťující (formaldehyd). Při fixaci mikroorganismů, které obsahují v buněčné stěně více peptidoglykanů, dochází ke špatnému pronikání těchto roztoků přes buněčnou stěnu (jedná se především o grampozitivní mikroorganismy). Jedním způsobem, jak překonat tento problém je využití PNA sond (peptidových nukleových kyselin). Po fixaci musí být roztok vymyt, aby mohla být provedena hybridizace (Schweickert *et al.*, 2004).

Cílem denaturace je rozvolnění dvouřetězcové DNA na jednořetězcovou, což umožní navázání sondy pro hybridizaci (Price, 1993).

3.2 Hybridizace sondy a cílové DNA

Hybridizace se provádí v malém objemu pufru v tmavé vlhké komůrce. Při hybridizaci dochází k navázání sondy na DNA či RNA cílové buňky. Při detekcích bakterií se využívá především hybridizace na rRNA. To z důvodu že rRNA je v buňce obsažena ve vyšší míře a díky tomu poskytují více vazebných míst. Výsledná síla signálu je tedy závislá na obsahu ribozomů v buňce a ten je ovlivněn stářím buňky, dále například použitým barvivem či typem sondy.

Optimální velikost sondy pro hybridizaci je 10-25 kb Čas hybridizace se pohybuje od hodiny až po celý den a závisí na typu sondy (Kočárek, 2007; Price, 1993; Saha *et al.*, 2012).

3.3 Odstranění nespecifických signálů

Při tomto kroku provedeme vymytí nehybridizovaných sond a sond navázaných na nespecifická místa. Tyto nehybridizované sondy by rušili stanovení, poskytováním falešného signálu. Můžeme použít např. TBS a triton (Kočárek E., 2007; Křížková *et al.*, 2003).

3.4 Vyhodnocení hybridizačního signálu

Signál se vyhodnocuje nejčastěji pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Zdrojem světla je výbojka, která je opatřena filtry pro vybrání určité vlnové délky. Různé filtry jsou určeny pro různá barviva. Tento způsob je nejčastěji používaným, protože vyžaduje minimální technické zázemí (epifluorescenční mikroskop a sadu filtrů odpovídajících používaným fluorochromům). Dalším způsobem, jak lze detekovat hybridizované bakterie, je pomocí průtokové cytometrie či konfokální laserovou skenovací mikroskopii (CLSM) (Azevedo *et al.* 2015; Kočárek, 2007; Lopes *et al.*, 2015; Andorra *et al.*, 2011; Neuenschwander *et al.*, 2015; Pernthaler *et al.*, 2001).

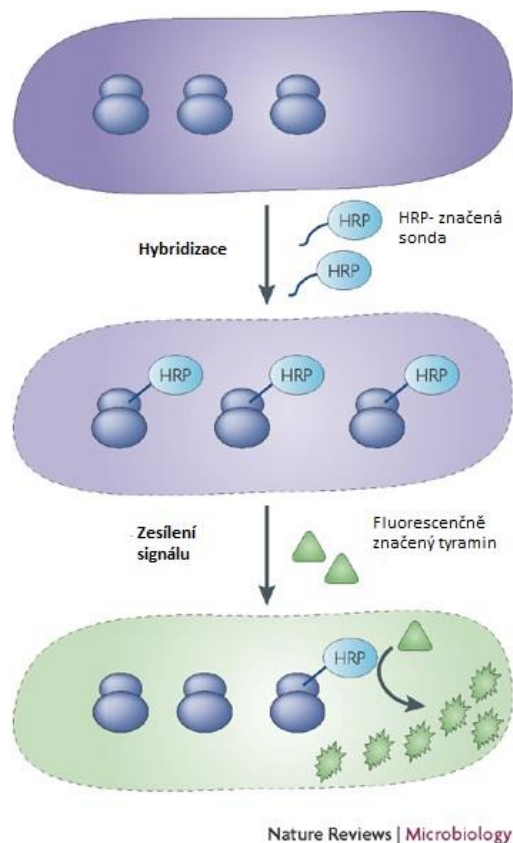
4 Modifikace a využití FISH

4.1 Modifikace

Klasická metoda FISH neposkytuje dostatečnou citlivost. Z tohoto důvodu byly vyvinuty modifikace, které zlepšují vizualizaci a snižují šum okolí. Základní z těchto modifikací jsou popsány níže (Kočárek, 2002).

4.1.1 CARD-FISH (TSA)

Jedná se o FISH, která využívá sondu značenou enzymem křenovou peroxidázou (Catalized Reported Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization). Křenová peroxidáza (HRP) je navázána na sondu a poté je na HRP navázána fluorescenčně značená tyraminová molekula (viz obrázek 3). Takto značených sond je navázáno na cílovou molekulu velké množství. Navázání těchto molekul ve vysoké koncentraci může způsobit dimeraci, ale pokud se použijí pouze pro zvýšení signálu, tak k tomuto jevu dojde pouze v malé míře. Proto se tyramin využívá v kombinaci s nukleotidovými sondami. Další možnou kombinací CARD-FISH může být spojení s mikroautoradiografií, mikroelektrickým měřením, Ramanovou mikrospektroskopií a NanoSIMS. Takto kombinovaná metoda je nejvíce využívána pro detekci mikroorganismů. Jednou z novějších, a ne příliš prozkoumaných možností pro studia společenstev mikroorganismů je kombinace CARD-FISH s transmisní elektronovou mikroskopií (klasickou nebo kryogenní). Pro svou citlivost se využívá k mapování genomu a genové exprese, prenatalní diagnostice a při studiu mikrobiálních infekcí (Pernthaler *et al.*, 2002; Pernthaler *et al.*, 2004; Wagner a Haider, 2012; Raap, 1998; Neuenschwander *et al.*, 2015).



Obrázek 3 Schéma CARD-FISH (upraveno podle Amman, 2008)

4.1.2 CLASI-FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace s kombinatorickým značením se spektrálním zobrazením (CLASI-FISH) využívá navázání dvou či více sond. Každá je značena jiným barvivem a obě sondy spolu soutěží o vazebné místo. Cílový organismus má poté různé kombinace označení. Výsledný signál se odečítá s pomocí mikroskopu a spektrálních technik. Podobné sondy jsou ovšem schopny mít jinou afinitu k cílovému místu v závislosti na použitém barvivu, což způsobuje potíže při identifikaci mikroorganismů. Jejich společná kompetice způsobí, že se výsledný signál sníží o 50 %. Jedním ze způsobů, jak této situaci předejít, je využití kombinace s DOPE-FISH metodou (Wagner a Haider, 2012; Behnam *et al.*, 2012).

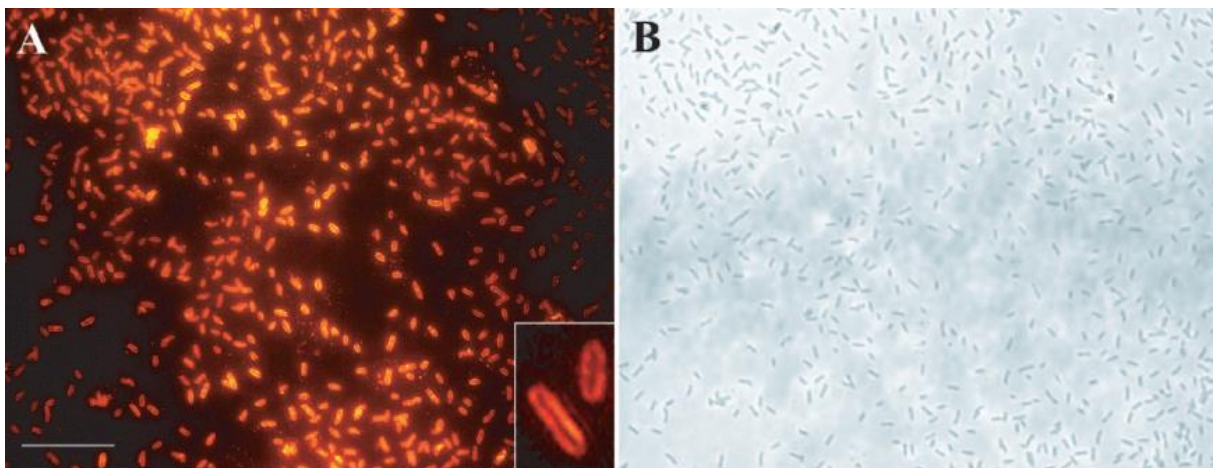
4.1.3 DOPE-FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace s dvojitě značenou sondou (DOPE-FISH) zachovává jednoduchost klasické metody, ale poskytuje dvojnásobnou citlivost a zvyšuje dostupnost sondy na cílové místo. V tomto případě jsou na jednu oligonukleotidovou sondu navázána dva

fluorochromy. Tímto způsobem se vytváří smíšený signál. Intenzita signálu je výraznější než při použití jiných metod (Wagner a Haider, 2012; Behnam *et al.*, 2012).

4.1.4 RING-FISH

Fluorescenční in situ hybridizace s využitím mnohonásobně značených polyribonukleotidových sond (RING-FISH) nazývaná také poly-FISH používá mnohonásobně značené sondy několika signalizačními molekulami. Tyto RNA sondy se seskupí a zesílí okolo buňky. To má za následek vytvoření halo-efektu okolo buněk. Halo-efekt je možno pozorovat na obrázku 4. Část A zobrazuje kulturu zobrazenou pomocí RING-FISH a část B kulturu zobrazenou pomocí fázového kontrastu. Tato metoda pomohla k identifikaci a kvantifikaci bakterií v planktonu. Výsledný signál a citlivost byl až padesátinásobně vyšší než konvenční FISH. Díky vlastnostem RING-FISH bylo možné detekovat geny, či fragmenty genů s nízkou koncentrací v buňce (Pratscher *et al.*, 2009).



Obrázek 4 Halo-efekt RING-FISH (upraveno podle Pratscher *et al.*, 2009)

4.1.5 Fiber-FISH

FISH provedená na vlákně (Fiber-FISH) není klasická metoda FISH, neboť se hybridizace neprovádí v přítomnosti buňky, ale pouze na holém vlákně DNA. DNA se z buňky vyizoluje a následně se na ni navážou fluorescenčně značené sondy. Je důležité, aby bylo vlákno co možná nejrovnější, bez zlomů a překryvů s jiným vláknem, neboť to může vést ke špatné interpretaci výsledku. Tato metoda je vysoce citlivá a využívá se při mapování genomu, kdy se využívají různě značené lokus specifické sondy. Dále je také možné ji využít při testování samotných

naklonovaných sond. Výhodou Fiber-FISH například oproti PCR je možnost studovat velkou genetickou oblast v jednom experimentu (Kočárek, 2007; Raap, 1998).

4.1.6 LNA a PNA FISH

FISH s využitím peptidových nukleových kyselin jako sond (PNA-FISH) a FISH s deriváty uzavřených nukleových kyselin (LNA-FISH) jsou metody které mají lepší afinitu k cílové DNA/RNA než klasické DNA sondy. Dále jsou více biostabilní (odolné proti nukleázové degradaci), jejich výsledky mají nižší šum a celkově jsou citlivější a specifitější (Azevedo *et al.*, 2015).

LNA je analogem RNA, který obsahuje ribosový kruh, který je uzamčen O2'-C4'-methylenem. Tento typ sond může být použit pro terapeutické a diagnostické účely. Jejich využití pro rozbor biofilmu byl prvně použit v práci Azevedo *et al.* (2015).

PNA sondy jsou uměle vytvářeny v laboratořích. Jedná se pseudopeptidy s nenasyceným polyamidovým řetězcem. Místo záporně nabitého cukr-fosfátového skeletu mají neutrální skupinu. Díky tomu jsou afinitnější k cílovému místu a tvoří pevnější vazbu než běžné DNA sondy (Perry-O'Keefe *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2013).

4.2 Využití FISH

Metoda FISH může být využita v různých odvětvích lidské činnosti, při identifikaci genetických onemocnění, detekci bakterií a podobně. Některá z těchto využití jsou pospána níže.

4.2.1 Medicína

Pravděpodobně nejběžněji se FISH využívá v medicíně. FISH je schopna vizualizovat změny genetické informace např. duplikace, zesílení, translokace atd. Díky tomu se stává velice důležitou diagnostickou metodou. Využití při diagnostice genetických onemocnění má jiné podmínky než při detekci bakterií. Buňky se musí nacházet v metafázi, aby bylo po navázání sondy možné lokalizovat poruchu (Kočárek, 2007; Halling a Kipp, 2007; Perkar-Zlotin *et al.*, 2015).

Využívá se při detekcích chromozomálních změn v nádorových buňkách. Metoda FISH je citlivější než běžně používané metody pro detekci karcinomů. Někteří pacienti, kteří měli negativní cytologii, mělo pozitivní test pomocí FISH. I přes fakt, že u nich nebyl nalezen karcinom se až u 65 % z nich objevila recidiva do 29 měsíců. Tento fakt prokazuje význam výsledků, kterých lze FISH dosáhnout. Využívá se například u rakoviny plic či prsu (Halling a Kipp, 2007; Perkar-Zlotin *et al.*, 2015).

Dalším medicínským využitím FISH je detekce bakterií. Lze je využít k detekci patogenních bakterií vyskytujících se v zažívacím traktu, dýchacím ústrojí, močových cestách atd. Zde je zásadní výhodou rychlost získání výsledků, která je při určování patogenů u pacientů stěžejní (Azevedo *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2017; Bertl *et al.*, 2015).

4.2.2 Potravinářství

Potravinářské výrobky jsou často kontaminovány patogeny, které každoročně způsobují miliony onemocnění a mnohdy i smrt. Jak již bylo zmíněno výše klasické kultivační metody jsou časově náročné, v řádu dnů někdy i týdnů. Nejčastěji zkoumanými patogeny v potravinách jsou především *Salmonella enterica*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes* či *E. coli*. Při zkoumání žádoucích bakterií pak byly detekovány rody *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.* nebo *Leuconostoc spp.*. I přes své nesporné výhody není metoda FISH běžně rozšířenou metodou. Nejčastěji se používají kultivační metody, založené na legislativních standardizovaných protokolech (Rohde *et al.*, 2015).

Další možností, kde lze FISH použít je při detekci kvasinek. Příkladem je studie Andorra *et al.*, (2011), kde se tým zabývá detekcí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Hanseniaspora guilliermondi*. Využívají FISH pro určení vlivu alkoholu na růst kvasinek (Andorra *et al.*, 2011).

4.2.3 Průmysl

Mnoho bakterií či biofilmů se vyskytuje i v různých odvětvích technického průmyslu, kde mohou způsobovat technické závady či degradaci produktů. Z toho důvodu je potřeba analyzovat vzorky z různých částí výroby v poměrně krátkém čase. Příkladem využití FISH je detekce mikroorganismů v kovoobráběcích roztocích (Saha *et al.*, 2012).

4.2.4 Životní prostředí

V životním prostředí se vyskytuje velké množství bakterií. Vědecké týmy se zabývají výskytem a činnostmi těchto bakterií. K tomuto účelu je vhodné využít FISH. Příkladem je analýza bakterií obsažených v mořské vodě. Některé z těchto bakterií nejsou schopny kultivace, proto je vhodné použít této molekulárně biochemické metody, pro jejich rozlišení. FISH lze také využít při identifikaci bakterií v aktivovaném kalu v čističkách odpadních vod. Bakterie aktivovaného kalu tvoří komplexní systém, ve kterém jsou bakterie provádějící denitrifikaci, deaminaci, oxidaci a podobně. I zde je vhodné použít FISH pro rozlišení jednotlivých kmenů a optimalizaci čistícího procesu například pro snížení pění či zlepšení odbourání fosforu (Eilers *et al.*, 2000; Pernthaler a Amann, 2004; Wagner *et al.*, 2002)

5 Praktická měření

5.1 DOPE-FISH pro detekci šesti mikrobiálních populací

V tomto experimentu se kolektiv Behman *et al.* (2012) rozhodli využít DOPE-FISH jako náhradu za CLASI-FISH, která neposkytuje takovou citlivost. Pro demonstraci se rozhodli využít šesti taxonů které analyzovali v jednom kroku. V této práci jej uvádím jako příklad, kdy lze identifikovat i komplikovanější biofilm.

5.1.1 Kultury

Jako modelový organismus byla použita *Escherichia coli* a experimentální biofilm byl získán z tří jedinců *Ancorina alata*. Jedná se o rody *Poribacteria*, *Nitrospira*, *Chloroflexi*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Archea*.

V první řadě byla vypěstována čistá kultura *Escherichia coli* v bujonu Luria-Bertani. Kultura byla inkubována až do stacionární fáze a poté byla zafixována paraformaldehydem (PFA). Bujon Luria-Bertani je tekuté médium bohaté na živiny, které se často využívá mikrobiology, protože urychluje a podporuje růst bakterií. Skládá se z tryptonu, kvasničného extraktu a chloridu sodného. Nakonec se upravuje pH pomocí hydroxidu sodného na hodnotu 7 (Sezonov, 2003).

Tkáňové vzorky, ze kterých měl být získán biofilm pro analýzu, byly nakrájeny na části o ploše 2 mm³ a poté také zafixovány v PFA po dobu 4 hodin. Po fixaci byly uloženy do fyziologického roztoku pufovaného alkoholfosfátem a uloženy v -20°C.

5.1.2 Sondy

Pro *Escherichia coli* byla zvolena sonda EUB338 zaměřené na 16S rRNA, tato sonda je vhodná pro většinu bakterií, a sonda Gam42a zaměřená na 23S rRNA mnoha členů *Gammaproteobacteria*. Použité sondy a barviva jsou uvedeny v tabulce 1 společně s příslušným rodem bakterií.

Tabulka 1 Značení sond pro jednotlivé rody při DOPE-FISH (upraveno podle Behnam *et al.*, 2012)

Rod	Název sondy	Barvivo 1	Barvivo 2
<i>Escherichia coli</i>	EUB338	Fluos/Cy3/Cy5	
	Gam42a	Cy3	Cy3
<i>Poribacteria</i>	Por1130	Fluos	Cy3
<i>Chloroflexi</i>	GNSB-941	Fluos	Cy5
<i>Nitrospira</i>	Ntspa662	Cy5	Cy3
<i>Deltaproteobacteria</i>	Delta495a	Fluos	Fluos
<i>Gammaproteobacteria</i>	Gam42a	Cy3	Cy3
<i>Archaea</i>	Arch915	Cy5	Cy5

5.1.3 Hybridizace

Hybridizace všech vzorků byla prováděna po dobu 4 hodin a poté byl vzorek promýván 10 minut, aby byly odstraněny nežádoucí signály. Koncentrace použitých sond byla 5 pmol. Pro hybridizaci *A. alata* byla využita ekvimolární směs sond s příměsí neznačených soutěžních sond pro Ntspa662 a Gam42a. Hybridizace byla provedena v 35 % roztoku formaldehydu v hybridizačním pufru. Signál byl následně kvantifikován pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM).

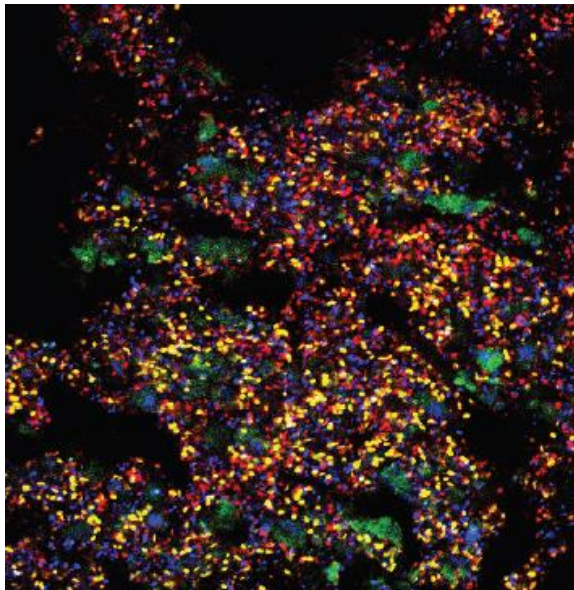
V první řadě se provedla normalizace signálu na bakterii *Escherichia coli*. Normalizace se prováděla abychom získali údaj o odezvě čistých barviv, které poté ve smíšeném signálu poskytují rozdílnou odezvu. Ta byla provedena na mono-značené sondě pomocí Cy3, Cy5 a Fluosem. Následně se napodobil přístup CLASI-FISH a bylo provedeno měření s dvojitě značenými sondami v kombinaci Cy3-Fluos, Cy3-Cy5 a Cy5-Fluos. Z tohoto pokusu vyšly předpokládané výsledky. Prvním předpokladem bylo že podobná barviva poskytnou 50% snížení intenzity signálu. To nastalo při použití barviv Cy3 a Cy5 která jsou si podobná jak chemickými vlastnostmi, tak molekulární hmotností. Dalším výsledkem bylo že při použití dvojitě značených sond (Cy3-Fluos a Cy5-Fluos) se na cílové místo přednostně navázaly sondy značené Cy3 a Cy5 barvivem.

5.1.4 Výsledky experimentu

Při detekci biofilmu z *A. alata* došlo k úspěšnému rozlišení jednotlivých taxonů bez zásadních technických problémů, za použití dvojitěho značení. Při nahrávání snímků se vyskytoval problém s rodem *Nitrospira*, který byl značen sondou s podobnými fluorochromy. Tento rod

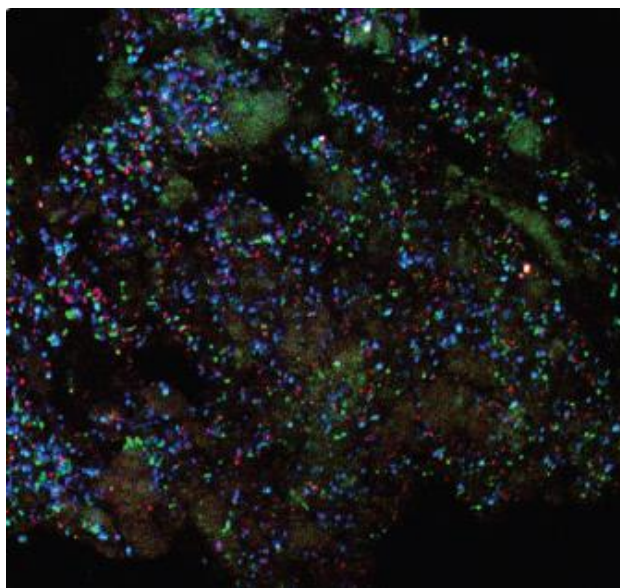
měl nízkou intenzitu signálu, a proto bylo nutné zvýšit detekční citlivost na Cy3 a Cy5 barviva. Toto zvýšení ovšem vedlo k nadměrné expozici sond nesoucích Cy3 a Cy5 barviv. Výsledný obraz pozorovaný po hybridizaci je možné vidět na obrázcích 5 a 6, kde je vidět rozdílné zbarvení jednotlivých kolonií.

Závěrem tohoto experimentu autoři tedy uvádí úspěch v detekci šesti taxonů v jednom pozorování pomocí DOPE-FISH a také se shodují že CLASI-FISH je perspektivní metoda která v sobě skrývá dost potenciálu pro rozvoj FISH metod (Behnam *et al.*, 2012).



Obrázek 5 Záznam z CLSM smíšené kultury 1 (Behnam *et al.*, 2012)

Poribacteria (žlutá), *Gammaproteobacteria* (červená) a *Archaea* (modrá); velké zelené plochy jsou autofluorescence.



Obrázek 6 Záznam z CLSM smíšené kultury 2 (Behnam *et al.*, 2012)

Nitrospira (růžová); *Chloroflexi* (tyrkysová) a *Deltaproteobacteria* (zelená); větší zelené plochy jsou autofluorescence.

5.2 Detekce biofilmu pomocí LNA-FISH

Ve studii Azevedo *et al.*, (2015) se tým zaměřil na použití, popsání a validování metody LNA-FISH. Pro demonstraci si tým vybral kultury bakterií, které jsou hlavními příčinami při zánětu močových cest.

5.2.1 Kultury

Pro tento experiment byly vybrány kultury *Escherichia coli*, *Delftia tsuruhatensis*, *Achromobacter xylosoxidans* a *Burkholderia fungorum*. Tyto kultury byly vykultivovány na tripton-sojovém agaru (TSA) a inkubovány při 37°C. Izolované kolonie byly poté připraveny pro měření, přenesením na podložní sklo. Na těchto sklíčkách byly ponechány maximálně po dobu 20-24 hodin (*Escherichia coli*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Delftia tsuruhatensis*) nebo 48 hodin (*Burkholderia fungorum*) a poté analyzovány.

Kultivace byla provedena do několika fází růstu (lag fáze, exponenciální fáze, ranná stacionární fáze a pozdní stacionární fáze). Pro stanovení jednotlivých růstových fází byl proveden test rezazurinem. Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) je modré barvivo které je rozkládáno pomocí metabolicky aktivních buněk na růžové. Tudiž je množství

přeměněného barviva z modré na růžovou rovno počtu živých buněk (Azevedo *et al.*, 2015; Zalata *et al.*, 1998).

5.2.2 Sondy

V experimentu byly také navrženy oligonukleotidové sondy o velikosti 13bp a 16 bp. Dvě různé velikosti byly zvoleny, protože se tím zvýší pravděpodobnost nalezení sond pracujících při stejné teplotě. Při syntéze LNA/2^{Me} oligonukleotidových sond byly využity poznatky z prací Fontenete *et al.*, (2013) a Soe *et al.*, (2011) sondy byly syntetizovány pomocí automatizovaného syntetizátoru nukleových kyselin (PerSpective Biosystems Expedite 8909 instrument).

LNA/2^{Me} sondy zvolené pro *Escherichia coli* hybridizují v oblasti 23S rRNA v poloze 1505 a 1520. Sondy zvolené pro ostatní tři kultury (*Achromobacter xylosoxidans*, *Delftia tsuruhatensis* a *Burkholderia fungorum*) hybridizují v oblasti 16S rRNA. Cílové sekvence jsou pro *Delftia tsuruhatensis* mezi 404 až 419, 411-426 pro *Burkholderia fungorum* a 590-605 pro *Achromobacter xylosoxidans*.

5.2.3 Hybridizace

Pro stanovení optimálních podmínek hybridizace byly provedeny experimenty na sklíčkách. Pro určení specificity byla použita směs dvou kultur a k nim byla přidána směs dvou odpovídajících sond. Dále byla provedena hybridizace v suspenzi, pro určení počtu kolonií pomocí průtokové cytometrie.

Optimální teplota byla hledána mezi 51-59 °C. Test každé oligonukleotidové sondy byl prováděn na sklíčku, pro zjištění optimální teploty, při které by byl signál FISH největší. Nejintenzivnějšího signálu bylo dosaženo při 55 °C, výjimku tvořila sonda pro *Achromobacter xylosoxidans*, která měla optimální teplotu při 53 °C.

Pokud byla provedena hybridizace směsi dvou kultur, tak se začal vyskytovat problém v podobě křížové hybridizace. Jedná se o navázání sondy na jinou kulturu, než je původní záměr. To vede k poklesu specificity oligonukleotidových sond. Jednalo se především o kombinace *E. coli* / *Delftia tsuruhatensis* a *E. coli* / *Achromobacter xylosoxidans*. Tento problém se povedlo vyřešit zvýšením hybridizačních teplot o 2 °C. Při zvýšení teploty na 57 °C nedocházelo k chybné hybridizaci a, i poměr signálu k šumu byl optimální. Teplota hybridizace byla stanovena na 57°C. Konečná

specifická a senzitivita každé sondy je uvedena v tabulce 2. Jak je z této tabulky patrné je specifická jednotlivých sond téměř stoprocentní.

Tabulka 2 Teoretická specifická a citlivost LNA/2'OMe oligonukleotidových sond vypočítaných programem TestProbe (upraveno podle Azevedo *et al.*, 2015)

Bakterie	Sonda	Senzitivita (%)	Specifická (%)
<i>Escherichia coli</i>	Ec1505_LNA/2'OMe_13	70,6	97,2
	Ec1505_LNA/2'OMe_16	70,6	97,2
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	Dt404_LNA/2'OMe_13	97,8	99,9
	Dt404_LNA/2'OMe_16	97,8	99,9
<i>Burkholderia fungorum</i>	Bf411_LNA/2'OMe_13	90,5	99,9
	Bf411_LNA/2'OMe_16	90,5	99,9
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Ax590_LNA/2'OMe_13	97,8	99,9
	Ax590_LNA/2'OMe_16	97,8	99,9

5.2.4 Validace metody LNA-FISH

LNA-FISH není běžně používanou metodou pro stanovení biofilmu. Proto bylo nejprve potřeba stanovit rozsah a limity této metody.

Dále bylo stanoveno, jak je metoda LNA-FISH schopná detekovat bakterie, které jsou v různých fyziologických stavech. Pro tuto úpravu byly odebrány buňky v lag fázi, exponenciální fázi, ranné stacionární fázi a pozdní stacionární fázi. Počet buněk v jednotlivých fázích byl nejdříve stanoven v suspenzi pomocí LNA-FISH. Tento výsledek byl poté ověřen kultivační metodou a počítáním kolonie tvořících jednotek (CFU).

Druhým ověřením bylo využití barvení pomocí propidium jodidu (PI). Buňky, které byly kultivovány v tekutém médiu, byly zafixovány a z této fixované suspenze bylo odebráno 100 µl. Tento objem byl odstředěn a peleta byla převedena do 100 µl PI. Tato suspenze byla ponechána 10 minut v temnu. Poté byla opět odstředěna a peleta buněk byla převedena do fyziologického roztoku. Počítání bylo provedeno pomocí průtokové cytometrie. Tento postup byl proveden pro každý druh bakterií. Výsledky byly využity pro stanovení Pearsonova korelačního koeficientu.

Pearsonův korelační koeficient měří sílu lineárního vztahu mezi dvěma proměnnými. Jedná se o bezrozměrnou jednotku, která může nabývat hodnot od 1 přes 0 po -1. Pokud nabyde hodnot 1 či -1 jedná se o korelaci a je zde lineární spojení hodnot, jestliže má hodnotu 0 nejedná se o korelaci, a tudíž o žádné lineární spojení. Když jsou hodnoty stoupající koeficient nabývá kladných hodnot, pokud klesající koeficient je záporný (Sedgwick, 2012).

5.2.5 Výsledky experimentu

Záměrem této práce bylo vytvořit a validovat metodu využívající LNA sondy ve FISH pro detekci biofilmu. DNA a PNA sondy byly dříve hojně využívány při detekci biofilmu, a proto se tým zaměřil na využití potenciálu LNA sond. Při experimentech byla úspěšně detekována a rozlišena dvojice kultur tvořená *Escherichia coli* a dalších bakterií (*Delftia tsuruhatensis*, *Achromobacter xylosoxidans* nebo *Burkholderia fungorum*). Při detekci se podařilo vyřešit i nastalý problém s křížovou hybridizací pomocí zvýšení teploty při hybridizaci.

Dalším krokem při validaci metody bylo i stanovení počtu mikroorganismů. Nejprve se provedlo stanovení v suspenzi pomocí LNA/2' Me oligonukleotidových sond a následně se výsledek zkontroloval pomocí PI testu a CFU. Z výsledků těchto metod se pro každou dvojici (LNA-FISH vs. CFU a LNA-FISH vs. PI) stanovil korelační koeficient. Tyto hodnoty jsou k nahlédnutí v tabulce 3.

Dle očekávání vyšly korelační koeficienty v kladných hodnotách pro kombinace *Escherichia coli* / *Delftia tsuruhatensis* a *Escherichia coli* / *Achromobacter xylosoxidans*. Pro *Burkholderia fungorum* vyšla korelace v záporné hodnotě (-0,92) LNA-FISH vs. CFU. Tento jev byl vysvětlen rozdílnými růstovými potřebami. Pokud nejsou podmínky pro růst bakterie optimální, tak bakterie přejde do dormance, to způsobí neschopnost vyhodnotit počet mikroorganismů pomocí CFU.

Tabulka 3 Rovnice lineární regrese a Pearsonova korelace mezi LNA-FISH a PI nebo CFU (upraveno podle Azevedo *et al.*, 2015)

Kultura		CFU vs. LNA-FISH	PI vs. LNA-FISH
<i>Escherichia coli</i>	Rovnice regrese	$y = 0,63x + 3,61$	$y = 0,7x + 2,67$
	R ²	0,9	0,86
	Pearsonova korelace	0,95	0,93
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	Rovnice regrese	$y = 0,73x + 3,18$	$y = 0,5846x + 3,79$
	R ²	0,78	0,71
	Pearsonova korelace	0,88	0,84
<i>Burkholderia fungorum</i>	Rovnice regrese	$y = 1,05x + 0,32$	$y = 0,87x + 1,556$
	R ²	0,69	0,98
	Pearsonova korelace	0,83	0,99
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Rovnice regrese	$y = -0,35x + 11,25$	$y = 0,71x + 2,09$
	R ²	0,85	0,69
	Pearsonova korelace	-0,92	0,83

5.3 Detekce rodu *Pseudomonas* v roztocích pro obrábění kovů

Kapaliny využívané při obrábění kovů (MWF) jsou roztoky hojně využívané v mnoha technických odvětvích, kde se využívají pro snižování teplot a tření, při zpracování výrobku. Mohou se skládat z různých složek např. oleje a vody. MWF jsou vytvářeny, aby pomohly odolávat korozi, ale bohužel to je činí náchylnějšími na mikrobiální, chemickou a fyzikální kontaminaci, což zhoršuje jejich vlastnosti coby maziva.

Proto se vědecká skupina Saha *et al.*, (2012) rozhodli využít FISH pro detekci biofilmů které se vytvářejí v MWF. Zaměřili se především na bakterie rodu *Pseudomonas*, které jsou kolonizátory MWF až v 80 % případů. Vzorke využité při tomto měření byly získány ze tří různých technických odvětví z firem nacházejících se ve státě Michigan.

5.3.1 Kultury

V tomto experimentu byly využity kultury *Pseudomonas oleovorans subsp. oleovorans*, *Pseudomonas oleovorans subsp. pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas mendocina* spolu s *Pseudomonas oleovorans subsp. lubricantis* a *Pseudomonas fluorescens*. Dále byla využita kultura *E. coli* pro negativní kontrolu. Všechny zkoumané kultury byly

pěstovány na TSA a v TSB. Inkubace probíhala po dobu 24-48 hodin při 37 °C, výjimku tvořil *Pseudomonas fluorescens*, který byl inkubován při 30 °C.

Při přípravě biofilmů byly kultury *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas oleovorans subsp. lubricantis* kultivovány dle svých ideálních podmínek v TSB, aby byla získána koncentrace buněk 10^8 CFU/ml. Kultury byly pipetovány do nových zkumavek, aby byla výsledná koncentrace 10^4 nebo 10^6 CFU/ml. Poté bylo přidáno mikrosklíčko a kultivace probíhala za ideálních podmínek, tak aby se na sklíčku vytvořil biofilm.

Pro studium struktury biofilmu byla po inkubaci sklíčka opláchnuta destilovanou vodou, pro odstranění nepřichycených buněk a obarvena methylenovou modří. Sklíčka využívaná pro FISH byla opláchnuta PBS (pH 7,2), také pro odstranění nepřichycených buněk, a okamžitě fixována 4 % PFA po dobu tří hodin při 4 °C. Po fixaci byla sklíčka opláchnuta PBS a uložena do směsi PBS a 100 % EtOH (1:1) při 4 °C. Takto připravené biofilmy byly pozorovány nejvýše do tří dnů od své přípravy.

5.3.2 Sondy

Při experimentu byly využity sondy cílené na 16S rRNA. Genová sekvence byla získána z projektu Ribosomal Database Project a GeneBank a ta byla posléze využita pro návrh sondy ve třech jiných programech např. ProbeMatch RDP. Navržené sondy měly průměrnou délku 23 bp. Specifická sonda Pseudo120 byla značena Cy3 na 5'konci. Univerzální sonda EUB338 byla značena FAM na 3'konci. Při využití sondy značené FAM se vyskytl problém s koncentrací formamidu. Sonda totiž ztrácela signál při koncentraci formamidu 40%, proto byl nakonec při hybridizaci využit roztok o koncentraci 30 %.

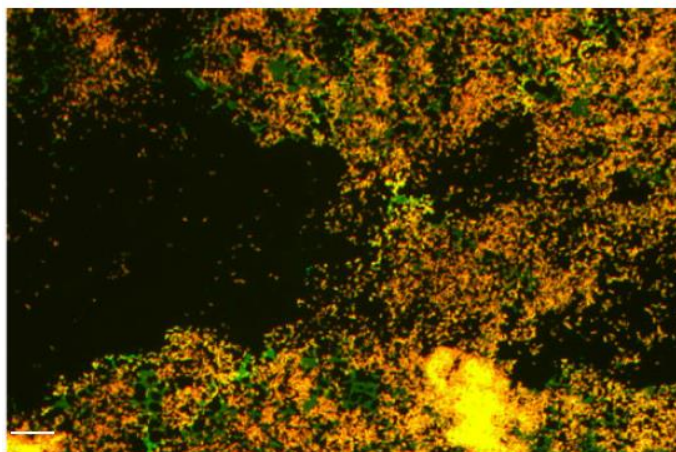
Pro zjištění citlivosti sond bylo provedeno měření při různých koncentracích buněk 10^1 - 10^4 CFU/ml. Citlivost sond byla stanovena na 10^1 CFU/ml. To lze přičíst tomu, že buňky byly vymyty, protože nebyly dostatečně přichyceny ke sklíčku.

5.3.3 Hybridizace

Pro analýzu vzorku MWF bylo odebráno 10 ml. Tento objem byl fixován 30 ml 4 % PFA po dobu 12 hodin za teploty 4 °C. Po fixaci byl vzorek odstředěn po dobu 20-ti minut a peleta byla promyta směsí PBF a ethanolu (1:1). Takto připravené buňky byly skladovány při -20 °C.

Ideální hybridizační podmínky byly stanoveny na 46 °C a koncentraci formamidu 30 %. Čas hybridizace byl 2 hodiny. Použitá koncentrace sondy byla 0,5ng/μl. Pro kontrolu byla použita kultura *Escherichia coli*, která při použití ve směsi neposkytla žádný fluorescenční signál, což potvrdilo specifickou sondy na zkoumanou bakterii.

Po provedení hybridizace byly výsledky vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu obrázek 7, je ukázka smíšené kultury *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens*. Jak je vidět specifická sond byla splněna rozlišením *Escherichia coli* zeleným zbarvením a *Pseudomonas fluorescens* žlutou, popřípadě oranžovou barvou.



Obrázek 7 Epifluorescenční záznam smíšené kultury *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens* vytvořený pomocí sondy Pseudo120 a EUB338 (Saha *et al.*, 2012) (*Escherichia coli* sonda EUB338- zelená; *Pseudomonas fluorescens* sondy Pseudo120 a EUB338- žlutá/oranžová)

5.3.4 Výsledky experimentu

Cílem této studie bylo nalezení sondy k detekci rodu *Pseudomonas*, která by byla vhodná pro rychlou detekci, při zkoumání vzorků MWF. Sonda splňující tyto vlastnosti byla Pseudo 120. Bylo také potvrzeno její použití pro rychlou detekci při ověřování ve výrobě.

Důležitým krokem, také bylo úspěšné vytvoření biofilmů z čistých kultur i jejich směsí. Tyto cíle byly úspěšně splněny jak pro modelové čisté kultury, tak pro samotné vzorky MWF z různých výrobních odvětví. Veškeré biofilmy bylo možné pozorovat již po 72 hodinách. Při porovnání citlivosti sond na různé koncentrace, bylo zjištěno, že při nižší koncentraci buněk dochází k tvorbě biofilmu přibližně o 24 hodin později. Z těchto výsledků autoři usoudili že při

dezinfekci systémů pro MWF lze docílit snížení rychlosti nárůstu biofilmu. Při různé počáteční koncentraci buněk, byla také pozorována různá tloušťka vytvořených biofilmů.

5.4 PNA-FISH pro detekci *Lactobacillus* a *Gardnerella* spp.

Bakteriální vaginózy jsou častý problém většiny žen v reprodukčním věku. Tyto nerovnováhy jsou způsobeny snížením počtu bakterií *Lactobacillus* a naopak přemnožením anaerobních bakterií především rodu *Gardnerella* (v největší míře *Gardnerella vaginalis*). Z tohoto důvodu se skupina Machado *et al.* (2013) rozhodla využít metody PNA-FISH pro analýzu mikrobiálního biofilmu, který se při této infekci tvoří na vaginální stěně.

Pro ověření účinnosti této metody, pro multiplexní systémy, bylo využito široké skupiny bakterií jak rodu *Lactobacillus* (36 zástupců), tak i rodu *Gardnerella* (22 zástupců) a dalších taxonomicky příbuzných kmenů (27 zástupců).

5.4.1 Kultury

Zástupci rodu *Lactobacillus* byly pěstovány na Man, Rogosa a Sharpe agaru (MRS) vyjma bakterie *Lactobacillus iners*, která byla kultivována na Brucella krevním agaru (BBA) stejně jako *Atopobium vaginae* a *Gardnerella vaginalis*. Ostatní kultury byly kultivovány na TSA či v mozkosrdcový bujon (BHI). Inkubace probíhala při 30 °C nebo při 37 °C za anaerobních podmínek podobu 24-48 hodin. Poté následovalo měření pomocí FISH.

MRS agar je agar, který je navržen tak aby poskytoval ideální podmínky pro růst bakterií *Lactobacillus* a potlačoval růst většiny konkurenčních bakterií. Toto médium může být dále modifikováno přidáním dalších složek a tím se dá docílit vyšší selektivity. BBA je médium vhodné pro kultivaci striktních anaerobních bakterií. Obsahuje vitamín K₁, hemin a ovčí krev, díky které lze dobře pozorovat zóny hemolýzy. BHI médium je vysoce výživné médium vytvořené z vařených srdcí a mozku. Využívá se pro širokou škálu mikroorganismů (Vinderola a Reinheimer, 1999; Reinhard *et al.*, 2005; BD Brain Heart Infusion, 2013).

5.4.2 Sondy

Pro návrh oligonukleotidové sondy pro rod *Gardnerella* byl využit program Primrose. Při návrhu PNA sondy byla snaha o to dosáhnout co nejvyšší komplementarity a malého množství

nekomplementárních sekvencí. Nakonec byla navržena sonda Gard162 hybridizující mezi 162 a 176 na 16S rRNA. Jako fluorofor pro tuto sondu byl vybrán Alexa Fluor 594.

Pro rod *Lactobacillus* byla vybrána již dříve navržená sonda Lac663. Tato sonda byla značena pomocí Alexa Fluor 488.

5.4.3 Hybridizace

Při hybridizaci čistých kultur, byly kolonie homogenizovány ve sterilní vodě a z takto vzniklé suspenze bylo odebráno 20 μ l a přeneseno na mikrosklíčko. Tato sklíčka byla sušena na vzduchu a poté ponořena do roztoku 4 % PFA a 50% ethanolu, po dobu 10 minut. Po fixaci následovalo převrstvení hybridizačním roztokem, který měl koncentraci PNA sondy 200 nM.

Postup při hybridizaci směsných kultur byl zcela totožný, kromě objemu odebrané suspenze bakterií, který činil 10 μ l. Pro potvrzení byl také použit slepý pokus, kdy hybridizace probíhala stejně, až na absenci sond v hybridizačním roztoku.

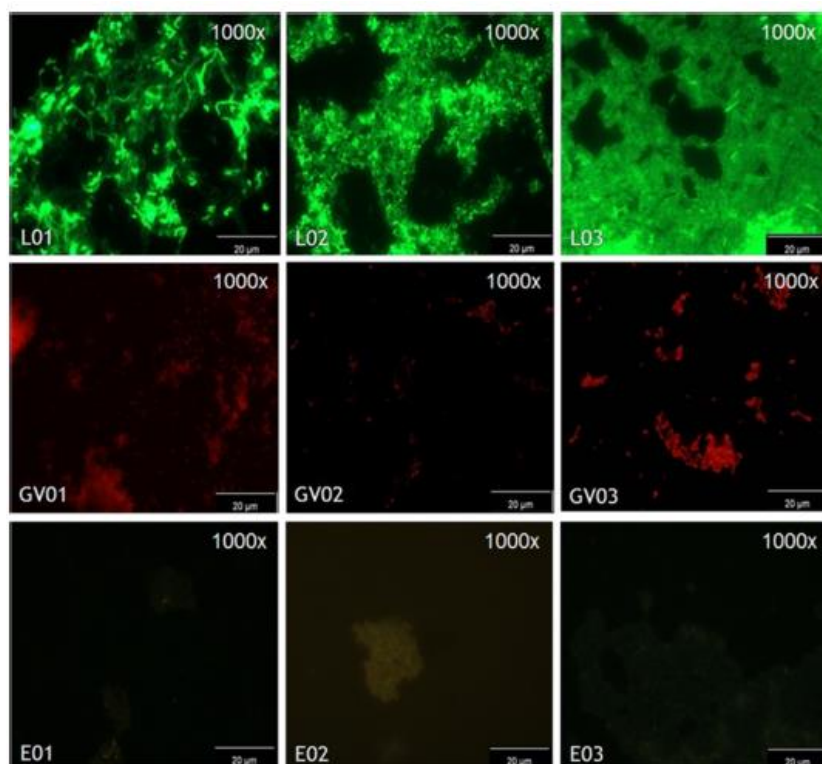
Inkubace probíhala ve vlhkých komůrkách při teplotě 60 °C a v čase 90 minut. Navazující promývací krok byl proveden ponořením sklíčka do roztoku po dobu 30 minut.

Při vizualizaci bylo využito epifluorescenčního mikroskopu, který byl schopen detekovat dvě různé PNA sondy.

5.4.4 Výsledky experimentu

Optimální podmínky pro hybridizaci byly stanoveny na 60 °C po dobu 90 minut. Tyto podmínky poskytovaly ideální poměr signálu a šumu.

Sonda Lac663 byla schopna hybridizovat se všemi zástupci rodu *Lactobacillus*, ale vyskytla se i její nežádoucí hybridizace s druhem *Streptococcus thermophilus* B. Sonda Gard162 úspěšně hybridizovala se všemi zástupci *Gardnerella vaginalis*. Schopnost hybridizace a selektivita sond Lac663 a Gard162 ukazuje obrázek 8. Sonda Lac663 poskytuje zelenou fluorescenci a sonda Gard162 červenou. Dále je z obrázku patrné, že tyto sondy naopak nehybridizují s ostatními zvolenými kmeny, které nevykazují žádnou fluorescenci (Machado *et al.*, 2013).



Obrázek 8 Epifluorescenční záznam vybraných kultur (upraveno z Machado *et al.*, 2013) (L01- *Lactobacillus paracasei*; L02- *Lactobacillus delbrueckii*; L03- *Lactobacillus murinus*; GV01- *Gardnerella vaginalis*; GV02- *Gardnerella vaginalis*; GV03- belgický izolát *Gardnerella vaginalis* 17; E01- *Streptococcus thermophilus* A; E02- *Leuconostoc mesenteroides*; E03- *Enterococcus faecium*)

5.5 Detekce rodů *Pseudomonas aeruginosa* a *Inquilinus limosus*

Ve své práci se Lopes *et al.* (2017) zabývá identifikací bakterií, které způsobují onemocnění u osob trpících cystickou fibrózou (CF). U tohoto genetického onemocnění se v plicích tvoří hlenovitý sekret, který je ideálním prostředím pro růst biofilmů. Tyto mikroorganismy následně způsobují rozsáhlá infekční onemocnění. Nejčastěji vyskytující se bakterií je *Pseudomonas aeruginosa*. Dalšími druhy jsou např. *Inquilinus limosus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Dolosigranulum pigrum* a další.

Problémem při určování těchto bakterií je jejich dlouhá kultivační doba, specifické kultivační metody, nebo růst cizích bakterií na specifických médiích.

5.5.1 Kultury

Jednotlivé čisté kultury byly inkubovány na TSA při 37 °C po dobu 18-20 hodin či 48 hodin. Poté byly vždy po 2-3 dnech přeočkovány na novou půdu.

Při pokusu byly využívány čisté kultury *Pseudomonas aeruginosa* a *Inquilinus limosus*. Dále bylo potřeba využít i dalších bakterií k potvrzení selektivity používaných sond. Seznam těchto kultur je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4 Seznam kultur pro potvrzení selektivity sond

<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Dolosignarulum pigrum</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Burkholderia dolosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tyto kultury byly získány jak přímo ze slin pacientů s CF, tak byly použity sbírkové kultury. Dále byly využity izoláty i z jiných medicínských odvětví (např. bakterie z močového traktu).

5.5.2 Sondy

Tento experiment měl za úkol nalézt sondy pro kultury *Pseudomonas aeruginosa*, *Inquilinus limosus*. Sondy měly být specifické v multiplexním systému, při výskytu i dalších bakterií.

Sondy byly navrženy pomocí programu PrimRose ve spojení s databází Ribosomal Database Project II (RDP II). Výsledně byly vybrány sondy Paer565 pro *Pseudomonas aeruginosa* a Ilim569 pro *Inquilinus limosus*. Značení sond bylo provedeno pomocí fluorochromů Alexa. Alexa594 bylo použito pro sondu Paer565 a Alexa 488 pro sondu Ilim569.

5.5.3 Hybridizace

Návrh hybridizace byl nejprve proveden na čistých kulturách *Pseudomonas aeruginosa* a *Inquilinus limosus*. Dalším krokem bylo stanovení hybridizační teploty ve směsi. Výsledná teplota, kdy sondy poskytovali nejvyšší fluorescenci byla stanovena na 65 °C.

Při hybridizaci smíšené kultury byla suspenze složena ze tří bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Inquilinus limosus* a další kmen spojený s CF (typický, nebo atypický) v poměru 1:1:1, které byly rozptýleny ve fosfátovém pufru (PBS). Z této suspenze bylo odebráno 20 µl a aplikováno na sklíčko. Suspenze byla ponechána k uschnutí na vzduchu. Následovala fixace, která měla za úkol zlepšit permeabilitu buněk. Tento krok byl proveden roztokem PFA, který působil 10 minut a poté byl odstraněn. Následně byl použit 50% roztok ethanolu, který působil také 10 minut a poté byl odstraněn.

Pro hybridizaci byla použita koncentrace sond 200 nmol/l. Po aplikaci hybridizačního roztoku bylo sklíčko inkubováno v temnu 1 hodinu při 65 °C. Na hybridizaci navazoval promývací krok, který probíhal 30 minut v promývacím roztoku.

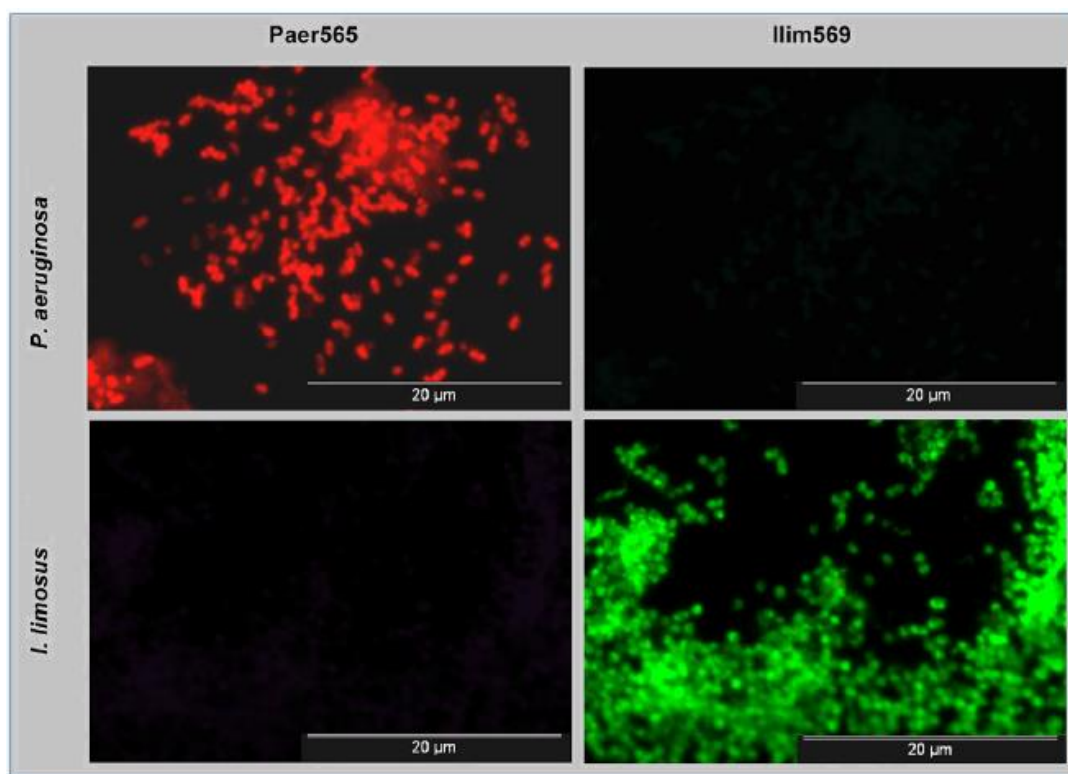
Výsledný signál byl snímán pomocí fluorescenčního mikroskopu.

5.5.4 Výsledky experimentu

Při hybridizaci sondou Paer565 byl signál výrazné červené barvy. Sonda se vážala specificky na *Pseudomonas aeruginosa* a nedošlo ke křížové hybridizaci se žádným příbuzným druhem. Sonda Ilim569 poskytovala jasný zelený signál. I zde došlo ke specifickému navázání pouze na *Inquilinus limosus*. Tyto signály je možné vidět na obrázku 9.

Při ověřování účinnosti metody PNA-FISH byl počet sledovaných buněk stanoven pomocí FISH a dále počítáním CFU. Při srovnání těchto výsledků, bylo zjištěno že počítání pomocí CFU udává menší počet buněk. Příčinou je pravděpodobně fakt, že ne všechny bakterie obsažené ve vzorku jsou schopny kultivace. Lze tedy předpokládat, že výsledek pomocí PNA-FISH je správný.

Na závěr se autoři zmiňují o výhodách PNA-FISH v analýze biofilmů v medicíně. Její výhodou je hlavně rychlost získání výsledku. Čas prodlevy je maximálně 3 hodiny, kdežto kultivační metody trvají minimálně 24 hodin.



Obrázek 9 Specifická fluorescence sond Paer565 a Ilim569 (upraveno podle Lopes *et al.*, 2017)

5.6 Detekce anaerobních patogenů na hlasových protézách

Hlasové protézy jsou pomocná zařízení pro pacienty, kteří podstoupili laryngektomii. Po tomto zákroku, by pacienti nebyli schopni mluvit, proto jsou jim doporučovány hlasové protézy. Tyto protézy bývají vyrobeny z lékařských polymerů. Kvůli jejich umístění jsou vhodným prostředím pro tvorbu biofilmů, a to snižuje jejich životnost. V důsledku toho musí být přibližně každé tři měsíce vyměňovány. Při vzniku biofilmu na hlasové protéze, dochází k rozšíření mikroorganismů do dutiny ústní, kde v důsledku jejich aktivity, dochází k rozvoji paradontitidy (paradentózy).

Cílem skupiny Bertl *et al.* (2015) bylo analyzovat složení biofilmu, který se tvoří na hlasových protézách a na základě těchto výsledků prodloužit životnost zařízení. Byla použita metoda FISH, kdy bylo pro analýzu vybráno 5 nejčastěji se vyskytujících patogenů.

5.6.1 Kultury

Vzorky pro tento experiment byly získány z hlasových protéz pacientů. Pacienti byli vybráni na otorhinolaryngologickém oddělení fakultní nemocnice ve Vídni. Po vyjmutí protéz

pacientů byly tyto protézy uchovány v PBS a poté pro FISH detekci fixovány 24 hodin v roztoku složeného z 4 % PFA v PBS. Po fixaci byly vzorky uloženy do roztoku ethanol/PBS (1:1).

Z takto připravených protéz byly poté připraveny jednotlivé vzorky. Pro lepší představu struktury biofilmu, byly protézy rozděleny na čtyři části, ze kterých byl posléze oškrábán biofilm. Ten byl poté rozpuštěn v roztoku EtOH/PBS. Z této suspenze bylo odebráno 10 µl a ty byly nanесeny na podložní sklo. Po uschnutí na vzduchu bylo sklíčko dehydratováno v 96 % EtOH po dobu 10 minut.

5.6.2 Sondy

Nejprve byla zvolena sonda pro pozitivní kontrolu. Zvolenou sondou byla EUB338, která je univerzální pro většinu bakterií. Byla označena rhodaminem. Dále byly vybrány sondy specifické pro jednotlivé bakterie, tyto sondy byly označeny fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Přehled těchto sond je uveden v tabulce 5. Použité sondy byly získány z firmy Euro-Gentec, Maastricht, Nizozemí.

Tabulka 5 Bakterie a komplementární sondy

Kultura	Sonda
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg477
<i>Tannerella forsythia</i>	Tf127
<i>Treponema denticola</i>	Td469
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fnuc133c
<i>Parvimonas micra</i>	Mmicros1435

5.6.3 Hybridizace

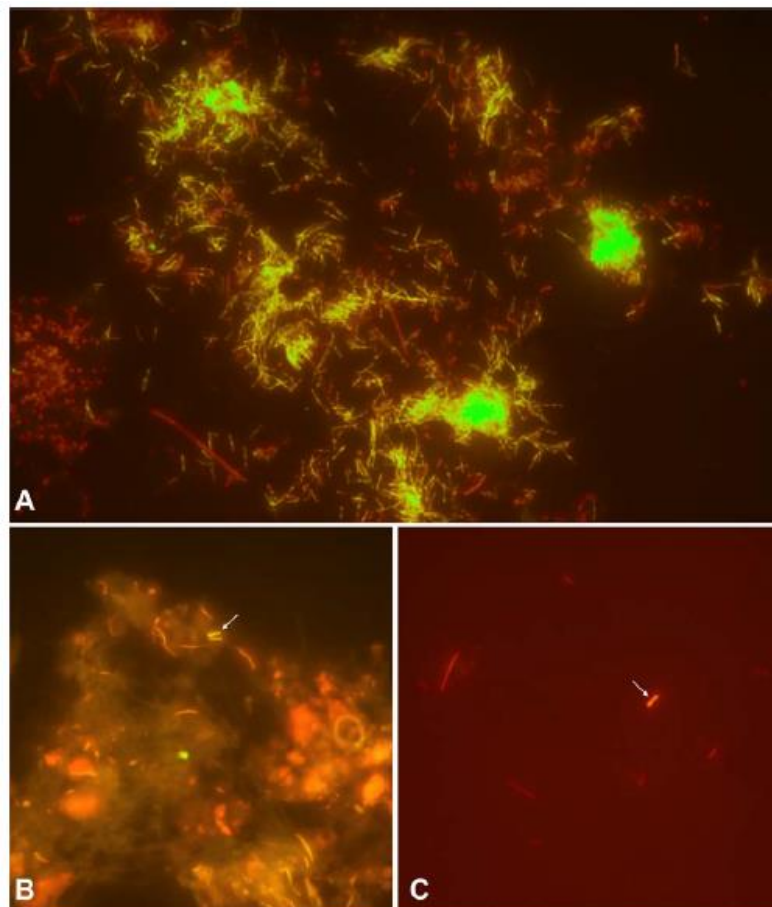
Hybridizační sondy i podmínky, byly převzaty z dřívějších studií zabývajících se analýzou bakterií zubního plaku. Připravené vzorky biofilmů byly přelity 50 ml hybridizačního pufru o teplotě 60 °C. Hybridizace proběhla ve vlhké komůrce při 50 °C po dobu 16-18 hodin. Poté bylo provedeno vymývání nehybridizovaných sond pomocí promývacího roztoku. Promývání probíhalo 15 minut při 50 °C.

Hybridizační signál byl pozorován přes fluorescenční mikroskop.

5.6.4 Výsledky experimentu

Autoři se zabývají složením biofilmu na jednotlivých hlasových protézách. Jedná se o kvalitativní a o kvantitativní výskyt jednotlivých bakterií na zvolených částech hlasových protéz.

Bylo zjištěno, že *Fusobacterium nucleatum* je jediný mikroorganismus, který je schopen vyskytovat se v mikrokoloniích a že se vyskytuje na celém povrchu protézy. Tyto kolonie zde pozorovat na obrázku 10 A. Ostatní kultury se vyskytovaly pouze jako samostatné buňky, kromě *Treponema denticola*, který se nevyskytoval na žádné části hlasové protézy.



Obrázek 10 Výsledky měření pomocí FISH (Bertl *et al.*, 2015)

(EUB338 značené rhodaminem- červené zbarvení; specifické sondy značené FITC- zelený signál ovšem z důvodu dvojitého značení jsou viditelné jako žluto-zelené). A) *Fusobacterium nucleatum*; (buňky jsou označené šipkou) B) *Porphyromonas gingivalis*; C) *Parvimonas micra*

6 Závěr

Prvním zaměřením bakalářské práce bylo teoretické rozpracování podmínek metody FISH. Dále pak některé její základní modifikace. V těchto modifikacích se využívá různých způsobů navázání sond, značení či detekce.

Všeobecně se dá usuzovat, že FISH je metodou vhodnou pro detekci biofilmů. Jedná se o rychlou metodu, kdy je výsledek dostupný v řádu několika hodin, zatímco kultivační metody potřebují i několik dní. Díky své vysoké specifitě sond se jedná o přesnou metodu. Není potřeba extrahovat genetickou informaci či narušovat biofilm. Díky mnohým modifikacím, lze citlivost ještě zvýšit a potlačit šum okolí. Pro laboratoře se jedná o levnou a dostupnou metodu. Jedná se především o epifluorescenční mikroskop s filtry, které odpovídají zvoleným fluorochromům. Při odečítání výsledků lze využít i průtokovou cytometrii.

Jako každá metoda má i svá úskalí, které jsou ovšem řešitelné. Nejčastějším je pravděpodobně obtížné nalezení optimálních hybridizačních podmínek. Samostatné sondy mají jiné hybridizační potřeby než směs více druhů sond. Při výběru sond je důležité vybrat takové sondy, které mají podobné fyzikální vlastnosti např. bod tání. Při velkém rozdílu těchto vlastností je obtížné dosáhnout dostatečné hybridizace. Další nevýhodou FISH je potřeba několika různých sond. Pokud chceme určit přesný druh bakterie je zapotřebí specifické sondy, která se bude vázat na daný druh, či rod. S tímto souvisí fakt, že potřebujete znát alespoň přibližné bakteriální složení biofilmu, pro zvolení správných sond. Pro vybrání vhodných sond existují databáze a programy, kde můžete najít vhodnou sondu a pokud není uvedena lze použít program který vám pomůže tuto sondu navrhnout.

Dá se usuzovat, že FISH bude dále nahrazovat jiné molekulárně biochemické metody a bude se dále rozvíjet. Díky své vysoké citlivosti a univerzálnosti může být použita v široké škále oborů, jak je vidět z uvedených experimentů.

7 Seznam zdrojů

ALMEIDA, C., J. M. SOUSA, R. ROCHA, L. CERQUEIRA, S. FANNING, N. F. AZEVEDO a M. J. VIEIRA. Detection of *Escherichia coli* O157 by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) and comparison to a standard culture method. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, **79**(20), 6293–6300.

AMANN, Rudolf a Bernhard M. FUCHS. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, **6**, 339-349.

ANDORRA, Imma, Margarida MONTEIRO, Braulio ESTEVE-ZARZOSO, Helena ALBERGARIA a Albert MAS. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora*. *Food Microbiology*. 2011, **28**, 1483-1491.

AZEVEDO, Andreia S., Carina ALMEIDA, Bruno PEREIRA, Pedro MADUREIRA, Jesper WENGEL a Nuno F. AZEVEDO. Detection and discrimination of biofilm populations using locked nucleic acid/2'-O-methyl-RNA fluorescence in situ hybridization (LNA/2'OMe-FISH). *Biochemical Engineering Journal*. 2015, **104**, 64-73.

BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar [online]. Heidelberg/Německo: Becton Dickinson, 2013 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9008>

BEHNAM, Faris, Andreas VILCINSKAS, Michael WAGNER a Kilian STOECKERB. A Straightforward DOPE (double labeling of oligonucleotide probes)-FISH (fluorescence in situ hybridization) method for simultaneous multicolor detection of six microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, **78**(15), 5138-5142.

BERTL, Kristina, Vincent ZIJNGE, Beata ZATORSKA, Matthias LEONHARD, Berit SCHNEIDER-STICKLER a Hermie J. M. HARMSSEN. Oral cavity anaerobic pathogens in biofilm formation on voice prostheses. *Journal of the sciences and specialties of the head and neck*. 2015, **37**(4), 524-529.

EILERS, Heike, Jakob PENTHALER, Frank oliver GLOCKNER a Rudolf AMANN. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the north sea. *Applied and environmental mikrobiology*. 2000, **66**(7), 3044–3051.

FONTENETE S., N. Guimaraes, M. Leite, C. Figueiredo, J. Wengel, N. FilipeAzevedo, Hybridization-based detection of *Helicobacter pylori* at human bodytemperature using advanced locked nucleic acid (LNA) probes, *PLOS One*. 2013, **8**(11), 1-11.

HALLING, Kevin C. a Benjamin R. KIPP. Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology. *Human Pathology*. 2007, **38**, 1137–1144.

HOUGAARD, David Michael, Henrik HANSEN a Lars-Inge LARSSON. Non-radioactive in situ hybridization for mRNA with emphasis on the use of oligodeoxynucleotide probes. *Histochem Cell Biol*. 1997, **108**, 335-344.

KOČÁREK, Eduard. Molekulární biologie v medicíně. Brno: *Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů*, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.

KŘÍŽKOVÁ, Věra, Marie KORABEČNÁ, Jitka KOČOVÁ a Zbyněk TONAR. Princip a příklady využití demonstované varianty in situ hybridizace. *Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni*, 2003.

LEVSKY J. M., SINGER R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of cell science*. 2003, **116**(14), 2833-2838.

LOPES, Susana P., Daniel T. CARVALHO, Maria O. PEREIRA a Nuno F. AZEVEDO. Discriminating Typical and Atypical Cystic Fibrosis-Related Bacteria by Multiplex PNA-FISH. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, **114**(2), 355-367.

MACHADO, António, Carina ALMEIDA, Débora SALGUEIRO, et al. Fluorescence in situ hybridization method using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Lactobacillus* and *Gardnerella* spp. *BMC Microbiology*. 2013, **13**(82), 1-12.

MORRISON, Larry E., Ramesh RAMAKRISHNAN, Teresa M. RUFFALO a Kim A. WILBER. Labeling fluorescence in situ hybridization probes for genomic targets. *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*. 2003, **204**, 21-40.

NEUENSCHWANDER, Stefan M, Michaela M SALCHER a Jakob PERNTHALER. Fluorescence in situ hybridization and sequential catalysed reporter deposition (2C-FISH) for the flow cytometric sorting of freshwater ultramicrobacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **6**(247).

PEKAR-ZLOTIN, Marina, Fred R. HIRSCH, Lior SOUSSAN-GUTMAN, et al. Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *The Oncologist*. 2015, **20**(3), 316-322.

PERNTHALER Jakob, Rudolf AMANN a Annelie PERNTHALER. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2002, **68**(6), 3094-3101.

PERNTHALER, Annelie a Rudolf AMANN. Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, **70**(9), 5426-5433.

PERNTHALER, Jakob, Frank O. GLÖCKNER, Wilhelm SCHÖNHUBER a Rudolf AMANN. Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology*. 2001, **30**, 207-210.

PERRY-O'KEEFE, Heather, Susan RIGBY, Kenneth OLIVEIRA, Ditte SØRENSEN, Henrik STENDER, James COULL a J.J. HYLDIG-NIELSEN. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, **47**(3), 281-292.

PRATSCHER, Jennifer, Catrin STICHTERNOOTH, Katrin FICHTL, Karl-Heinz SCHLEIFER a Gesche BRAKER. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (nirK) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, **75**(3), 802-810.

PRICE, C. M.. *Fluorescence In Situ Hybridization*. Blood Reviews. 1993, **7**(2), 127-134.

RAAP, Anton K. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research*. 1998, **400**(1-2), 287-298.

REINHARD, Mark, Jørgen PRAG, Michael KEMP, Keld ANDRESEN, Belinda KLEMMENSEN, Niels HØJLYNG, Susan Hildebrand SØRENSEN a Jens Jørgen CHRISTENSEN. Ten cases of actinobaculum schaalii infection: clinical relevance, bacterial

- identification, and antibiotic susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, **43**(10), 5305-5308.
- RIED, Thomas, LANDES, William DACKOWSKI, Katherine KLINGER a David C. WARD. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the. *Human Molecular Genetics*. 1992, **1**(5), 307-314.
- ROHDE, Alexander, Jens Andre HAMMERL, Bernd APPEL, Ralf DIECKMANN a Sascha Al DAHOUK. FISHing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? *Food Microbiology*. 2015, **46**, 395-407.
- SAHA, Ratul, Robert S. DONOFRIO, Darla M. GOERES a Susan T. BAGLEY. Rapid detection of rRNA group I pseudomonads in contaminated metalworking fluids and biofilm formation by fluorescent in situ hybridization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, **94**, 799-808.
- SEDGWICK P. Pearson's correlation coefficient. *BMJ*. 2012, 345, e4483.
- SEZONOV, Guennadi, Danie`le JOSELEAU-PETIT a Richard D'ARI. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of bacteriology*. 2003, **189**(23), 8746–8749.
- SCHWEICKERT, BIRGITTA, ANNETTE MOTER, MICHAEL LEFMANN a ULF B. GÖBEL. Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2004, **112**(11-12), 856–885.
- SOE M.J., T. Moller, M. Dufva, K. Holmstrom, A sensitive alternative formicroRNA in situ hybridizations using probes of 2'-O-methyl RNA + LNA, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2011, **59**, 661–672.
- VINDEROLA, C.G. a J.A. REINHEIMER. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. *International Dairy Journal*. 1999, **9**, 497-505.
- WAGNER, Michael a Susanne HAIDER. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, **23**, 96-102.

WAGNER, Michael, Alexander LOY, Regina NOGUEIRA, Ulrike PURKHOLD, Natuschka LEE a Holger DAIMS. Microbial community composition and function in wastewater treatment. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002, **81**, 665-680.

ZALATA, A. A., N. LAMMERTIJN, A. CHRISTOPHE a F. H. COMHAIRE. The correlates and alleged biochemical background. *International Journal of Andrology*. 1998, **21**, 284-294.