

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Klára Nemčková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Fluorescenční *in situ* hybridizace pro detekci potravinářských patogenů

Bc. Klára Nemčková

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Nemčková**
Osobní číslo: **C17485**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Fluorescenční hybridizace in situ pro detekci potravinářských patogenů**
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 :

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou zadané téma. V úvodu práce stručně popište metodu FISH, její modifikace a výhody či nevýhody metody.
2. Dále se věnujte hlavně využití této metody pro stanovení jednotlivých potravinářských patogenů a popište konkrétní způsoby jednotlivých stanovení z publikovaných prací.

Experimentální část:

1. Pokuste se zavést metodu FISH pro vybrané potravinářské patogeny.
2. Jednotlivé kroky metody zoptimalizujte.
3. Získané výsledky zhodnoťte, vyvoďte závěry a porovnejte s publikovanými pracemi.
4. Diplomovou 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 diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petra Mořková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Ing. Nikola Roulová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

30. listopadu 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

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 3.5. 2019

.....

Bc. Klára Nemčková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Ing. Petře Mořkové Ph.D. za cenné rady a trpělivost se kterou mi pomáhala při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodinně a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia i když jsem si sama nevěřila.

Anotace:

Tato diplomová práce je zaměřena na metodu FISH a její využití při detekci potravinářských patogenů. V první části se pojednává o základních modifikacích této metody a dále pak o konkrétních postupech využitých při detekci patogenů. Experimentální část poté popisuje zavedení FISH pro detekci *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* spp..

Klíčová slova: FISH, potravinářské patogeny, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.

Title: Fluorescence *in situ* hybridization for detection of food pathogens

Annotation:

This thesis is focused on the FISH method and its using for the detection of food pathogens. The first part deals with the basic modifications of this method and with the specific procedures used in detection of pathogens. The experimental part describes the application of FISH for detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp..

Key words: FISH, food pathogens, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.

OBSAH

ÚVOD	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	17
1.1.1 Historie fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	17
1.1.2 Obecný postup fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	18
1.1.2.1 Fixace a denaturace	18
1.1.2.2 Hybridizace sondy	19
1.1.2.3 Odstranění nespecifických signálů	19
1.1.2.4 Vyhodnocení signálu.....	19
1.1.3 Značení sond a používané fluorofory.....	20
1.1.4 Modifikace fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	21
1.1.4.1 CARD-FISH.....	21
1.1.4.2 DOPE-FISH.....	22
1.1.4.3 CLASI-FISH	23
1.1.4.4 PNA-FISH	23
1.1.4.5 LNA-FISH.....	23
1.1.4.6 RING-FISH	24
1.1.5 Využití metody FISH při detekci potravinářských patogenů.....	25
1.1.5.1 Detekce <i>Campylobacter</i> spp.....	25
1.1.5.2 Detekce <i>Listeria</i> spp.....	27
1.1.5.3 Rozlišení <i>Staphylococcus aureus</i> a koagulasa-negativních stafylokoků...29	
1.1.5.4 Detekce <i>Salmonella</i> spp.	29
1.1.5.5 Detekce <i>Cronobacter</i> spp.....	32
1.1.5.6 Detekce <i>Escherichia coli</i>	33
1.1.6 Pozitiva a negativa fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	35

1.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	36
1.2.1	Výskyt a přenos na člověka.....	37
1.2.2	Biochemické vlastnosti a morfologie.....	37
1.2.3	Možnosti identifikace.....	38
1.3	Rod <i>Salmonella</i>	40
1.3.1	Taxonomie.....	40
1.3.2	Výskyt a přenos na člověka.....	41
1.3.3	Biochemické vlastnosti a morfologie.....	41
1.3.4	Možnosti identifikace.....	42
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	45
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1	Použité chemikálie, přístroje, pomůcky, živná média a pracovní roztoky	46
3.1.1	Chemikálie	46
3.1.2	Přístroje	46
3.1.3	Pomůcky.....	47
3.1.4	Živná média a pracovní roztoky.....	47
3.2	Použité mikrobiální kmeny.....	53
3.3	Zavedení FISH pro detekci <i>Listeria monocytogenes</i>	54
3.3.1	Vlastní postup.....	54
3.3.2	Optimalizované kroky.....	55
3.4	Zavedení PNA-FISH pro detekci rodu <i>Salmonella</i>	55
3.4.1	Vlastní postup.....	55
3.4.2	Optimalizované kroky.....	56
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
4.1	Zavedení FISH pro detekci <i>Listeria monocytogenes</i>	57
4.1.1	Denzita buněk.....	57
4.1.2	Volba fixačního roztoku a doby fixace	58

4.1.3	Způsob permeabilizace buněčné membrány	61
4.1.4	Volba vhodného hybridizačního pufru.....	62
4.1.5	Koncentrace sondy	63
4.1.6	Doba a teplota hybridizace.....	63
4.1.7	Doba promývání.....	65
4.1.8	Specifičnost sondy RL-2	66
4.1.9	Detekce <i>Listeria monocytogenes</i> ve směsi bakterií	67
4.2	Zavedení PNA-FISH pro detekci rodu <i>Salmonella</i>	70
4.2.1	Volba fixačního roztoku a doby fixace	70
4.2.2	Způsob permeabilizace buněčné membrány	71
4.2.3	Doba a teplota hybridizace.....	72
4.2.4	Koncentrace sondy	73
5	ZÁVĚR	75
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
7	PŘÍLOHY	83

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Hybridizované buňky <i>Poribacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> a <i>Archaea</i>	22
Obrázek 2 Struktura LNA, RNA a DNA.....	24
Obrázek 3 Schématické znázornění RING-FISH.....	25
Obrázek 4 Buňky <i>Listeria monocytogenes</i> po hybridizaci se sondou LmPNA1253	28
Obrázek 5 Buňky <i>Escherichia coli</i> hybridizované za použití sondy Colinsitu a pomocných oligonukleotidů	35
Obrázek 6 Schéma stanovení <i>Listeria monocytogenes</i> dle ISO 11290:2017	38
Obrázek 7 Schéma stanovení <i>Salmonella</i> spp. dle ISO 6579:2017.....	43
Obrázek 8 Rozdíly v počtu buněk <i>Listeria monocytogenes</i> a <i>Staphylococcus aureus</i> při použití stejné počáteční denzity 10^8 CFU/ml.....	58
Obrázek 9 Nespecifická hybridizace buněk <i>Escherichia coli</i> se sondou RL-2 po fixaci 2% formaldehydem při 4 °C 24 hodin, hybridizace při 45 °C 4 hodiny	59
Obrázek 10 Hybridizace buněk <i>Listeria monocytogenes</i> se sondou RL-2 po fixaci ve 4% paraformaldehydu při laboratorní teplotě 1 hodinu a permeabilizaci lysozymem 45 minut při laboratorní teplotě, hybridizace při 45 °C 4 hodiny	60
Obrázek 11 Hybridizace buněk <i>Listeria monocytogenes</i> se sondou RL-2, hybridizace při 43 °C 4 hodiny	64
Obrázek 12 Hybridizace směsi <i>Listeria monocytogenes</i> a <i>Listeria welshimeri</i> se sondou RL-2 v poměru 2:1, hybridizace při 45 °C 4 hodiny.....	69
Obrázek 13 Hybridizované buňky <i>Salmonella</i> Typhimurium se sondou SalPNA1873 po fixaci ve 4% paraformaldehydu a po permeabilizaci lysozymem, hybridizace při 57 °C 30 minut...71	

Tabulka 1 Fluorofory používané při FISH pro detekci mikroorganismů.....	21
Tabulka 2 Biochemické vlastnosti <i>Listeria monocytogenes</i>	37
Tabulka 3 Přehled druhů a poddruhů rodu <i>Salmonella</i>	40
Tabulka 4 Biochemické vlastnosti <i>Salmonella</i> spp.	41
Tabulka 5 Optimalizované kroky při detekci <i>Listeria monocytogenes</i>	55
Tabulka 6 Optimalizované kroky při detekci <i>Salmonella</i> spp.....	56
Tabulka 7 Teploty a doba hybridizace sondy RL-2 použité pro optimalizaci metody	64
Tabulka 8 Specifičnost sondy RL-2 s použitými mikrobiálními kmeny.....	66
Tabulka 9 Referenční bakteriální kmeny použité v práci Oliveira <i>et al.</i> (2003).....	67
Tabulka 10 Směsi bakterií s <i>Listeria monocytogenes</i> 1- hybridizace provedena při 45 °C 4 hodiny	68
Tabulka 11 Směsi bakterií s <i>Listeria monocytogenes</i> 2- hybridizace provedena při 43 °C 4 hodiny	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALOA agar	agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho
ATCC	Americké sbírky mikroorganismů (American Type Culture Collection)
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
CAMP test	Christie, Atkins, Munch–Petersen test
CARD-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace pomocí sondy značené enzymem křenové peroxidázy (Catalized Reported Deposition-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)
CASO bujon	bujon z kaseinového a sojového peptonu
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)
CFU	kolonie tvořící jednotka (Colony Forming Unit)
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
DAPI	4', 6 – diamido-2-fenylindol
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)

DVC test	test životaschopnosti buněk (Direct Viable Count test)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	imunoanalýza na pevném sorbentu s enzymatickým značením (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
HP	hybridizační pufr
HRP	křenová peroxidáza (Horseradish Peroxidase)
ISH	<i>in situ</i> hybridizace
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. seeligeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>
<i>L. welshimeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
LNA	uzavřená nukleová kyselina (Locked Nucleic Acid)
LNA-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace využívající uzavřené nukleové kyseliny
MALDI-TOF MS	metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization Time – of – Flight Mass Spectrometry)
MKTTn	Müller-Kauffmann tetrathionatový bujon s novobiocinem
mRNA	mediátorová RNA
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

MS	hmotnostní spektrometrie
MSRV	modifikovaná polotuhá půda podle Rappaport Vassiliadis
MSSA	methicilin senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
NK	negativní kontrola
PBS	fosfátový pufr
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFA	paraformaldehyd
PNA	peptidová nukleová kyselina
PNA-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace využívající peptidové nukleové kyseliny
PP	promývací pufr
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
RING-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s využitím mnohonásobně značených polyribonukleotidových sond (Recognition of Individual Genes-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridizace)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real Time PCR)
RVS	Rappaport Vassiliadis soja medium
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> Paratyphi

S. Typhi	<i>Salmonella</i> Typhi
S. Typhimurium	<i>Salmonella</i> Typhimurium
SDS	dodecylsulfát sodný
SPC	cytometrie v pevné fázi (Solid Phase Cytometry)
ssRNA/ssDNA	jednovláknová RNA/jednovláknová DNA (single-stranded)
TAMRA	5-karboxytetramethylrhodamin
tmRNA	RNA se znaky mediátorové i transferové RNA
TRITC	tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát
TSA	zesílení signálu tyraminem (Tyramide Signal Amplification)

ÚVOD

Patogenní mikroorganismy se vyskytují v celém spektru potravin a mohou způsobovat závažná onemocnění, která ve svém nejhorším případě vedou až ke smrti. Z tohoto důvodu je třeba jejich včasná identifikace nejen u pacienta, ale i určení zdroje nákazy, aby bylo možno zamezit dalšímu šíření. Nejběžnějším způsobem detekce bakterií jsou především standardizované klasické kultivační metody, které jsou ovšem časově náročné. Tato časová prodleva může vést k rozšíření infekce. Dalším úskalím může být nekultivovatelnost bakterií kvůli jejich vysokým nárokům či pro vliv potravinové matrice. Řešením těchto problémů je využití rychlých diagnostických metod. Jedná se především o polymerázovou řetězovou reakci, imunochemické metody či fluorescenční *in situ* hybridizaci.

Fluorescenční *in situ* hybridizace je specifická molekulárně diagnostická metoda využívající fluorescenčně značené sondy, které se hybridizují na cílovou genetickou informaci. Je schopna detekovat bakterie a poskytnou výsledky v řádu hodin. Proto se tato práce zaměřuje na zavedení a optimalizaci fluorescenční *in situ* hybridizace pro detekci *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* spp. pro jejich významnost coby potravinářských patogenních mikroorganismů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je metodou molekulární biologie která je založena na navázání fluoroforem značené sondy na vybraný genetický materiál buňky. Může sloužit k vizualizaci specifických úseků DNA, celých chromozomů, či k identifikaci mikroorganismů. Jedná se o rychlou metodu, která je schopna hybridizovat buňku bez poškození její morfologie (Dias *et al.*, 2018; Křížková *et al.*, 2003; Moter and Göbel, 2000).

Pro mikrobiologické účely je výhodou metody schopnost identifikovat mikroorganismy, které jsou náročné na kultivaci. Dalším kladem je, že sondy mohou být značeny fluorofory o různé emisní vlnové délce, což přináší možnosti k simultánní detekci několika mikroorganismů v jednom kroku (Dias *et al.*, 2018; Moter and Göbel, 2000; Schweicker *et al.*, 2004).

1.1.1 Historie fluorescenční *in situ* hybridizace

Začátky *in situ* hybridizace (ISH) se datují k roku 1960, kdy byly vyvinuty sondy značené radioizotopy. Zpočátku byly sondy využívány k vizualizaci DNA v cytologii (Gall and Pardue, 1969). Toto značení v sobě nese mnoho nedostatků. Jedním z těchto úskalí je postupný rozpad radionuklidů což způsobuje nestabilitu specifity sondy a je také potřeba se sondami zacházet dle přísných bezpečnostních podmínek (Levsky and Singer, 2003). Dalším problémem je dlouhá doba expozice a potřeba dalších vizualizačních kroků, které prodlužují dobu analýzy (Dias *et al.*, 2018; Moter and Göbel, 2000).

Velkým pokrokem ve FISH analýze byl rozvoj fluoroforem nebo fluorochromem značených sond, které vyvinuli Bauman *et al.* (1980). V této studii byla RNA značena na 3'konci fluoroforem nebo fluorochromem a byla použita pro detekci specifického úseku DNA. Toto značení pomocí fluoroforů nebo fluorochromů otevřelo možnosti pro bezpečné a snadné použití *in situ* hybridizace (Levsky and Singer, 2003).

Pokrok při vývoji FISH také přineslo zavedení přímého značení sondy. Dříve byly sondy značeny nepřímě, což mělo vliv na jejich specifitu a sílu signálu (Levsky and Singer, 2003). Postupem času byly zavedeny další modifikace, které přinášely zlepšení signálu jednotlivých

sond, například pro mikroorganismy s nízkým počtem ribosomů, nebo umožnily zkrácení doby analýzy (Raap, 1998; Wagner and Haider, 2012).

1.1.2 Obecný postup fluorescenční *in situ* hybridizace

Cílová místa fluorescenční *in situ* hybridizace se liší na základě účelu použití metody např. pro identifikaci chromozomálních poruch se hybridizace provádí na specifické DNA sekvence. Tyto signály by ovšem byly pro mikrobiologické použití nedostačující. Z tohoto důvodu se pro prokaryotické buňky využívá hybridizace na ribosomální RNA. Cílová sekvence bývá nejčastěji na 16S rRNA. V některých případech lze jako cílové místo použít 23S rRNA, 18S RNA a v poslední době i tmRNA a mRNA. Tyto sekvence bývají velice variabilní díky čemuž můžeme nalézt úsek pro rozlišení příbuzných druhů nebo pro identifikaci celé domény (Levsky and Singer, 2003; Moter and Göbel, 2000; Pernthaler *et al.* 2001; Rohde *et al.*, 2015).

Fluorescenční *in situ* hybridizace používá fluoroforem značené sondy, které specificky hybridizují ke komplementárnímu úseku genetického materiálu v buňce. Obecné kroky společné pro všechny modifikace jsou následující: fixace a denaturace buněk, hybridizace sondy, odstranění nespecifických signálů a detekce s vyhodnocením signálu.

1.1.2.1 Fixace a denaturace

Fixace je jedním ze stěžejních kroků FISH. Slouží ke zlepšení permeabilizace buněčné membrány pro lepší průnik sondy, zároveň musí chránit RNA před degradačními procesy RNÁz. Fixaci lze provést teplem nebo pomocí fixačních roztoků. Jako fixační činidla se používají buď srážecí látky jako je ethanol a methanol, nebo zesilující látky jako formaldehyd. Tyto fixační roztoky musí být následně vymyty pro správné provedení hybridizace. Optimalizace fixačních postupů je značně složitá, protože závisí na druhu organismu a matrice. Příkladem rozdílnosti nároků na fixaci lze uvést postup pro grampozitivní a gramnegativní mikroorganismy. Pro gramnegativní bakterie je dostačující fixace 2-4% (V/V) paraformaldehydem či formaldehydem. Tento roztok ovšem nemusí být pro grampozitivní mikroorganismy dostačující, neboť ve své buněčné stěně obsahují více peptidoglykanu. Proto se pro jejich fixaci využívá 50% (V/V) ethanol, enzymy, rozpouštědla nebo lze využít zvýšené teploty. Dalším řešením problematiky fixace grampozitivních mikroorganismů může být použití peptidových nukleových kyselin coby sond (PNA sond) (Moter and Göbel, 2000; Rocha *et al.*, 2018; Schwecket *et al.*, 2004; Šilhová, 2016).

1.1.2.2 Hybridizace sondy

Hybridizace je krok, při kterém se sonda specificky naváže na komplementární úsek rRNA uvnitř buňky. Může probíhat v suspenzi nebo na sklíčku s epoxidovou maskou v závislosti na účelu FISH, druhu sondy nebo matrice. Základem je hybridizační pufr s obsahem značených sond, kterým se překrývá vzorek, v případě použití sklíčka, nebo se vzorek suspenduje v hybridizačním pufru se sondami. Pro každý pokus se provádí negativní kontrola, kterou se zjišťuje autofluorescence vzorku. Rozpětí teplot při hybridizaci bývá od 37 °C až po 60 °C. Variabilita hybridizace je dána i délkou doby hybridizace, kdy se doba pohybuje od 30 minut až po několik hodin. Veškeré tyto hybridizační postupy se provádí v tmavé vlhkostní komůrce (Almeida *et al.*, 2010; Moter and Göbel, 2000; Price, 1993).

1.1.2.3 Odstranění nespecifických signálů

Nespecificky navázané sondy či nenavázané sondy, které se ve vzorku po hybridizaci vyskytují, by při vizualizaci poskytovaly falešně pozitivní signál. Z tohoto důvodu se provádí promývání promývacím pufrům. Vhodný promývací pufr či doba promývání jsou schopny snížit šum okolí a zlepšit kontrast signálu (Levsky and Singer, 2003; Moter and Göbel, 2000).

1.1.2.4 Vyhodnocení signálu

Při vyhodnocení signálu může být využito různých detekčních technik. Pravděpodobně nejčastěji používanou je epifluorescenční mikroskopie. Epifluorescenční mikroskop je běžný optický mikroskop opatřený vhodnými úzkopásmovými filtry. První propouští pouze světlo vhodné excitační vlnové délky pro určenou sondu. Druhý filtr propouští emisní záření produkované fluorescenčním barvivem. Mikroskop je opatřen kamerou, která umožňuje digitalizaci obrazu a následně možnost manipulace s tímto obrazem. To je výhodné při snímání vzorků, u kterých se dá očekávat nízká intenzita signálu. Tento systém je vhodný jak pro studium morfologie buňky, tak i ke kvantifikaci mikroorganismů (Alberts *et al.*, 1998; Moter and Göbel, 2000).

Dalším detekčním systémem může být průtoková cytometrie. Její kombinace s FISH byla použita již na počátku devadesátých let 20. století. Hlavní výhodou tohoto systému je možnost automatizace a schopnost analyzovat velké objemy kapalných vzorků bez lidského zásahu. Poskytuje především informace o počtu buněk a o intenzitě fluorescence. Nevýhodou ovšem

zůstávají vyšší náklady oproti klasickému fluorescenčnímu mikroskopu (Moter and Göbel, 2000; Rohde *et al.*, 2015).

Modifikací fluorescenčního mikroskopu je využití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM). V tomto uspořádání je zdroj světla mikroskopu nahrazen laserem. Tento laserový mikroskop je schopen vytvořit trojrozměrný obraz objektu, ale pro vytvoření obrazu potřebuje vyšší intenzitu signálu (Lo Piccolo, 2010; Moter and Göbel, 2000).

1.1.3 Značení sond a používané fluorofory

Při značení sond se rozlišují dva základní druhy, přímé a nepřímé.

Přímé značení je nejrychlejší a nejlevnější variantou, protože nevyžaduje žádné další detekční kroky. Fluorofor je navázán přímo na 5'konec oligonukleotidové sondy. Případně může být navázán i na 3'konec pro zvýšení intenzity signálu. Značení může být prováděno, kromě fluoroforů, také radionuklidy či enzymy. Nejčastěji používanými barvivy jsou deriváty fluoresceinu (např. fluorescein isothiokyanát- FITC), deriváty rhodaminu (texaská červeň) a cyaninová barviva (Cy3, Cy5). Tato a další používaná barviva uvádí **Tabulka 1** (Moter and Göbel, 2000).

Při nepřímém značení je na sondě navázán biotin či haptén. Tato sonda hybridizuje s cílovou sekvencí a poté je směs inkubována s protilátkou značenou fluoroforem. I zde se používají barviva jako Cy3 či FITC nebo může být použit enzym. Příkladem enzymatického značení je zesílení signálu tyramidem (TSA), které využívá pro značení sondy křenovou peroxidázu (HRP). Výhodou nepřímého značení může být schopnost poskytnout silnější signál (Moter and Göbel, 2000).

Tabulka 1 Fluorofory používané při FISH pro detekci mikroorganismů (upraveno podle Moter and Göbel, 2000)

Fluorochrom	Vlnová délka		Barva fluorescence
	Excitační (nm)	Emisní (nm)	
7-amino-4-methylkumarin-3-octová kyselina (AMCA)	651	450	Modrá
Fluorescein-isothiokyanát (FITC)	492	528	Zelená
5-(-6-)karboxyfluorescein-N-hydroxysukcid-ester (FluoX™)	488	520	Zelená
Tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát (TRITC)	557	576	Červená
Texaská červen	578	600	Červená
Cy3	550	570	Oranžová/červená
Cy5	651	674	infračervená

1.1.4 Modifikace fluorescenční *in situ* hybridizace

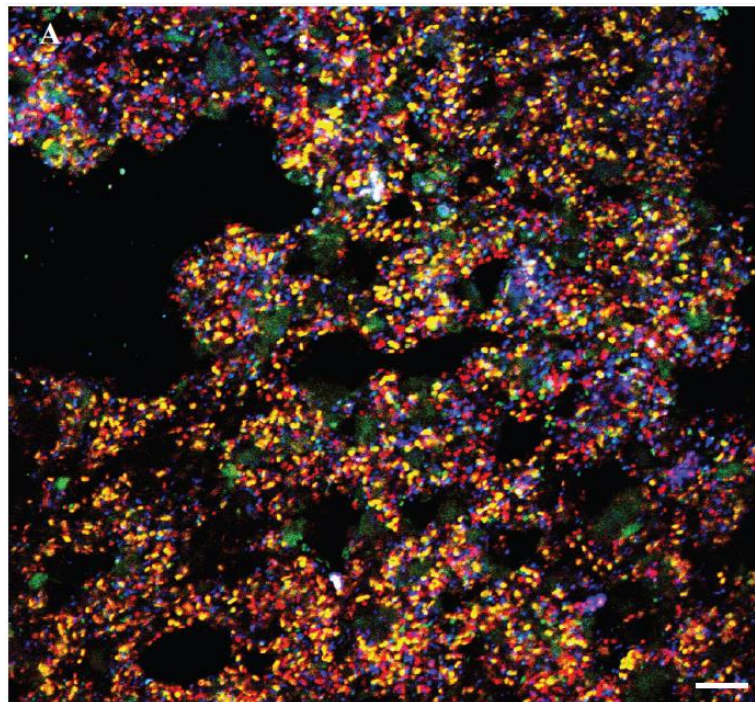
Na rozdíl od kultivačních metod, metoda FISH poskytuje přesné výsledky během krátké doby. Avšak i přes tyto specifické a rychlé výsledky je základní metoda a její protokol omezen mnoha úskalími. Problémem může být vysoký poměr šumu vůči signálu, či nedostatečné množství fluoroforů o různé emisní vlnové délce. Pro odstranění těchto nedostatků bývá FISH často modifikována díky čemuž lze dosáhnout lepších výsledků a zvýšit počet mikroorganismů detekovatelných v jednom kroku. Některé z těchto modifikací jsou uvedeny níže.

1.1.4.1 CARD-FISH

Tato modifikace využívá zesílení signálu tyraminem (Tyramide Amplification: TSA), kdy je sonda označena křenovou peroxidázou (Catalyzed Reported Deposition-Fluorescence *in situ* Hybridization: CARD-FISH). V prvním kroku je na rRNA hybridizována sonda s navázanou molekulou křenové peroxidázy. Druhým krokem se na HRP naváže tyramin značený fluoroforem. Díky tomuto postupu může být navázáno větší množství značených molekul, čímž dojde k výraznému zvýšení citlivosti (Moter and Göbel, 2000; Pernthaler *et al.*, 2002; Wagner and Haider, 2012). CARD-FISH může být dále spojena s dalšími technikami či způsoby barvení, jako dvojité značená sonda (DOPE-FISH), mikroautoradiografie nebo Ramanova mikrospektrometrie (Wagner and Haider, 2012). Tato technika je používána při studiu genové exprese, v diagnostice mikrobiálních infekcí a v prenatální či nádorové diagnostice (Pernthaler *et al.*, 2002).

1.1.4.2 DOPE-FISH

V této technice se při fluorescenční *in situ* hybridizaci využívají dvojitě značené sondy (Double Labeling of Oligonucleotide Probes-Fluorescence *in situ* Hybridization: DOPE-FISH). Při této metodě jsou na sondu navázány dva fluorofory na 5' i 3' konci. Díky tomu lze snadno zvýšit signál sond za zachování původních hybridizačních podmínek. Použité fluorofory mohou mít stejné emisní vlnové délky, nebo mohou být odlišné. V případě použití fluorochromů o rozdílné emisní vlnové délce poskytují smíšený signál, který umožňuje vyšší počet detekovatelných populací, neboť při klasickém značení je obtížné detekovat ve směsi více než tři rody. Příkladem využití DOPE-FISH může být práce kolektivu autorů Behnam *et al.* (2012). V tomto výzkumu autoři využili kombinaci tří fluoroforů (Cy3, Cy5 a Fluor) pro značení šesti mikrobiálních kultur. (Behnam, 2012; Wagner and Haider, 2012). Výsledky ukazuje **Obrázek 1**. Na obrázku jsou uvedeny pouze tři kmeny pro lepší přehlednost. Dalšími kmeny použitými v práci byly *Nitrospira*, *Chloroflexi* a *Deltaproteobacteria*.



Obrázek 1 Hybridizované buňky *Poribacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Archaea* v zorném poli epifluorescenčního mikroskopu; celkové zvětšení 400x (upraveno dle Behnam *et al.*, 2012)

Poribacteria (žlutá- sonda Por1130), *Gammaproteobacteria* (červená- sonda Gam42a), *Archaea* (modrá- sonda Arch915), velké zelené plochy jsou autofluorescence

1.1.4.3 CLASI-FISH

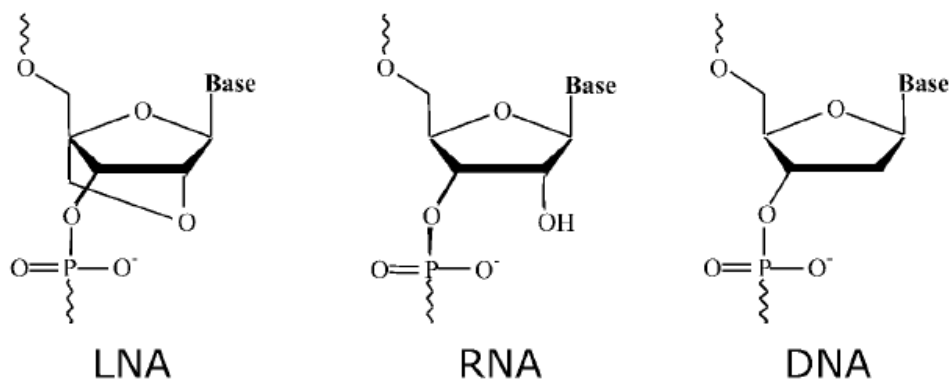
Kompetitivní modifikací fluorescenční *in situ* hybridizace je kombinatorické značení se spektrálním zobrazením (Combinatorial Labeling and Spectral Paging-Fluorescence *in situ* Hybridization: CLASI-FISH). V tomto případě se využívají sondy o stejné genové sekvenci, které jsou značeny různými fluorofory. Tyto sondy v následném hybridizačním kroku soutěží o vazebné místo. Při využití deseti fluoroforů jsme schopni při binární kompetici zaznamenat 45 kombinací a při ternární dokonce 120. Po hybridizaci je vzorek analyzován fluorescenčním mikroskopem, který oddělí fluorescence jednotlivých fluoroforů. Kompetice sond ovšem způsobuje rozdělení intenzity signálu mezi jednotlivé sondy (Wagner and Haider, 2012).

1.1.4.4 PNA-FISH

Jednou z nejnovějších modifikací FISH je využití sond tvořených peptidovými nukleovými kyselinami (PNA-FISH). Tyto molekuly napodobují DNA a místo záporné cukr-fosfátové páteře mají neutrální N-(2-aminoethyl) glycin. Jejich neutrální povaha jim dává lepší afinitu k cílovému místu a jsou robustnější a rychlejší (Almeida *et al.*, 2013). Pro svou rychlou afinitu mohou být PNA sondy oproti klasickým zkráceny a hybridizace může probíhat za vyšších teplot a nižších koncentrací solí. Jejich další výhodou je schopnost hybridizovat s buňkami, které nejsou běžnými DNA sondami detekovatelné a vyšší specifita (Dias *et al.*, 2018; Perry-O'Keefe *et al.* 2001). Využití PNA sond je nanejvýše výhodné při hybridizaci gram pozitivních bakterií. Při použití klasických DNA sond je nutné do protokolu zařadit, před samotnou hybridizací, enzymatické natrávení buněčné membrány pro její permeabilizaci. Tento krok je ovšem možno vynechat při využití PNA sond, které mají lepší afinitu a jsou kratší, díky čemuž pronikají snadněji k cílovému místu (Perry-O'Keefe *et al.* 2001).

1.1.4.5 LNA-FISH

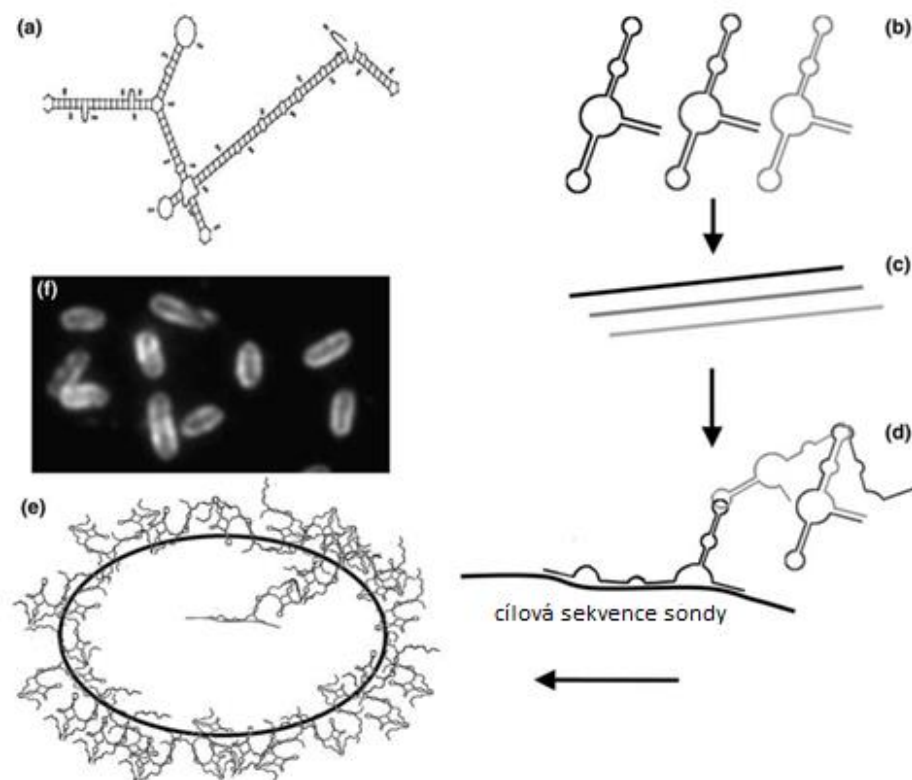
V této modifikaci se využívají deriváty uzavřených nukleových kyselin (Locked Nucleic Acids Fluorescence *in situ* Hybridization: LNA-FISH). Jedná se o analogy RNA, ve kterých je ribóza uzamčena methylenovou vazbou mezi 2' kyslíkem a 4' uhlíkem. Rozdíly mezi strukturou LNA s vazbou O2'-C4' a RNA či DNA ukazuje **Obrázek 2** (Dias *et al.*, 2018). LNA jsou využívány i v oblastech mimo FISH například při genotypizaci alipoproteinů (Silahtaroglu *et al.*, 2004).



Obrázek 2 Struktura LNA, RNA a DNA (Silahtaroglu *et al.*, 2004)

1.1.4.6 RING-FISH

Dalším způsobem zvýšení citlivosti detekce je využití vysoké koncentrace polynukleotidových sond (Recognition of Individual Genes-Fluorescence *in situ* Hybridization: RING-FISH). Tyto sondy jsou tvořeny až několika stovkami bazí a jsou mnohonásobně značené buď fluorofory či biotinem nebo digoxigeninem. Jsou tvořeny především ssRNA či dsDNA. Sondy jsou schopny tvořit sekundární větvené, intra i extra celulární struktury. Extracelulární struktury nakonec vytváří zesílení okolo buňky (viz **Obrázek 3**). Výsledný obraz se projevuje charakteristickým halo-efektem (Dias *et al.*, 2018; Zwirgmaier, 2005). RING-FISH je vhodná především pro určení skupiny mikroorganismů. Dále jsou nanejvýš vhodné ke značení nukleových kyselin o nízkém počtu kopií, nebo k detekci plasmidů či chromosomů (Zwirgmaier, 2005).



Obrázek 3 Schématické znázornění RING-FISH (upraveno podle Zwirgmaier, 2005)

(a) Sekundární struktura polynukleotidové sondy, (b) schématické znázornění sekundární struktury, (c) denaturace sond vede k jejich linearizaci, (d) během hybridizace dochází k intra a extracelulární renaturalizaci sond a jejich zesíťení. Tato síť je zakotvena na cílové místo uvnitř buňky, (e) kvůli omezené permeabilitě buňky je síť sond umístěna hlavně extracelulárně. To vede k vytvoření halo-efektu. Specifičnost sond je dána intracelulární kotvou, (f) epifluorescenční mikroskop RING-FISH

1.1.5 Využití metody FISH při detekci potravinářských patogenů

1.1.5.1 Detekce *Campylobacter* spp.

Ve své práci se Pitkänen (2013) zabýval detekcí *Campylobacter* spp. ve vodách. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Campylobacter lari* (*C. lari*) a *Campylobacter coli* (*C. coli*) jsou častým původcem gastroenteritidy. Onemocnění způsobené tímto rodem má celosvětově stoupající trend (Kaakoush *et al.*, 2015). Běžně se vyskytují ve střevním traktu teplokrevných zvířat, především ptáků. Vehikulum infekce je nejčastěji drůbež, maso nebo kontaminovaná voda (Lehtola *et al.*, 2005; Pitkänen, 2013). Konvenčním způsobem detekce zástupců rodu

Campylobacter jsou kultivační metody s následnou konfirmací pomocí biochemických testů (Lehtola *et al.*, 2005).

Ve své studii se Pitkänen (2013) zaměřil na detekci *Campylobacter* spp. ve vodách pomocí klasických kultivačních metod, PCR a FISH. FISH protokol autoři převzali ze studie Lehtola *et al.* (2005). Zde byla použita PNA sonda pro své lepší vlastnosti oproti DNA sondám. Jednotlivé druhy rodu *Campylobacter* jsou v oblasti 16S RNA velice podobné a proto je obtížné naleznout specifický úsek. Díky možnosti použití kratší PNA sondy, která je o velikosti 15 bází, bylo možné jednotlivé druhy detekovat. PNA sonda byla značena na 5'konci 5-karboxytetramethylrhodaminem (TAMRA) (Lehtola *et al.*, 2005).

Ze 24 hodinové bakteriální kultury byla vytvořena suspenze v PBS. Tato směs byla aplikována na sklíčko a ponechána uschnout při laboratorní teplotě. Ušchlé sklíčko bylo fixováno plamenem a následně dehydratováno a fixováno 90% ethanolem (V/V) podobu 10 minut. Po oschnutí na vzduchu byla do jamek pipetována směs hybridizačního pufru a sondy s koncentrací sondy 200 nM. Hybridizace probíhala 90 minut při teplotě 50 °C. Po hybridizaci bylo provedeno promývání v předehřátém promývacím pufru při 50 °C 30 minut. Následovalo promytí sterilní destilovanou vodou a po oschnutí v temnu při laboratorní teplotě bylo sklíčko pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem (Lehtola *et al.*, 2005).

Dalším krokem bylo provedení FISH ve vzorcích vody. V tomto případě bylo 100 ml vody filtrováno přes černou membránu s velikostí porů 0,2 µm. Po filtraci byly buňky na membráně fixovány a hybridizovány jak je uvedeno výše. Po promytí hybridizačního pufru byla membrána přenesena na podložní sklo zakapána nefluoreskujícím imersním olejem a pozorována pod fluorescenčním mikroskopem (Lehtola *et al.*, 2005).

Výsledky v práci Pitkänen (2013) ukázaly, že kultivační plotnové metody podhodnocují výsledky v porovnání s výsledky FISH. FISH je dále schopna detekovat buňky, které by byly běžnými plotnovými metodami nekultivovatelné a výsledky poskytuje výrazně dříve (Lehtola *et al.*, 2005; Pitkänen 2013).

1.1.5.2 Detekce *Listeria* spp.

Ve studii Fuchizawa *et al.* (2008) se tým autorů zaměřil na detekci rodu *Listeria* spp.. Tento rod je původcem závažných onemocnění. Jediným zástupcem *Listeria* spp. patogenním pro člověka je *Listeria monocytogenes*. Jedná se o velmi odolnou bakterii, která je schopna množit se při chladničkových teplotách a přežít mražení, stejně tak i nízké hodnoty pH a vysoké koncentrace solí. Rizikovými skupinami jsou lidé s oslabenou imunitou, těhotné ženy, děti a starší osoby. Infekce se mohou projevovat od střevních problémů až po závažné infekce nervového systému (Välimaa *et al.*, 2015).

V práci Fuchizawa *et al.* (2008) byla navržena sonda specifická pro rod *Listeria* spp. která je cílena na 23S RNA, je značena TAMRA a je schopna rozlišit pouze živé buňky. Tento fakt je významný pro využití v potravinářství. V této práci byla suspenze buněk fixována 99,5% ethanolem po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byly buňky promyty sterilní destilovanou vodou a znovu suspendovány ve sterilní destilované vodě. Z této suspenze bylo aplikováno 10 µl do jamek na sklíčko a necháno zaschnout. Buňky byly překryty směsí hybridizačního pufru a sondy, takto byly hybridizovány ve tmě ve vlhkostní komůrce při 46 °C 30 minut. Po hybridizaci byly na 15 minut vloženy do předehřátého promývacího pufru. Následně byl promývací pufr opláchnut sterilní destilovanou vodou a sklíčka se nechala oschnout při laboratorní teplotě (Fuchizawa *et al.*, 2008).

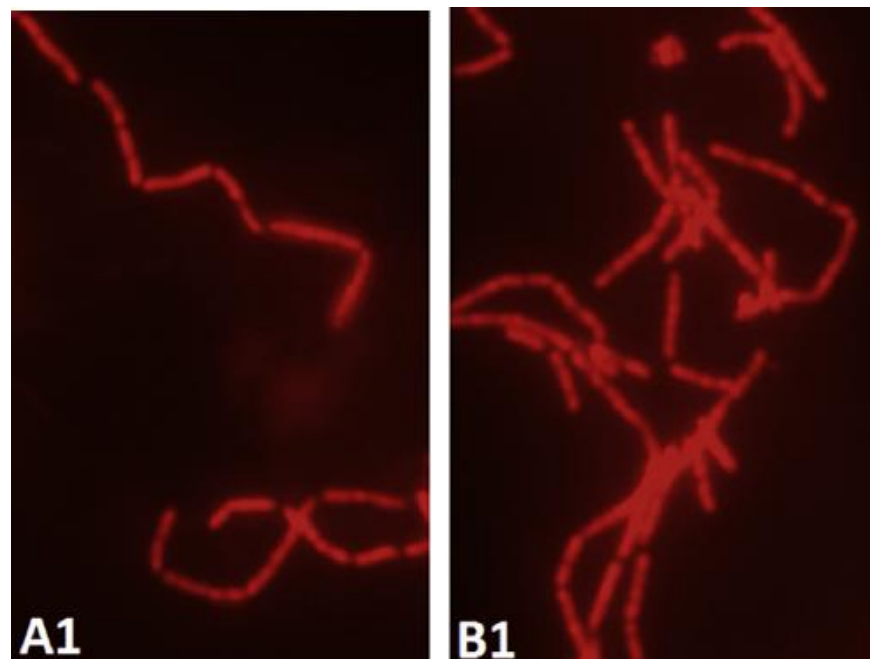
Pro zjištění specifity sondy byly použity různé mikrobiální kmeny, jak grampozitivní, tak gramnegativní. Díky tomu byly získány reprezentativní výsledky, které dokazují specifčnost sondy. Problémem při optimalizaci byla koncentrace formamidu v hybridizačním pufru. Pokud koncentrace formamidu přesáhla 35 %, nedošlo k navázání sondy na buňky *Listeria grayi*. Autoři v závěru uvádějí jiné sondy schopné detekce *Listeria* spp., ale zároveň uvádí, že tyto sondy mohou detekovat i mrtvé buňky (Fuchizawa *et al.*, 2008).

Dalším týmem, který se zaměřil na detekci *L. monocytogenes*, byl Rocha *et al.* (2019). Autoři využili PNA-FISH. Pro specifitější hybridizaci byla použita blokační sonda, která zabraňuje vazbě specifické sondy na nespecifické bakterie s podobnou cílovou sekvencí. Tato blokovácí sonda je použita společně se specifickou sondou v hybridizačním pufru, ale není značena fluoroforem. Blokovácí sonda byla zvolena především pro vyloučení křížové hybridizace s jinými druhy z rodu *Listeria*, zejména pak *L. innocua* (Rocha *et al.*, 2019).

Hybridizační postup byl následující. Buňky byly nanášeny na sklíčko a po zaschnutí bylo sklíčko postupně ponořeno do 4% paraformaldehydu a 50% ethanolu, vždy na 10 minut. Po

vyjmutí a oschnutí, byly jamky převrstveny 20 μ l hybridizačního pufru, s obsahem specifické sondy 200 nM a blokovací sondy 400 nM, a překryty krycím sklem. Hybridizace probíhala ve vlhkostní komůrce 60 minut při 60 °C. Poté bylo odstraněno krycí sklíčko a podložní sklíčko bylo ponořeno do promývacího pufru vytemperovaného na 60 °C a promýváno 30 minut při 60 °C. Po vyjmutí bylo ponecháno oschnout na vzduchu. Pro lepší vizualizaci byly buňky dále obarveny DAPI. Jamky byly zakapány 20 μ l DAPI (0,1 mg/ml) inkubovány 10 minut v temnu. Poté byla sklíčka opláchnuta a osušena v temnu (Rocha *et al.*, 2019).

Dalším krokem při validaci metody bylo aplikování protokolu na vzorky potravin. Pro snížení detekčního limitu kolonie tvořících jednotek (CFU), který obvykle bývá 10^5 CFU/ml, bylo použito pomnožovacích médií. Jako ideální kombinace bylo zvoleno dvoustupňové pomnožení v Oxoid Novel obohacovacím bujonu pro listerie. První pomnožení bylo provedeno po dobu 18 hodin při 37 °C a druhé 8 hodin při 37 °C následované centrifugací vzorku. Pokud byl vynechán krok centrifugace bylo první pomnožení provedeno po dobu 24 hodin při 37 °C a druhé 18 hodin při 37 °C. Výslednou fluorescenci a pomnožení zobrazuje **Obrázek 4**. Za těchto podmínek bylo možné detekovat koncentraci i 1 CFU/25 g nebo ml (Rocha *et al.*, 2019).



Obrázek 4 Buňky *Listeria monocytogenes* po hybridizaci se sondou LmPNA1253 v zorném poli epifluorescenčního mikroskopu, celkové zvětšení 400x (upraveno dle Rocha *et al.*, 2019)

A1- vzorek odebraný ve druhém obohacovacím kroku po 8 hodinách (centrifugovaný); B1- vzorek odebraný ve druhém obohacovacím kroku po 18 hodinách (bez centrifugace)

1.1.5.3 Rozlišení *Staphylococcus aureus* a koagulasa-negativních stafylokoků

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) je významným potravinářským patogenem. Stejně tak je původcem sepsí a následných úmrtí pacientů. Proto je rychlá identifikace stěžejní, pro zvolení správné medikace a urychlení léčby. Wang (2010) se zaměřil na detekci pomocí metody FISH.

Pro práci byly vybrány sondy s označením STA a SAU. Sonda STA je značena fluorescein isothiokianátem a je specifická pro celý rod *Staphylococcus* ssp.. Sonda SAU je značena Cy3 fluorochromem a je specifická pro *Staphylococcus aureus* (Wang, 2010).

Hybridizační protokol byl převzat z prací Kempf *et al.* (2000) a Jansen *et al.* (2000) s určitými modifikacemi. Buňky byly nanесeny na sklíčko a fixovány 4% roztokem formaldehydu v 96% ethanolu (Jansen *et al.*, 2000). Byla provedena permeabilizace buněčné stěny pomocí lysozymu (1 mg/ml) po dobu 10 minut při 30 °C a poté pomocí lysostaphynu (60 mg/ml, rozpuštěný v 10 mM Tris o pH 8) po dobu 10 minut při 30 °C. Po permeabilizaci byla sklíčka promyta a následně překryta hybridizačním pufrem obsahujícím sondu (10 ng/ml). Po 90-ti minutové hybridizaci při 50 °C byla sklíčka promyta v promývacím pufru 10 minut při 50 °C. Sklíčka byla poté pozorována pod epifluorescenčním mikroskopem (Wang, 2010).

Pro ověření specificity a citlivosti sond byla provedena hybridizace s referenčními kmeny, mezi kterými bylo 13 zástupců rodu *Staphylococcus* včetně methicilin rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Candida albicans* a *Micrococcus luteus*. Obě použité sondy hybridizovaly specificky bez křížové vazby. Po získání těchto výsledků byly sondy použity při analýze 200 klinických vzorků. Z tohoto množství vzorků nebyly identifikovány dva vzorky MRSA a dva vzorky methicilin senzitivní *Staphylococcus aureus* (MSSA). Tyto absence signálu mohly být způsobeny drobnými rozdíly v buněčné stěně, kdy nebyla stěna dostatečně permeabilizována enzymy. V závěru autoři zmiňují, že i přes tyto čtyři neidentifikované vzorky je specificita vysoká. Pro svou rychlost, specifickou a citlivost je metoda vhodná pro detekci rodu *Staphylococcus* v krevních vzorcích (Wang, 2010).

1.1.5.4 Detekce *Salmonella* spp.

V případě infekcí rodem *Salmonella* je nejčastější příčinou přenos z potravin, a proto je jejich rychlá detekce zásadní. Při použití klasických kultivačních metod trvá detekce 3-5 dní. Tato časová prodleva může být vážným problémem pro potravinářské výrobky s rychlou distribucí a následnou konzumací. Z tohoto důvodu se skupina autorů Fang *et al.* (2003)

rozhodli navrhnout sondu pro detekci pomocí metody FISH a porovnat metodu FISH s klasickými metodami detekce (Fang *et al.*, 2003).

Fixace bakterií byla provedena v 3,7% roztoku formaldehydu 1 hodinu při 4 °C. Poté byla suspenze centrifugována a promyta PBS. Opět centrifugována a resuspendována ve směsi PBS:ethanol (1:1). Dále bylo 10 µl suspenze nanášeno na sklíčko ponecháno zaschnout a fixováno plamenem. Protokol pro hybridizaci byl převzat z Bohnert *et al.* (2000). Fixovaná sklíčka byla postupně dehydratována v 50%, 80% a 96% ethanolu, vždy tři minuty. Po dehydrataci byla sklíčka převrstvena směsí hybridizačního pufru a sondy. Inkubace proběhla při 46 °C 1,5 hodiny ve vlhkostní komůrce. Nenavázané sondy byly odstraněny promytím v promývacím pufru při 46 °C 20 minut a poté opláchnuty destilovanou vodou. Buňky byly dobarveny DAPI (Fang *et al.*, 2003).

V práci byly využity tři sondy specifické pro *Salmonella* spp., dále pak eubakterální sonda. Pro určení specificity bylo použito celkem 119 bakteriálních kmenů. Z tohoto počtu bylo 59 zástupců *S. enterica* a jeden *S. bongori*. Dále bylo použito 46 jiných zástupců z čeledi *Enterobacteriaceae* a 14 kmenů z dalších rodů. Žádná ze tří použitých specifických sond neposkytovala křížovou hybridizaci, což dokazuje 100 % specificitu. Problémy v hybridizaci se vyskytly pouze u určitých kmenů rodu *Salmonella*, kde nedošlo k hybridizaci (Fang *et al.*, 2003).

Dále byla v této práci prověřována účinnost metody FISH a použitých sond v případě detekce z potravinových matric. V této fázi byla použita pouze sonda Sal-1 a Eub 338. Pro ověření funkčnosti metody bylo použito 18 potravin. Tyto matrice byly kontaminovány kmenem *Salmonella* Panama. Metoda FISH byla schopna identifikovat bakterii ve všech případech. Mezi testovanými potravinami byly potraviny živočišného původu jako vejce, maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky a luštěniny. Výsledky ukazují, že matrice nemá vliv na výsledky FISH (Fang *et al.*, 2003).

V závěru skupina shrnuje výhody FISH, jako je rychlost a přesnost. Dále pak ekonomickou stránku, kdy náklady na kultivační média jsou vyšší než náklady spojené s FISH. Jako nevýhoda je uváděn nedostatečný počet sond pro množství sérovarů rodu *Salmonella*. Z tohoto důvodu není metoda FISH vhodná pro epidemiologické účely (Fang *et al.*, 2003).

Dalším týmem, který se zaměřil na detekci *Salmonella* spp. byl Almeida *et al.* (2010). V jejich práci byla využita metoda PNA-FISH (Almeida *et al.*, 2010).

Buňky byly po nanesení na sklíčko fixovány ve 4% paraformaldehydu a poté v 50% ethanolu vždy 10 minut. Poté byly osušeny na vzduchu. Do jamek bylo následně nakapáno 20 µl hybridizačního pufru s obsahem sondy 200 nM a překryty krycím sklem. Hybridizace probíhala ve vlhkostní komůrce 30 minut při 57 °C. Poté bylo krycí sklo sejmuto a podložní sklíčko bylo vloženo do vytemperovaného promývacího pufru na 30 minut při 57 °C. Po vyjmutí z promývacího pufru bylo osušeno v temnu při laboratorní teplotě. Buňky byly následně dobarveny DAPI (Almeida *et al.*, 2010).

Druhým navrhnutým postupem byla hybridizace v suspenzi, kdy byly buňky pro fixaci suspendovány ve 4% paraformaldehydu po dobu 1 hodiny. Poté byly centrifugovány a resuspendovány v 50% ethanolu a inkubovány 30 minut při -20 °C. Po inkubaci byly promyty sterilní destilovanou vodou a po centrifugaci resuspendovány v hybridizačním pufru s obsahem sondy 200 nM. Suspenze byla hybridizována 30 minut při 57 °C. Po hybridizaci byly buňky centrifugovány a resuspendovány v promývacím pufru. Tato směs byla inkubována 30 minut při 57 °C. Po promytí byly buňky opět centrifugovány a resuspendovány v 500 µl sterilní destilované vody. Tato suspenze byla následně přímo nanesena na sklíčko. Jako v předešlém postupu byly buňky dobarveny DAPI (Almeida *et al.*, 2010).

Cílem práce bylo také aplikování protokolu na vzorky. Jako vzorky byly vybrány dětská výživa, krevní vzorky, stolice a voda. Vzorek dětské výživy resuspendovaný ve sterilní destilované vodě byl inokulován *S. enterica* a pomnožen při 37 °C 8 hodin. Následně byla provedena hybridizace v suspenzi. U vzorků krve bylo provedeno pomnožení v trypton-sojovém bujONU 24 hodin při 37 °C a hybridizace byla provedena buď v suspenzi nebo na sklíčku. Vzorky stolice vepřů byly odebrány přímo ze střeva a asepticky přeneseny do vzorkovací nádoby. Následně bylo provedeno neselektivní pomnožení v pufrované peptonové vodě, a i selektivní pomnožení v Müller-Kauffmann tetrathionatovém bujONU s novobiocinem při 37 °C 24 hodin a v Rappaport-Vassiliadis bujONU pro salmonely při 42 °C 24 hodin. Poté byla provedena hybridizace. Vzorky vody byly odebrány z fontány a provedlo se obohacení v pufrované peptonové vodě při 37 °C přes noc. Po pomnožení bylo 100 ml vzorku zfiltrováno a filtr byl umístěn do pufrované peptonové vody a inkubován při 37 °C přes noc. Následně byla provedena hybridizace (Almeida *et al.*, 2010).

Ze všech uvedených experimentů vychází, že metoda PNA-FISH s navrhnutou sondou je schopna úspěšně detekovat *Salmonella* spp. za kratší dobu než běžně používané kultivační

metody. Dále bylo také dokázáno, že díky obohacovacím krokům je možno stanovit koncentraci 1 CFU/10 ml či g (Almeida *et al.*, 2010).

1.1.5.5 Detekce *Cronobacter* spp.

Cronobacter sakazakii, dříve nazývaný *Enterobacter sakazakii*, je oportunní patogen, vyskytující se běžně v životním prostředí. V případě infekce dospělých osob se nejedná o závažné onemocnění. Kritická je ovšem infekce novorozenců, u kterých dochází kvůli infekci k vysoké mortalitě. Klasické kultivační a biochemické metody jsou časově náročné, a proto se tým autorů Almeida *et al.* (2009) rozhodl využít k detekci *Cronobacter* metodu FISH. Pro tyto účely navrhli PNA sondu s označením SakPNA971.

Hybridizační protokol byl založen na protokolech Perry-O'Keefe *et al.* (2001) pro hybridizaci v suspenzi a Guimarães *et al.* (2007) pro hybridizaci na sklíčku.

Při hybridizaci v suspenzi byly buňky fixovány v 4% paraformaldehydu 10 minut, promyty PBS a následně resuspendovány v 50% ethanolu nejméně po dobu 10 minut při -20°C. Z takto fixovaných buněk bylo odpipetováno 100 µl, centrifugováno a promyto PBS a opět centrifugováno. Poté byly buňky resuspendovány v hybridizačním pufru s obsahem sondy. Hybridizace proběhla při 57 °C 30 minut. Po hybridizaci byla suspenze centrifugována a sediment resuspendován v promývacím pufru předehřátém na 57 °C a ponechán při této teplotě 10 minut. Tento krok byl zopakován ještě dvakrát. Promytý sediment byl resuspendován ve 100 µl promývacího pufru. 2 µl této suspenze byly následně aplikovány na sklíčko a ponechány uschnout (Almeida *et al.*, 2009; Perry-O'Keefe *et al.*, 2007).

Pro hybridizaci na sklíčku, byly suspenze buněk naneseny do jamek a ponechány uschnout. Sklíčka byla posléze fixována ponořením do 4% paraformaldehydu a poté do 50% ethanolu vždy na 10 minut. Jamky byly poté převrstveny 30 µl hybridizačního pufru s obsahem sondy a nechány hybridizovat 30 minut při 57 °C. Po hybridizaci byla sklíčka ponořena do promývacího pufru na 30 minut při 57 °C (Almeida *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2001).

Dalším krokem bylo ověření specifity sondy. To bylo provedeno pomocí 51 kmenů *Cronobacter*, 23 kmenů rodu *Enterobacter* a 31 dalších příbuzných kmenů, či kmenů které by se mohly vyskytovat v sušeném mléce. Výsledky ukázaly, že sonda má 100% specifitu (Almeida *et al.*, 2009).

Hlavním účelem práce bylo optimalizovanou metodu využít pro detekci *Cronobacter* spp. v sušeném mléce. Do rehydratovaného mléka byly přidány bakterie, aby vznikla suspenze o koncentraci od 1×10^2 až 1×10^8 CFU/ml. Jeden mililitr z každého ředění byl centrifugován a dále zpracován, jak je uvedeno výše. Z výsledků hybridizace vyplývá, že je metoda schopna zachytit nejnižší koncentraci buněk 1×10^6 CFU/ml. Pokud je do postupu zařazen obohacovací krok, kdy je vzorek inkubován 8 hodin při 37 °C je metoda schopna zachytit počáteční koncentraci 1 CFU/g sušeného mléka. FISH je schopna poskytnout výsledky za méně než 12 hodin, zatímco kultivační metody s biochemickými testy vyžaduje 5-7 dní (Almeida *et al.*, 2009).

1.1.5.6 Detekce *Escherichia coli*

Ve své práci se Baudart and Leebanon (2010) zaměřili na rychlou detekci *Escherichia coli* jakožto ukazatele fekálního znečištění vod. Běžně používaná kultivační metoda vyžaduje alespoň 18 hodin, tato doba by mohla být použitím FISH výrazně zkrácena. Předmětem testování bylo dále detekování životaschopných buněk a jejich odlišení od ostatních. Autoři využili pomocných oligonukleotidů pro zvýšení fluorescenčního signálu. Slabý signál může být způsoben buď malým množstvím ribosomů, na které by se mohla sonda navázat, či špatnou dostupností některých rRNA sekvencí. Pro vyřešení špatné dostupnosti rRNA sekvencí byly navrhnuty neznačené oligonukleotidy, které se váží na oblast bezprostředně sousedící s cílovou sekvencí značené sondy (Baudart and Leebanon, 2010; Dias *et al.*, 2018).

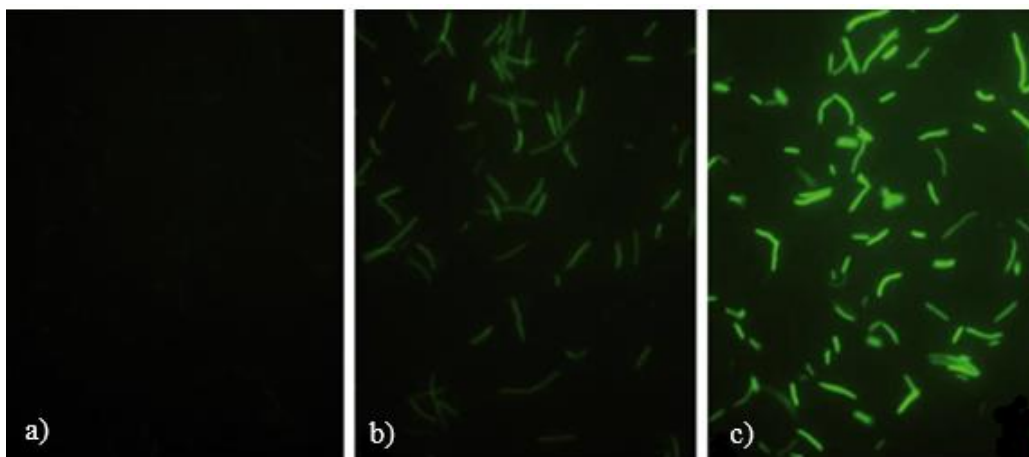
Pro studii byly použity dvě značené sondy specifické pro *E. coli*. Jednalo se o sondy s označením Ecoli a Colinsitu, které byly značeny na 5' konci fluoresceinem fluo. Jako vhodné byly vybrány oligonukleotidy s označením HEc_L, HColin_L a HColin_R. Jak sondy, tak pomocné oligonukleotidy byly cíleny na 16S rRNA (Baudart and Leebanon, 2010).

Před samotnou hybridizací byl vzorek vody podroben testu životaschopnosti buněk (DVC-Direct Viable Count test). Vzorek vody byl zfiltrován přes černou polyesterovou membránu o velikosti pórů 0,4 μ m. Tato membrána byla následně umístěna na celulosovou podložku nasáklou neselektivním živným médiem s obsahem kyseliny nalidixové (koncentrace 10 μ g/ml) a inkubována 4 hodiny při 37 °C. Po inkubaci byly narostlé kolonie podrobeny hybridizaci. Výsledkem tohoto testu byly buňky s vyšší fluorescencí, díky vyššímu obsahu ribosomů. Tyto buňky bylo tedy možno považovat za životaschopné (Baudart and Leebanon, 2010).

Po zfiltrování vzorku vody pro DVC test, či pro postup bez testu byla provedena hybridizace. Filtr byl přenesen na podložku nasáklou 80% ethanolem a ponechán na podložce 3 minuty. Poté byly filtr i podložka přeneseny do Petriho misky a ponechány při laboratorní teplotě 4 minuty. Následně byly usušeny při laboratorní teplotě. Poté byl filtr přenesen do 50 μ l hybridizačního pufru s obsahem sondy a pomocného oligonukleotidu (každý 2,5 ng/ μ l) v hybridizační komůrce inkubován 90 minut při 46 °C. Po hybridizaci byl filtr přenesen na podložku nasáklou 550 μ l promývacího pufru. Jako detekční systém byla použita cytometrie v pevné fázi (SPC- Solid Phase Cytometry) (Baudart and Leebanon, 2010).

Pro kontrolu specifity použitých sond bylo využito 27 kmenů a izolátů *E. coli* a 44 kmenů a izolátů ostatních zástupců např. z čeledi *Enterobacteriaceae* a zástupci *Pseudomonas* spp.. Při použití sondy Coinsitu poskytovaly fluorescenční signál všechny použité kmeny *E. coli*. U kontrolních kmenů se vyskytla křížová hybridizace pouze u *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae* a *Shigella sonnei*. Stejným způsobem byla testována i specifita sondy Ecoli a pomocných oligonukleotidů. I v tomto případě poskytovaly signál všechny zvolené kmeny *E. coli*. Křížovou hybridizaci vykazovaly *Escherichia albertii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* a *Shigella boydii* (Baudart and Leebanon, 2010).

Při vyhodnocení výsledků byly viditelné rozdíly při použití DVC testu. Při absenci DVC není signál dostatečně silný, nebo dokonce chybí. Naopak při jeho použití dochází k zachytu fluorescence. Tato fluorescence je dále zvýšena použitím pomocných oligonukleotidů. Ke zvýšení signálu dochází jak při použití jedné sondy a jejího příslušného oligonukleotidu, tak při použití obou sond a třech pomocných oligonukleotidů. V tomto případě je fluorescence nejsilnější, jak ukazuje **Obrázek 5** (Baudart and Leebanon, 2010).



Obrázek 5 Buňky *Escherichia coli* hybridizované za použití sondy Colinsitu a pomocných oligonukleotidů v zorném poli epifluorescenčního mikroskopu; celkové zvětšení 400x (upraveno dle Baudart and Leebanon, 2010)

a) sonda Colinsitu, b) sondy Colinsitu a Ecoli, c) obě sondy a tři pomocné oligonukleotidy, Colinsitu, Ecoli, HEc_L, HColin_L a HColin_R

Použitý detekční systém SPC je oproti konvenčnímu epifluorescenčnímu mikroskopu málo citlivý. Není schopen zachytit fluorescenci, tak nízké koncentrace buněk, jaká je požadována normou. Toto úskalí je ovšem vyřešeno využitím DVC testu a pomocných oligonukleotidů, které napomáhají k afinitě sondy a k výsledné síle signálu. Díky těmto modifikacím je DVC-FISH s SPC detekcí schopna dosáhnout stejných výsledků jako MPN (Baudart and Leebanon, 2010).

1.1.6 Pozitiva a negativa fluorescenční *in situ* hybridizace

Jak je uvedeno výše, tak různé modifikace fluorescenční *in situ* hybridizace vedou k zvýšení citlivosti a možnosti využití. Hlavním kladem této metody ovšem zůstává její rychlost a specifčnost, se kterou lze detekovat mikroorganismy až na úroveň rodu (Dias *et al.*, 2018; Moter and Göbel, 2000). Její další výhodou je na rozdíl od PCR, schopnost rozlišení morfologie buněk a jejich rozmístění například při tvorbě biofilmů (Behman *et al.*, 2012; Moter and Göbel, 2000). Dále nám FISH umožňuje detekci několika mikroorganismů v simultánní analýze, přičemž je počet limitován pouze množstvím fluoroforů s rozdílnou emisní vlnovou délkou (Behnam, 2012; Wagner and Haider, 2012). Jedná se tudíž o levnou, jednoduchou a rychlou

metodu, která by mohla být v budoucnu dostupná pro mnohé laboratoře (Moter and Göbel, 2000).

Jako každá metoda má i fluorescenční *in situ* hybridizace svá omezení a problémy. Jako první lze uvést ztráty buněk při centrifugaci, či pipetování, které mohou snižovat počty buněk až pod detekovatelné množství. Samotné detekovatelné množství buněk je poměrně vysoké. Jedná se v průměru o 10^6 CFU/ml. Obtíže s detekovatelným množstvím mohou být vyřešeny použitím filtrů, či obohacovacím krokem, kdy dojde k namnožení buněk (Almeida *et al.*, 2009; Baudart and Leebanon, 2010). Dalším problémem může být nízká specifita sond, která se projeví navázáním sondy například na příbuzné druhy. Tento problém je řešen využitím modifikací, které mohou sondě poskytnout zvýhodněné prostředí pro vazbu. Dále je také častým problémem nízký obsah rRNA, který lze kompenzovat využitím sond s dvojitým značením stejným fluoroforem. Tímto způsobem se zvýší výsledný fluorescenční signál (Moter and Göbel, 2000).

1.2 *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* byl objeven roku 1929 lordem Listerem po kterém nese i své jméno. Tento rod doposud zahrnuje 17 druhů. Ty se rozdělují do dvou kategorií *Listeria sensu stricto*, která pojímá *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii* a *Listeria sensu lato* s rody *Listeria fleischmannii*, *Listeria grayi*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria booriae*, *Listeria newyorkensis*. *L. monocytogenes* způsobuje u lidí onemocnění listeriózu, které postihuje především osoby se sníženou imunitou. Jedná se především o těhotné, děti, starší osoby, pacienty po transplantaci, či postižené AIDS. V případě listeriózy těhotných žen může dojít k potratu plodu. Díky častému přenosu potravinami se jedná o závažný potravinářský patogenní mikroorganismus (Orsi and Wiedmann, 2016; Peuntherer *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2003; Schindler, 2010; Votava *et al.*, 2003). Za patogenní listerii pro člověka lze také označit *Listeria ivanovii* (*L. ivanovii*), onemocnění způsobená touto bakterií ovšem nejsou tak častá jako u *L. monocytogenes*. Nejčastěji je spojována s infekcí ovcí a hovězího dobytka (Orsi and Wiedmann, 2016).

1.2.1 Výskyt a přenos na člověka

Listerie je běžně rozšířenou bakterií, kterou lze izolovat z vody, půdy, rostlin a stolice zvířat i člověka. Zdrojem nákazy bývají nejčastěji mléko a mléčné výrobky, především měkké sýry vyrobené z nepasterovaného mléka s pH vyšším než 5,2. Dále pak mražené produkty, zelenina, drůbež, uzené ryby, mořské plody a saláty. Častým vehikulem jsou také hotová jídla připravená ke konzumaci. Zdrojem kontaminace může být samotná potravinářská výroba. *L. monocytogenes* je schopna, při nedostatečné sanitaci, zůstat v přístrojích i po dobu několika let, což může vést i při použití mikrobiálně čistých surovin, ke kontaminaci finálního produktu. Tato vlastnost může souviset se schopností tvorby biofilmů. K expozici může také dojít při práci se zvířaty (Jadhav *et al.*, 2012; Sedláček, 2007; Schindler *et al.*, 2010; Tompkin, 2002; Votava *et al.*, 2003).

1.2.2 Biochemické vlastnosti a morfologie

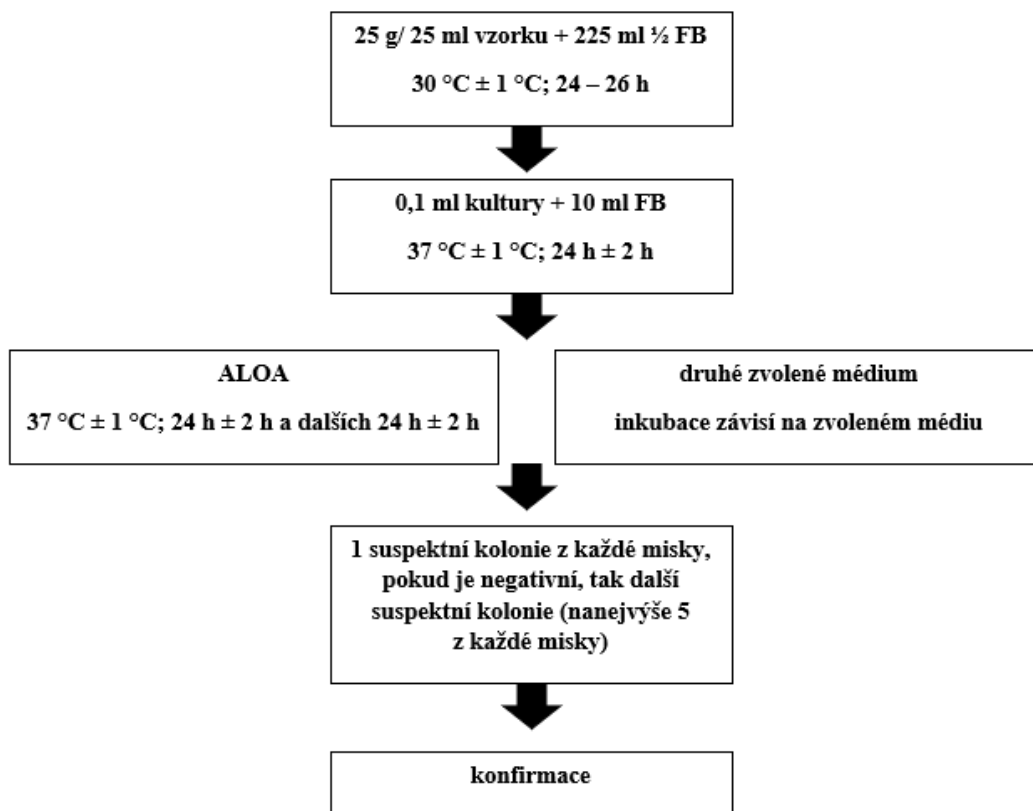
L. monocytogenes jsou grampozitivní krátké tyčinkovité bakterie, mohou se vyskytovat i jako kokovité. Na povrchu mají peritrichální bičíky, díky kterým mají při teplotě 20-25 °C charakteristický kotrmelcovitý pohyb. Mohou se vyskytovat jednotlivě, nebo v krátkých řetězcích, v případě starších kultur mohou být i ve formě dlouhých vláken. Optimální teplota růstu je 30-37 °C. Jsou schopny žít a množit se při teplotě 4-45 °C. Mohou přežívat vysoké koncentrace NaCl. Mají fakultativně anaerobní metabolismus a jsou schopny fermentovat glukózu bez tvorby plynu. Na krevním agaru tvoří β -hemolýzu čehož se využívá při confirmaci. Tvoří katalázu a jsou oxidáza negativní. Další biochemické vlastnosti uvádí **Tabulka 2** (Görner and Valík, 2004; ISO 11290:2017; Sedláček, 2007).

Tabulka 2 Biochemické vlastnosti *Listeria monocytogenes* (Görner and Valík, 2004; ISO 11290:2017; Sedláček, 2007)

Test	Výsledek	Test	Výsledek
β -hemolýza	+	Kasein	-
L-rhamnóza	+	Kataláza	+
D-xylóza	-	Oxidáza	-
Glukóza	+	Želatina	-
Acetoin	+	Urea	-
Eskulin	+		

1.2.3 Možnosti identifikace

Způsob identifikace *L. monocytogenes* uvádí norma ISO 11290:2017. Tato norma zahrnuje čtyři po sobě jdoucí kroky identifikace, kterými jsou: primární pomnožení, sekundární pomnožení, vyočkování na selektivně diagnostická média a konfirmace. Schéma metody uvádí **Obrázek 6**.



Obrázek 6 Schéma stanovení *Listeria monocytogenes* dle ISO 11290:2017

Prvním krokem identifikace je pomnožení v polovičním bujónu dle Frasera. Po inkubaci následuje přeočkování do plného bujónu dle Frasera. Z tohoto pomnožení se provede přeočkování na dvě selektivně diagnostické půdy. První je agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA agar). Další půda je volitelná jedná se například o OXFORD či PALCAM. Po této inkubaci se provede přeočkování suspektních kolonií na neselektivní médium pro konfirmační testy. V normě jsou pro konfirmaci uvedeny testy na ověření: β -hemolýzy, L-rhamnózy, D-xylózy, katalázy, pohyblivosti a CAMP test (ISO 11290:2017; Jadhav *et al.*, 2012).

Christie, Atkins, Munch–Petersen test (CAMP test) je vhodný pro rozlišení jednotlivých druhů rodu *Listeria* na základě hemolytické činnosti. Jedná se o rozlišení především

L. monocytogenes, *L. ivanovii* a *L. seeligeri*. Test je založen na vzájemné interakci hemolytických faktorů mezi zástupci rodu *Listeria* a mezi *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a *Rhodococcus equi* (*R. equi*). *S. aureus* a *R. equi* jsou naočkovány jako dvě rovnoběžné čáry a kolmo k nim je naočkována kultura listerie. *L. monocytogenes* tvoří zvýšenou hemolýzu v blízkosti *S. aureus* stejně tak *L. seeligeri*, ta ovšem v menší míře. *L. ivanovii* tvoří zvýšenou hemolýzu v přítomnosti *R. equi* (Gasarov *et al.*, 2005; ISO 11290:2017).

Další metodou používanou k identifikaci zástupců rodu *Listeria* jsou imunochemické metody. Jedná se o metody založené na specifické vazbě antigenu s protilátkou. Tyto způsoby detekce jsou výhodné pro svou rychlost, jednoduchost a přesnost. Dnes jsou již komerčně dostupné sady, které jsou schváleny kontrolními orgány. Mezi nejčastěji používaná provedení patří imunoanalýza na pevném sorbentu s enzymatickým značením (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay- ELISA). Při této metodě je protilátka imobilizována na pevném nosiči, například mikrotitrační destičce, na ní se posléze naváže antigen. Po inkubaci je na antigen navázána druhá protilátka značená enzymem. Jedná se o takzvanou sendvičovou metodu. Dalším druhem enzymatické analýzy jsou imunoafinitní metody. Zde se využívá enzymaticky značených částic či ponorných tyčinek, které jsou pokryty specifickou protilátkou. Tyto záchytné metody mohou být použity pro zakoncentrování bakterií a jejich následné analýze pomocí molekulárních metod (Gasarov *et al.*, 2005; Jadhav *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014).

Pro identifikaci jsou také používány molekulární metody, které se díky své vysoké specifičnosti dostávají do popředí a v rychlosti se mohou vyrovnat ELISA. Nejvýznamnějším zástupcem molekulárních metod je polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction-PCR). Při PCR jsou cílové úseky DNA označeny primery, což jsou krátké segmenty DNA specifické pro určitý gen, a takto označené úseky jsou následně amplifikovány pomocí termostabilní polymerázy. Amplifikované fragmenty jsou následně detekovány pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu. Při použití více primerů cílených na různé mikroorganismy je možné provést jejich detekci v jednom vzorku. V tomto případě se jedná o multiplexní PCR. Problémem při analýze potravin a vzorků ze životního prostředí může být přítomnost látek inhibujících PCR, což může vést k falešně negativním výsledkům. Tento nedostatek může být vyřešen použitím výše zmíněných imunoafinitních metod. Dalším způsobem detekce může být použití hybridních metod jako je FISH (Gasarov *et al.*, 2005; Jadhav *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014).

1.3 Rod *Salmonella*

Salmonely jsou významným původcem alimentárních i klinických onemocnění, které se i přes velké snahy eliminace vyskytují po celém světě a mají stoupající trend. V důsledku infekce bakterií rodu *Salmonella* zemře ročně na světě přibližně 3 miliony lidí. *Salmonella* spp. postihuje jak lidské, tak zvířecí hostitele (Azevedo *et al.*, 2013).

1.3.1 Taxonomie

Rod *Salmonella* byl objeven roku 1885 dr. Theobaldem Smithem a od jejího objevení bylo popsáno více než 2 500 sérovarů, které byly považovány za nové druhy. Dnes je již známým faktem, že je rod *Salmonella* rozdělen pouze na dva druhy. Jedná se o *Salmonella enterica* (*S. enterica*) a *Salmonella bongori* (*S. bongori*). Z těchto dvou druhů se patogenní sérovary vyskytují pouze u *S. enterica*. Druh *S. enterica* pojímá 6 poddruhů (Votava *et al.*, 2003). Přehled druhů a poddruhů uvádí **Tabulka 3**.

Tabulka 3 Přehled druhů a poddruhů rodu *Salmonella* (upraveno dle Grimont and Weil, 2007)

<i>Druh (species)</i>	<i>Poddruh (subspecies)</i>
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>
	<i>salamae</i>
	<i>arizonae</i>
	<i>diarizonae</i>
	<i>houtenae</i>
	<i>indica</i>
<i>S. bongori</i>	

Pro člověka se patogenní sérovary vyskytují v poddruhu *S. enterica subsp. enterica*. Jedná se o *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*), *Salmonella* Paratyphi (*S. Paratyphi*), které jsou primárně antropopatogenní a *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) a *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*), které jsou primárně zoonopatogenní (Votava *et al.*, 2003).

V názvosloví rodu *Salmonella* zůstává zažitý způsob označování sérovarů jako druhové označení. Znakem, že se nejedná o druhové jméno, je uvádění sérovaru s velkým písmenem a bez kurzívy. Taxonomicky přesným označením například *S. Enteritidis* by tedy bylo *S. enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis (Grimont and Weil, 2007; Votava *et al.*, 2003).

1.3.2 Výskyt a přenos na člověka

Rod *Salmonella* lze rozlišit na dvě části. Na sérovary adaptované na člověka a sérovary adaptované na zvířecí hostitele. Při přenosu sérovarů adaptovaných na člověka je zdrojem infekce jiný člověk či odpadní voda. Jedná se *S. Typhi* a *S. Paratyphi* (Peutherer *et al.*, 1999; Schindler, 2010; Votava *et al.*, 2003).

Sérovary adaptované na zvířecí hostitele jsou na člověka přenášeny především v potravinách a způsobují alimentární onemocnění. Jedná se především o drůbež. V tomto případě se jedná spíše o vejce než o maso. Z tohoto faktu vychází, že vehikulem mohou být i výrobky z vajec jako majonézy, zákusky či zmrzlina. Dalším zdrojem může být i maso, které je kontaminováno při porážce, jedná se o vepřové a hovězí. Zdrojem alimentárních onemocnění mohou být dále také různé druhy zeleniny a ovoce, mléko a mléčné výrobky (Azevedo *et al.*, 2013; Peutherer *et al.*, 1999; Schindler, 2010; Votava *et al.*, 2003).

1.3.3 Biochemické vlastnosti a morfologie

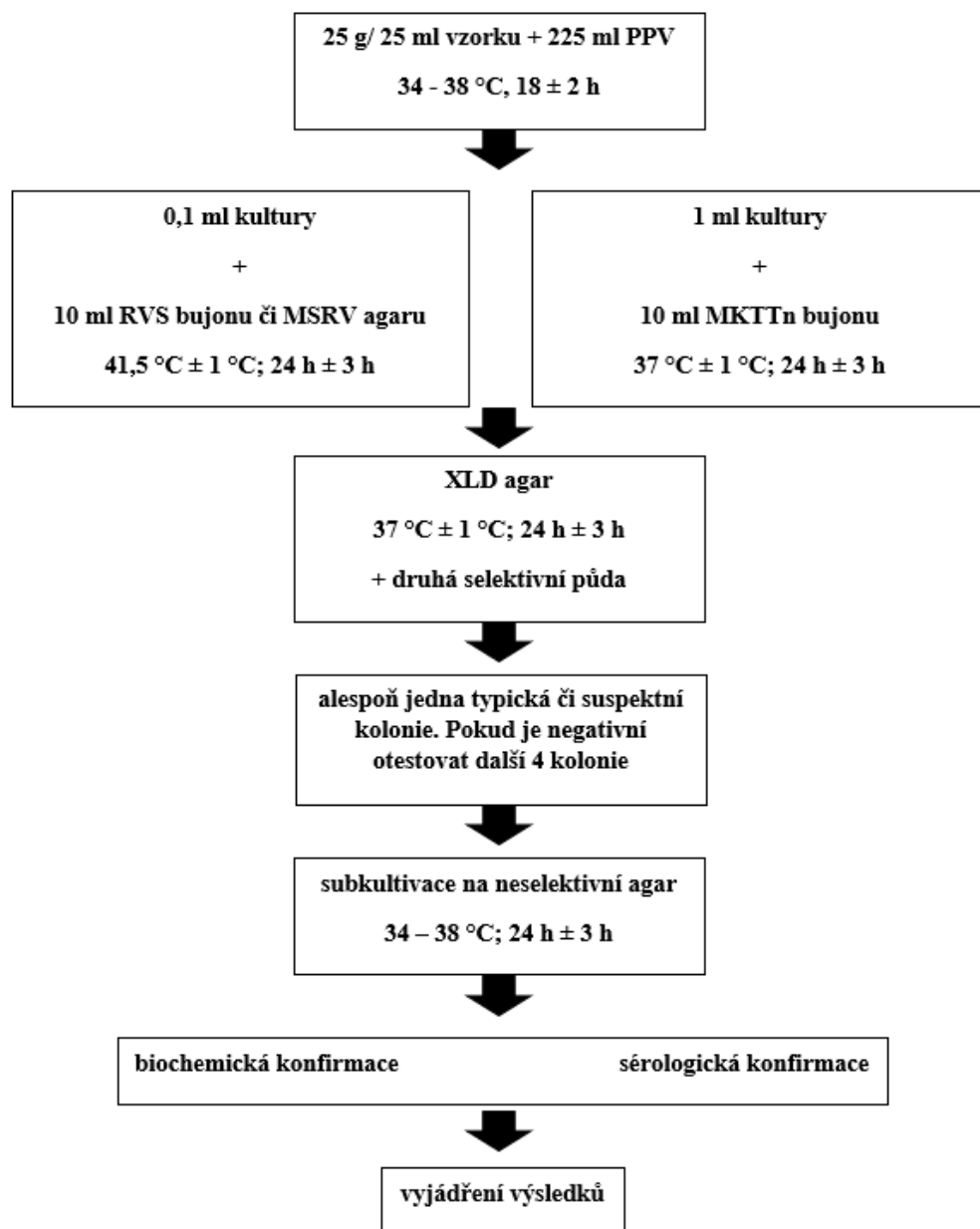
Rod *Salmonella* spp. jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky s peritrichálními bičíky. Patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Většinou jsou pohyblivé. Jejich optimální růstová teplota je 37 °C. Jako celá čeleď *Enterobacteriaceae* jsou schopny využívat glukózu za tvorby plynu. Nevyužívají laktózu ani sacharózu a jsou schopny tvořit H₂S. Štěpí manitol a využívají citrát (Görner and Valík, 2004; ISO 6579:2017; Sedláček, 2007). Přehled těchto a dalších biochemických vlastností ukazuje **Tabulka 4**.

Tabulka 4 Biochemické vlastnosti *Salmonella* spp. (ISO 6579:2017; Sedláček, 2007)

Test	Výsledek	Test	Výsledek
VP	-	Urea	-
Indol	-	Oxidáza	-
Citrát	+	Kataláza	+
Lyzin	+	Glukóza	+
Ornithin	+	Laktóza	-
H ₂ S	+	Manitol	+

1.3.4 Možnosti identifikace

Salmonella spp. je nejčastěji identifikována dle normy ISO 6579:2017 pro průkaz salmonel. V této normě je popsána horizontální metoda detekce, pomocí kultivačních metod na selektivně diagnostických médiích a následné biochemické rozlišení typických kolonií. Prvním krokem je pomnožení v pufrované peptonové vodě. Následuje přeočkování do selektivních pomnožovacích médií. Jedná se o Müller-Kauffmann tetrathionatový bujon s novobiocinem (MKTTn) a Rappaport Vassiliadis sója medium (RVS) nebo modifikovaná polotuhá půda podle Rappaport Vassiliadis (MSRV). Z těchto médií se přeočkuje na xylóza-lyzin-deoxycholátový agar a druhý selektivně diagnostický agar. Ze selektivního agaru se provede přeočkování pěti suspektních kolonií na neselektivní půdu MPA. Podrobné podmínky horizontální metody uvádí **Obrázek 7**. U těchto kolonií se po kultivaci provedou konfirmační testy, jak biochemické, tak sérologické. Standardními biochemickými testy jsou: růst na TSI agaru, růst na agaru s močovinou, průkaz lyzindekarboxylázy, detekce β -galaktosidázy a tvorba indolu. V sérologických testech se prokazují O-antigeny, H-antigeny a Vi-antigeny pomocí polyvalentního antiséra (ISO 6579:2017).



Obrázek 7 Schéma stanovení *Salmonella* spp. dle ISO 6579:2017

Dalším způsobem detekce *Salmonella* spp. může být využití molekulárně biochemických metod. Jedná se především polymerázovou řetězovou reakci a její modifikace jako je multiplexní PCR či kvantitativní PCR. Kvantitativní PCR (qPCR), či jinak nazývaná PCR v reálném čase (RT-PCR), umožňuje sledovat amplifikované produkty polymerázové reakce v reálném čase. Principem metody je průběžná detekce fluorescenčně značených produktů. Pro vytvoření fluorescenčního signálu jsou využívána fluorescenční barviva, či fluorochromem značené oligonukleotidy. Při zpracování vzorku pomocí qPCR není potřeba provádět rozdělení pomocí gelové elektroforezy. Výsledky umožňují mimo kvalitativních dat zjištění

kvantitativního množství detekované DNA, což u konvenční PCR není možné (Navarro *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014).

Dalším detekčním způsobem je využití imunochemických metod. Nejčastěji využívanou metodou je ELISA, která je prováděna v mikrotitračních destičkách. Dalším pevným sorbentem využívaným v této metodě mohou být pipetovací špičky, membrány či míchadélka. Pro detekci rodu *Salmonella* je již možno zakoupit specializovaný testovací kit BIOLINE *Salmonella* ELISA test kit. Dále je možno využít imunomagnetických metod, při kterých je magnetická částice pokryta specifickými protilátkami. Po inkubaci vzorku s magnetickými částicemi se provede oddělení ve vhodném magnetickém separátoru a poté promytí nečistot. Díky tomu je možno získat velice čisté vzorky (Zhao *et al.*, 2014).

V případě subtypizace *Salmonella* spp. se využívá hmotnostní spektrometrie (MS). Je založena především na analýze proteinů a lipidů. Nejběžněji využívanou technikou je ionizace laserem za přítomnosti matrice ve spojení s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF MS). Pro toto spojení jsou k dispozici knihovny spekter, které pomáhají ke snadnější identifikaci. Nevýhodou metody je neschopnost analýzy za účasti potravinové matrice či směsi bakterií. Z tohoto důvodu je třeba analyzovat pouze čisté kultury (Bell *et al.*, 2016; Schweickert *et al.*, 2004).

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavedení a optimalizace FISH pro detekci významných potravinářských patogenních bakterií.

Prvním úkolem bylo zavedení FISH pro detekci *Listeria monocytogenes* pomocí DNA sondy RL-2. Sonda byla navržena kolektivem autorů Oliveira *et al.* (2003). Podstatnou částí práce byla optimalizace metody.

Druhým úkolem bylo zavedení a optimalizace jednotlivých kroků metody FISH pro detekci *Salmonella* spp. pomocí PNA sondy SalPNA1873 navržené a popsané v práci Almeida *et al.* (2010).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje, pomůcky, živná média a pracovní roztoky

3.1.1 Chemikálie

CC/Mount	(Sigma-Aldrich, Německo)
DAPI (4', 6 – diamido-2-fenylindol)	(Sigma-Aldrich, USA)
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	(Lachema, ČR)
Dodecylsulfát sodný	(Fluka, ČR)
Dodekahydrát hydrogen fosforečnanu di(sodného)	(Penta, ČR)
Tris	(Sigma-Aldrich, Německo)
EDTA	(Applichem, Německo)
Formaldehyd	(Sigma-Aldrich, Německo)
Paraformaldehyd	(Sigma-Aldrich, Německo)
Chlorid draselný	(Penta, ČR)
Chlorid sodný	(Penta, ČR)
Hydroxid sodný	(Penta, ČR)
Formamid	(Sigma-Aldrich, Německo)
Dextran sulfát	(EMD Millipore, Německo)
Ficol [®] 400	(Sigma-Aldrich, Německo)
Pyrofosfát sodný	(Sigma-Aldrich, Německo)
Polyvinyl pyrolidin	(Sigma-Aldrich, Německo)
Ethanol 96%	(Lach-Ner, ČR)
Triton X	(Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Přístroje

Analytické váhy KERN 444 a 445	(Kern, Německo)
Autokláv PS 20A	(BMT, ČR)
Denzitometr McFarland DEN-1	(Biosan, USA)

Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104	(BMT, ČR)
Chladnička Intuition SpacePlus	(Elektrolux, Švédsko)
Chladnička ZRB 36 ND	(Zanussi, Itálie)
Laboratorní váhy KERN 440-4	(Kern, Německo)
Laminární box Hotte MSC 9 Standard	(Jouan, Francie)
Epifluorescenční mikroskop Nikon ECLIPSE 80i a vyhodnocovací software NIS – Elements Viewer 4.0 a NIS – Elements AR 4.00.01 64-bits	(Nikon, ČR)
Mraznička	(Whirlpool, USA)
Vortex MS3 digital	(IKA, USA)
Termostat ST 5	(POL-EKO, Polsko)
MyTemp™ Minu Digital Incubator	(Benchmark Scientific, USA)

3.1.3 Pomůcky

Automatické pipety BioHit Proline	(BioHit, Finsko)
Automatické pipety DISCOVERY Comfort	(Discovery, Německo)
Běžné laboratorní sklo	
Mikrosklo podložní s epoxidovou maskou	(Marienfeld laboratoř glassware, Německo)
Plastové a pryžové pomůcky	

3.1.4 Živná média a pracovní roztoky

- TSA agar (Trypton Soya Agar)
 - Výrobce: Himedia, Indie
 - Složení:

enzymatický hydrolyzát kaseinu	15 g/l
sojový pepton	5 g/l
agar	15 g/l
NaCl	5 g/l
 - Příprava: navážka 40 g směsi se rozpustí v 1000 ml destilované vody a autoklávuje se při 121 °C/15 min

- CASO bujon (Casein-Soymealpeptone Broth)
 - Výrobce: Merck, Německo
 - Složení:

kaseinový pepton	17,0 g/l
sojový pepton	3,0 g/l
D (+) – glukóza	2,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
hydrogenfosforečnan draselný	2,5 g/l
 - Příprava: navážka 30 g směsi se rozpustí v 1000 ml destilované vody a autoklávuje se při 121 °C/15 min

- Fyziologický roztok
 - Složení:

NaCl	8,5 g
destilovaná voda	1000 ml
 - Příprava: 8,5 g NaCl se rozpustí v 1000 ml destilované vody a autoklávuje se při 121 °C/15 min

- 4% paraformaldehyd, pH=6,9
 - Složení:

paraformaldehyd	8 g
PBS	200 ml
5 mol/l NaOH	
1 mol/l HCl	
 - Příprava: 100 ml PBS bylo zahřáto na vodní lázni na 60 °C. Do zahřátého roztoku bylo přidáno 8 g paraformaldehydu a rozpuštěno. Do roztoku bylo přidáno několik kapek 5 mol/l NaOH do vyčerení. Pomocí HCl bylo pH upraveno na hodnotu 6,9. Poté byla směs ochlazená na laboratorní teplotu, zfiltrována a doplněna do 200 ml

- 1 M Tris-HCl, pH = 8
 - Složení: $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ 121,1 g
36% HCl 42 ml
5 mol/l NaOH
 - Příprava: $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ se rozpustí v destilované vodě, poté se přidá 36% HCl, po vychladnutí se pomocí 5 mol/l NaOH upraví pH na hodnotu 8, nakonec se doplní destilovanou vodou na 1000 ml a autoklávuje se při 121 °C/15 min

- 1 M Tris-HCl, pH = 7,5
 - Složení: $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ 12,1 g
36% HCl 4,2 ml
5 mol/l NaOH
 - Příprava: $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ se rozpustí v destilované vodě, poté se přidá 36% HCl, po vychladnutí se pomocí 5 mol/l NaOH upraví pH na hodnotu 7,5, nakonec se doplní destilovanou vodou na 100 ml a autoklávuje se při 121 °C/15 min

- 1 x PBS pufr (fosfátový pufr), pH = 7
 - Složení: NaCl 8 g
KCl 0,2 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 1,4 g
 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 7 g
 - Příprava: všechny uvedené komponenty se rozpustí v destilované vodě, pH se upraví 5 mol/l roztokem NaOH na hodnotu 7, nakonec se doplní destilovanou vodou na 1000 ml a autoklávuje se pro 121 °C/15 min

- 0,5 M EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), pH = 8
 - Složení: $\text{Na}_2[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 186,1 g
5 mol/l NaOH
 - Příprava: EDTA se postupně rozpustí v destilované vodě, pH se upraví 5 mol/l roztokem NaOH na hodnotu 8, poté se doplní destilovanou vodou na 1000 ml a následně se roztok autoklávuje při 121 °C/15 min

- 10% (w/v) SDS (dodecylsulfát sodný)
 - Složení: dodecylsulfát sodný 20 g
 - Příprava: navážka 20 g dodecylsulfátu sodného se smísí s 200 ml destilované vody

- 1 M NaCl
 - Složení: NaCl 5,8 g
 - Příprava: navážka NaCl se naváží do baňky a doplní do 100 ml destilovanou vodou a následně se roztok autoklávuje při 121 °C/15 min

- 50% (w/v) polyvinyl pyrolidin
 - Složení: polyvinyl pyrolidin 12,5 g
 - Příprava: navážka se smísí s 12,5 ml destilované vody a následně se roztok autoklávuje při 121 °C/15 min

- 6,7% pyrofosfát sodný
 - Složení: pyrofosfát sodný 11,1 g
 - Příprava: navážka se doplní destilovanou vodou do 100 ml a následně se roztok autoklávuje při 121 °C/15 min

- 0,5 M Tris
 - Složení: Tris 6,1 g
 - Příprava: navážka se rozpustí v destilované vodě, doplní do 100 ml a následně se roztok autoklávuje při 121 °C/15 min

- 20% (w/v) Ficoll[®] 400
 - Složení: Ficoll[®] 400 2 g
 - Příprava: navážka se smísí s 8 ml destilované vody a následně se roztok autoklávuje při 121 °C/15 min

- 10 mg/ml lysozym
 - Složení: lysozym 0,0127 g
 - Příprava: lysozym se naváží do plastové zkumavky a napipetuje se 1,27 ml sterilní destilované vody

- Hybridizační pufr použitý pro *L. monocytogenes* dle Oliveira *et al.* (2003)
 - Složení: 5 M NaCl 7 ml
 - 1 M Tris-HCl; pH= 8 5 ml
 - 0,5 M EDTA; pH= 8 1 ml
 - 10% SDS 0,5 ml
 - Příprava: všechny komponenty se napipetují do 50 ml plastové zkumavky a doplní na objem 50 ml sterilní destilovanou vodou

- Hybridizační pufr dle Vodová (2013)
 - Složení: 5 M NaCl 360 µl
 - 1 M Tris-HCl; pH= 8 40 µl
 - formamid 600 µl
 - sterilní destilovaná voda 1000 µl
 - Příprava: všechny komponenty se napipetují do 2 ml mikrozkušavky

- Promývací pufr dle Vodová (2013)
 - Složení: 1 M Tris-HCl; pH= 8 1000 µl
 - 5 M NaCl 1020 µl
 - 0,5 M EDTA; pH= 8 500 µl
 - 10% (W/v) SDS 50 µl
 - Příprava: všechny komponenty se napipetují do 50 ml plastové zkumavky a doplní sterilní destilovanou vodou na objem 50 ml

- Hybridizační pufr pro *Salmonella* dle Almeida *et al.* (2010)
 - Složení:

formamid	3000 μ l
20% Ficoll [®] 400	2000 μ l
6,7% pyrofosfát sodný	150,4 μ l
50% polyvinyl pyrrolidin	40 μ l
10% Triton X	100 μ l
0,5 M EDTA	100 μ l
1 M Tris-HCl; pH=7,5	500 μ l
1 M NaCl	100 μ l
 - Příprava: všechny komponenty se napipetují do 15 ml plastové zkumavky a doplní sterilní destilovanou vodou na objem 10 ml

- Promývací pufr pro *Salmonella* dle Almeida *et al.* (2010)
 - Složení:

10% Triton-X	5000 μ l
1 M NaCl	750 μ l
0,5 M Tris	500 μ l
 - Příprava: všechny komponenty se napipetují do 50 ml plastové zkumavky a doplní sterilní destilovanou vodou na objem 50 ml

- Použité sondy
 - RL-2
 - Sekvence: 5'-ATA GTT TTA TGG GAT TAG C-3'
 - Modifikace: 5'Cy3
 - Výrobce: Generi biotech
 - SalPNA1873
 - Sekvence: 5'-AGG AGC TTC GCT TGC-3'
 - Modifikace: 5'-6-FAM
 - Výrobce: Generi biotech

3.2 Použité mikrobiální kmeny

Během práce byly použity kmeny z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (CCM) a z Americké sbírky mikroorganismů (ATCC):

<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010
<i>Citrobacter brakii</i>	CCM 158
<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329
<i>Escherichia coli</i>	CCM 2024, CCM 3954, CCM 4517
<i>Listeria innocua</i>	CCM 4030
<i>Listeria ivanovii</i>	CCM 5884
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM 5576
<i>Listeria welshimeri</i>	CCM 3971
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Rhodococcus equi</i>	CCM 3429
<i>Salmonella</i> Enteritidis	CCM 4420
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 43971
<i>Serratia marcescens</i>	CCM 303
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 4418
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCM 6187

Všechny uvedené bakterie byly uchovávány v lednici při teplotě 5 °C na TSA.

Pro získání suspenzí byly kultury naočkovány na TSA a inkubovány 24 hodin při 37 °C, vyjíma *B. cereus*, který byl inkubován 24 hodin při 30 °C. Poté byla vytvořena suspenze buněk ve fyziologickém roztoku o denzitě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice.

Denzita suspenzí byla ověřena pomocí vyočkování na TSA. Suspenze byla naředěna na koncentraci 10^3 a 10^2 CFU/ml. Následně bylo 100 μ l každého ředění rozetřeno L-hokejkou, vždy dvakrát pro každé ředění. Takto připravené misky byly inkubovány 24 h při 37 °C, vyjma *B. cereus*, který byl inkubován 24 hodin při 30 °C.

3.3 Zavedení FISH pro detekci *Listeria monocytogenes*

3.3.1 Vlastní postup

Bakteriální suspenze byla po 1 ml rozpipetována do mikrozkušavek a centrifugována (16500 x g, 5 min). Po odpipetování supernatantu bylo přidáno 500 µl 4% paraformaldehydu a promícháno. Suspenze byla ponechána 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Po fixaci byla suspenze centrifugována (16500 x g, 5 min) a supernatant byl odstraněn. K sedimentu bylo přidáno 1 ml PBS pufru. Směs byla promíchána a následně centrifugována (16500 x g, 5 min). Po odstranění supernatantu byl tento postup ještě jednou zopakován. Naposledy byla k sedimentu přidána směs PBS: 96% ethanolu (1:1). 5 µl suspenze bylo napipetováno do jamek podložního sklíčka s epoxidovou maskou a usušeno v termostatu při 45 °C. Sklíčko bylo následně pro dehydrataci vloženo do 96% ethanolu na 3 minuty a poté usušeno v termostatu při 45 °C.

U jamek s grampozitivními bakteriemi bylo provedeno enzymatické natrávení buněčné stěny. Do jamek bylo napipetováno 10 µl roztoku lysozymu. Sklíčko bylo vloženo do Petriho misky a inkubováno 45 minut. Poté bylo sklíčko postupně promýto v 50%, 80% a 96% ethanolu, vždy 3 minuty. Sklíčko bylo pro oschnutí vloženo do termostatu.

Pro hybridizaci bylo do každé jamky napipetováno 10 µl směsi hybridizačního pufru a sondy ($C_{\text{sondy}} = 6,378 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Sklíčko bylo vloženo do hybridizační komůrky a hybridizováno v termostatu vytemperovaném na 43 °C 4 hodiny. Po hybridizaci bylo sklíčko vloženo do hybridizačního pufru vytemperovaného na 43 °C a ponecháno promývat při 43 °C 20 minut. Sklíčko bylo následně dvakrát opláchnuto v destilované vodě a osušeno v temnu při laboratorní teplotě. Následně bylo do jamek napipetováno 5 µl DAPI (1 µg/ml), které se nechalo uschnout v temnu při laboratorní teplotě. Poté bylo provedeno promývání v destilované vodě. Byly provedeny celkem dva oplachy, každý po dobu tří minut a poté bylo sklíčko ponecháno oschnout v temnu při laboratorní teplotě.

Před pozorováním byl do jamek podložního skla napipetován CC/Mount a přiloženo krycí sklíčko. Preparát byl pozorován pod celkovým zvětšením 400x.

3.3.2 Optimalizované kroky

Pro optimalizaci postupu byly zvoleny kroky, které zobrazuje **Tabulka 5**

Tabulka 5 Optimalizované kroky při detekci *Listeria monocytogenes*

Optimální denzita buněk	10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ⁸ CFU/ml
Fixační roztok	2% formaldehyd, 4% paraformaldehyd
Doba fixace	1 hodina, 20 minut
Způsob permeabilizace buněčné stěny	Ethanolem, lysozymem
Vhodný hybridizační pufr	Dle Vodová (2013), Oliveira <i>et al.</i> (2003)
Koncentrace sondy	6,378; 15,95; 31,89; 63,78 ng/μl,
Doba hybridizace	3 hodiny, 4 hodiny
Teplota hybridizace	43, 44, 45, 46, 47 °C
Čas promývání	15, 20, 30 minut
Specifičnost sondy	Použité mikrobiální kmeny
Detekce <i>L. monocytogenes</i> ve směsi	Směs <i>L. monocytogenes</i> s <i>L. welshimeri</i> , <i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i> a <i>S. Typhimurium</i>

3.4 Zavedení PNA-FISH pro detekci rodu *Salmonella*

3.4.1 Vlastní postup

1 ml bakteriální suspenze byl napipetován do mikrozkušavek a centrifugován (16500 x g, 5 min). Poté byl supernatant odpipetován a k sedimentu bylo přidáno 500 μl 4% roztoku paraformaldehydu a ponecháno inkubovat při laboratorní teplotě jednu hodinu. Následně byly zkumavky opět centrifugovány (16500 x g, 5 min) a k sedimentu bylo přidáno 500 μl 50% ethanolu a směs byla inkubována 30 minut při -20 °C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (16500 x g, 5 min) a propláchnuty 500 μl sterilní destilované vody poté centrifugovány (16500 x g, 5 min) a resuspendovány v 500 μl sterilní destilované vody. Z této suspenze bylo 5 μl napipetováno do jamek podložního skla a ponecháno uschnout na vzduchu.

Pro hybridizaci bylo do jamek papipetováno 20 μl hybridizačního pufru s obsahem sondy a sklíčko bylo překryto krycím sklem. Poté bylo vloženo do hybridizační komůrky a hybridizováno 30 minut při teplotě 57 °C. Poté bylo vyjmuta, krycí sklo bylo odstraněno

a podložní sklo bylo vloženo do přehřátého promývacího pufru na 30 minut při 57 °C. Po vyjmutí z promývacího pufru bylo opláchnuto ve sterilní destilované vodě 10 sekund a následně ponecháno oschnout v temnu při laboratorní teplotě.

Pro lepší rozlišení byly buňky následně dobarveny DAPI. 5 µl barviva DAPI (1 µg/ml) bylo napipetováno do jamek a ponecháno uschnout v temnu při laboratorní teplotě. Sklíčko bylo následně vloženo do sterilní destilované vody na 3 minuty následně byl proveden stejným způsobem ještě jeden oplach. Sklíčko bylo ponecháno uschnout v temnu při laboratorní teplotě.

Před pozorováním byl do jamek podložního skla napipetován CC/Mount a přiloženo krycí sklíčko. Preparát byl pozorován pod celkovým zvětšením 400x.

3.4.2 Optimalizované kroky

Při optimalizaci byly zkoušeny kroky, které uvádí **Tabulka 6**.

Tabulka 6 Optimalizované kroky při detekci *Salmonella* spp.

Způsob fixace	4% paraformaldehyd, 1h + 50% ethanol, 30 minut; 2% formaldehyd, 24 hodin
Přidání permeabilizace membrány	lysozym
Čas hybridizace	30, 60, 90 minut
Teplota hybridizace	53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 °C
Koncentrace sondy	200, 400, 800 nM

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Zavedení FISH pro detekci *Listeria monocytogenes*

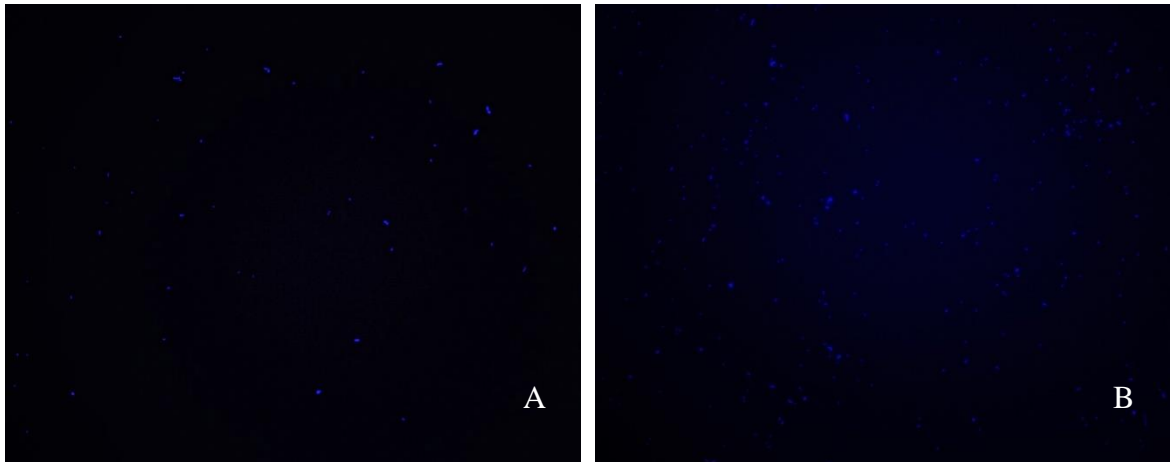
Pro zavedení FISH pro detekci *L. monocytogenes* byly využity poznatky z práce Oliveira *et al.* (2003), dále z diplomové práce Vodová (2013) jejíž postup se zakládá na pracích Amann (1995) a Beimfohr *et al.* (1993). Postup detekce použitý v naší práci vychází hlavně z práce Oliveira *et al.* (2003), neboť sonda pro hybridizaci byla převzata z této studie.

Po zavedení metody bylo nutné optimalizovat jednotlivé kroky FISH. Jednalo se o volbu vhodného hybridizačního pufru, promývacího pufru a fixačního roztoku, optimální dobu fixace, denzitu buněk a koncentraci použité sondy. Podstatným krokem bylo také zvolení vhodného způsobu pro permeabilizaci buněčné stěny. Posledním provedeným optimalizovaným krokem byla detekce *L. monocytogenes* ve směsi s *S. aureus*, *L. welshimeri*, *L. innocua* a *S. Typhimurium* v různých poměrech.

4.1.1 Denzita buněk

Při optimalizaci vhodné denzity buněk byly použity bakteriální kmeny *L. monocytogenes*, *L. welshimeri* a *S. aureus* a denzita buněk byla 10^8 , 10^7 a 10^6 CFU/ml. Po vyhodnocení těchto koncentrací, byla jako optimální koncentrace buněk určena denzita 10^8 CFU/ml. Při této koncentraci byly buňky rovnoměrně rozptýleny v nátěru a netvořily shluky. Při nižších koncentracích bylo přítomno málo buněk nebo zcela chyběly.

Při vyhodnocování výsledků byly pozorovány rozdíly v denzitě buněk mezi použitými bakteriálními kmeny. U drobnějších buněk rodu *Listeria* došlo u promývacích kroků k výrazně vyšším ztrátám, než u buněk *S. aureus*. Tento výsledek zobrazuje **Obrázek 8**. Na obrázku je patrný rozdíl v počtu buněk použitých kmenů i přes to, že primárně byla připravena u obou kmenů denzita 10^8 CFU/ml, která byla ověřena desítkovým ředěním. K těmto ztrátám došlo pravděpodobně při centrifugaci a následném odpipetování supernatantu.



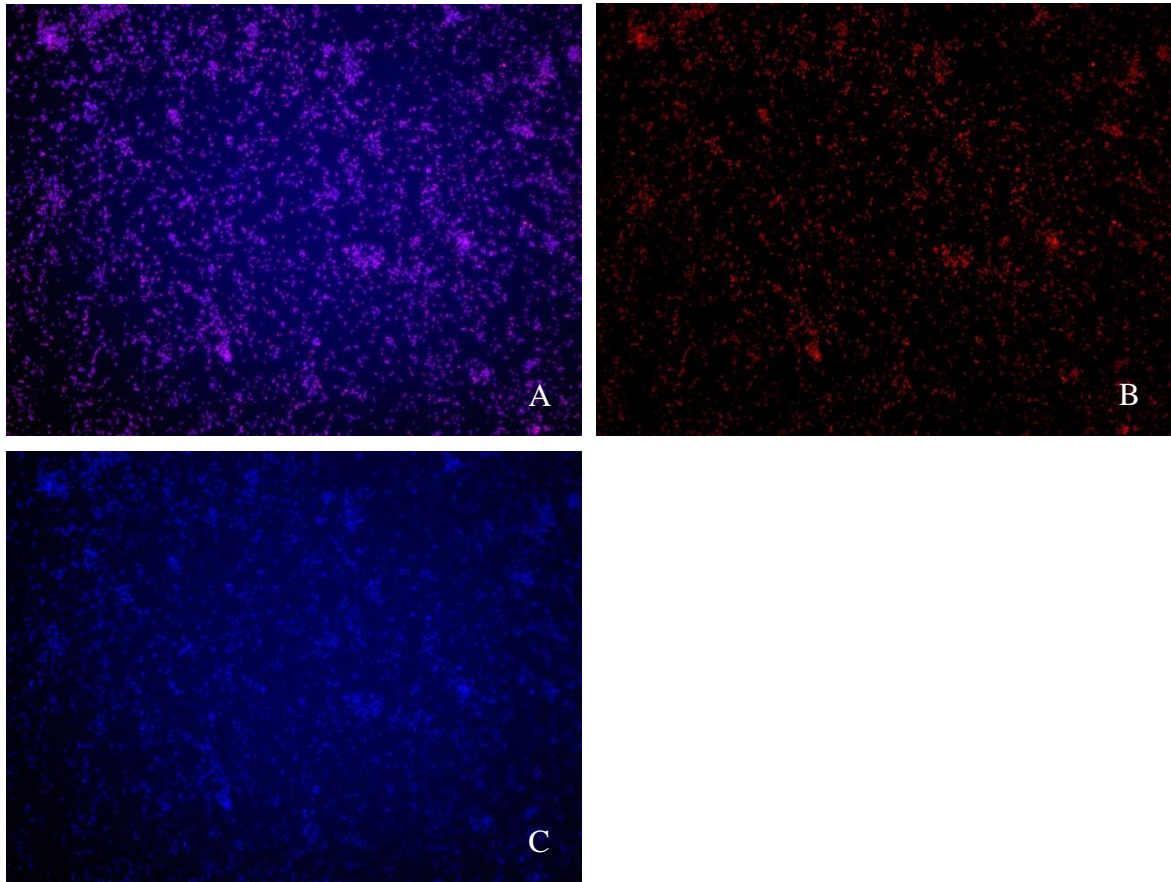
Obrázek 8 Rozdíly v počtu buněk *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* při použití stejné počáteční denzity 10^8 CFU/ml (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x, buňky obarveny DAPI barvivem)

A- *Listeria monocytogenes*; B- *Staphylococcus aureus*

4.1.2 Volba fixačního roztoku a doby fixace

V práci byly použity dva fixační roztoky. Prvním byl 2% formaldehyd převzatý z diplomové práce Vodová (2013) a druhým byl 4% paraformaldehyd použitý v práci Oliveira *et al.* (2003).

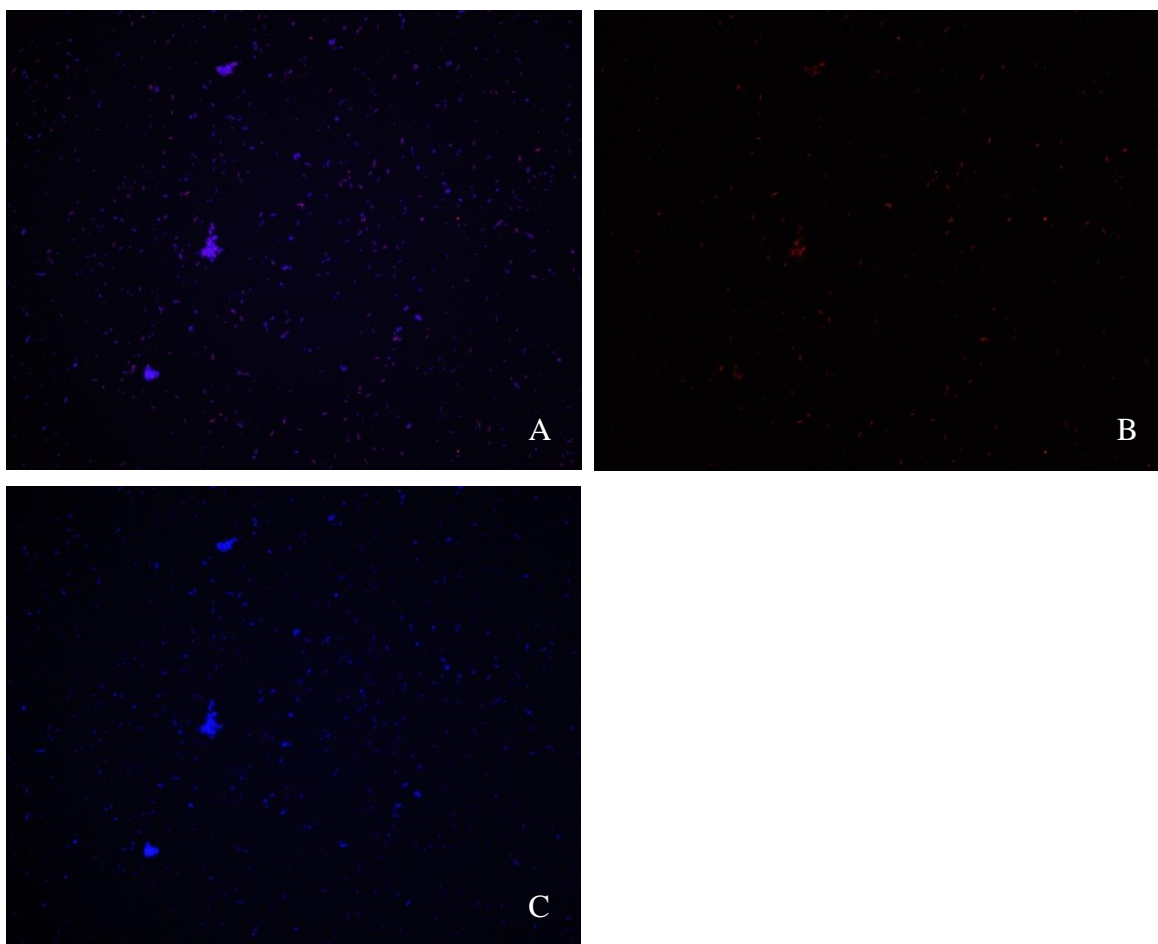
Při fixaci formaldehydem byly buňky suspendovány ve 2% formaldehydu a inkubovány 24 hodin při 4°C. Využití této fixace vedlo k silným nespecifickým vazbám sondy na kontrolní kmeny *E. coli*, *B. cereus* a *S. aureus*. Tuto nespecifitu vyskytující se u *E. coli* zobrazuje **Obrázek 9**. Na něm je patrná silná hybridizace, kterou vykazovaly všechny tři testované kmeny *E. coli* při tomto způsobu fixace. Z tohoto důvodu byla použita fixace dle Oliveira *et al.* (2003).



Obrázek 9 Nеспецифická hybridizace buněk *Escherichia coli* se sondou RL-2 po fixaci 2% formaldehydem při 4 °C 24 hodin, hybridizace při 45 °C 4 hodiny (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- překryv buněk obarvených DAPI a buněk s navázanou sondou; B- buňky s navázanou sondou; C- buňky obarvené DAPI

Dále byly buňky fixovány pomocí 4% paraformaldehydu. Pro fixaci byly zvoleny časy 20 minut při laboratorní teplotě dle práce Oliveira *et al.* (2003) a 1 hodina při laboratorní teplotě převzatá z práce Almeida *et al.* (2010). Při pokusu o fixaci po dobu 20 minut nebyla fixace dostatečná a hybridizace neproběhla. Proto byla provedena fixace po dobu jedné hodiny. Tato fixace venížší nespécifickým vazbám v porovnání s předchozí fixací. Výslednou hybridizaci zobrazuje **Obrázek 10**. Námi získané výsledky se neshodují se závěry práce Oliveira *et al.* (2003). V jejich případě postačovala fixace po dobu 20-ti minut, kdy autoři byli schopni dosáhnout úspěšné hybridizace.



Obrázek 10 Hybridizace buněk *Listeria monocytogenes* se sondou RL-2 po fixaci ve 4% paraformaldehydu při laboratorní teplotě 1 hodinu a permeabilizaci lysozymem 45 minut při laboratorní teplotě, hybridizace při 45 °C 4 hodiny (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- překryv buněk obarvených DAPI a buněk s navázanou sondou; B- buňky s navázanou sondou; C- buňky obarvené DAPI

Fixace buněk použitých v této práci byly prováděny v suspenzi. Další metodou fixace může být provedení na sklíčku. Při použití tohoto postupu by bylo možné zkrátit dobu fixace. Tento postup byl využitý v práci Machado *et al.* (2015) která se zaměřila na diagnostiku bakteriální vaginózy pomocí PNA-FISH. V tomto postupu byla použita fixace na sklíčku, kdy byla bakteriální suspenze nanášena do jamky a ponechána uschnout. Následně bylo celé sklíčko vloženo do 4% paraformaldehydu na 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přeneseno do 50% ethanolu, také na 10 minut při laboratorní teplotě. Po vyjmutí a oschnutí sklíčka mohla být provedena hybridizace.

Fixační krok není vázaný pouze na použití formaldehydu, či paraformaldehydu. V práci Moreno *et al.* (2011) se tým zaměřil na detekci *Listeria monocytogenes* v odpadních vodách. Pro fixaci buněk byl využit ethanol. 1 ml vzorku byl centrifugován a následně k němu byla přidána směs PBS s ethanolem v poměru 1:1. Tato suspenze byla následně skladována při -20 °C, dále bylo pokračováno v protokolu FISH.

Fuchizawa *et al.* (2008) využili ve své práci zaměřené na detekci *Listeria* spp., fixaci pomocí 50% ethanolu. Ke 200 µl suspenze buněk bylo přidáno 200 µl 99,5% ethanolu a celá směs byla inkubována 30 minut. Po inkubaci byly buňky promyty destilovanou vodou a opět resuspendovány ve sterilní destilované vodě.

4.1.3 Způsob permeabilizace buněčné membrány

Pro permeabilizaci buněčné membrány byly zvoleny dva postupy. Prvním bylo použití 70% a 96% ethanolu jak je uvedeno v publikaci Oliveira *et al.* (2013). Druhým způsobem bylo enzymatické natrávení pomocí lysozymu, jak uvádí diplomová práce Vodová (2013).

Při použití ethanolu, bylo sklíčko se vzorky postupně ponořeno do 70% a poté do 96% roztoku ethanolu a ponecháno vždy 2 minuty. Poté se nechalo oschnout v termostatu a následně byla provedena hybridizace. Práce Oliveira *et al.* (2013) uvádí tento způsob permeabilizace jako dostatečný. Tyto závěry se ovšem v naší práci nepotvrdily, neboť po provedení hybridizace nedošlo k navázání sondy. Z tohoto důvodu bylo využito permeabilizace pomocí lysozymu.

Pro grampozitivní bakterie byl použit roztok lysozymu o koncentraci 10 mg/ml. Do jamek bylo napipetováno 10 µl roztoku lysozymu a inkubováno 45 minut dle diplomové práce Vodová (2013). Díky tomuto postupu byla membrána dostatečně propustná a následná hybridizace byla úspěšná. Další modifikace nebyly provedeny pro vyhovující účinnost uvedeného postupu.

Stejnou koncentraci lysozymu použitou v naší práci využil i vědecký tým Rohde *et al.* (2016). Permeabilizace byla provedena v případě, že ve vzorku byly identifikovány grampozitivní bakterie. Permeabilizace byla provedena po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. S ohledem na tyto výsledky by bylo vhodné v následující studii vyzkoušet i permeabilizaci po dobu pěti minut.

Pro permeabilizaci nemusí být využíváno pouze lysozymu. Dalším využívaným enzymem je například lysostafin. V práci Gey *et al.* (2013), zabývající se identifikací patogenních bakterií v mléce, byly využity roztoky lysozymu nebo lysostafinu v závislosti na použitém bakteriálním

kmenu. Práce se zabývala detekcí *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* a *Trueperella pyogenes*. Koncentrace použitého lysozymu byla 1 mg/ml a lysostafinu 2 µg/ml. Inkubace byla provedena v závislosti na použité hybridizační sondě mezi 3 až 15 minutami ve vlhkostní komůrce při 37 °C.

Další možností je použití lysozymu a lysostafinu společně ve směsi. Tuto metodu využil tým autorů Poppert *et al.* (2010), zabývající se detekcí *Propionibacterium acnes*. Autoři prováděli permeabilizaci buněčné membrány pomocí roztoku obsahujícího lysozym o koncentraci 2 mg/ml a lysostafin o koncentraci 0,1 mg/ml. Inkubace probíhala 10 minut při 36 °C.

Z uvedených experimentů je patrné, že permeabilizace se provádí v závislosti na vybraném bakteriálním kmeni a není omezena pouze na postup popsany v této práci. Je možné změnit koncentraci lysozymu, využít i dalšího enzymu nebo provést permeabilizaci za zvýšené teploty. Uvedené postupy permeabilizace by bylo vhodné využít v navazující práci.

4.1.4 Volba vhodného hybridizačního pufru

První hybridizační pufr byl zvolen z práce Vodová (2013). Po provedení hybridizace nebylo možné pozorovat fluorescenci. Z tohoto důvodu byl zvolen hybridizační pufr uvedený v práci Oliveira *et al.* (2003).

Tento hybridizační pufr postrádá ve svém složení formamid a používá se následně i jako promývací pufr. Pufr má nižší viskozitu, díky čemuž nebylo možné dávkovat do jamek pufr a následně do vzniklé kapky napipetovat sondu. Z tohoto důvodu byla sonda naředěna předem napipetováním příslušného množství do mikrozkušavky společně s hybridizačním pufrem. Při použití tohoto hybridizačního pufru došlo k úspěšné hybridizaci sondy.

Složení hybridizačního pufru může být velice variabilní, jak vyplývá při porovnání složení pufru použitého v práci Oliveira *et al.* (2003) a Vodová (2013), který vychází z publikací Amann (1995) a Beimfohr *et al.* (1993). Hlavním rozdílem ve složení uvedených hybridizačních pufrů je v přítomnosti formamidu. Zatímco pufr použitý v práci Vodová (2013) obsahuje formamid, je tato látka z hybridizačního pufru dle Oliveira *et al.* (2003) vynechána.

Formamid je denaturační činidlo, které zvyšuje přístupnost rRNA, čímž snižuje potřebnou teplotu hybridizace. V práci Bottari *et al.* (2016) je uveden seznam sond společně s koncentrací formamidu použité v hybridizačním pufre. Tyto koncentrace se nejčastěji pohybují v rozmezí

20-35 %. Nicméně není výjimkou, že formamid je z hybridizačního pufru zcela vyloučen, protože je díky vlastnostem sondy, či zvýšené koncentraci solí nepotřebný.

4.1.5 Koncentrace sondy

Pro určení optimální koncentrace sondy se vycházelo z koncentrace základního oligonukleotidu, která byla 637,8 ng/μl a dále pak z použité koncentrace sondy uvedené v práci Oliveira *et al.* (2003), kde byla optimální koncentrace určena jako 5 ng/μl. Při optimalizacích byla sonda naředěna na koncentrace 63,78 ng/μl, 31,89 ng/μl, 15,945 ng/μl a 6,38 ng/μl.

První použitou koncentrací bylo 63,78 ng/μl. Při této koncentraci došlo k silným nespecifickým vazbám na kontrolní kmeny *L. ivanovii*, *S. aureus* i *E. coli*. Proto byla sonda naředěna na koncentraci 31,89 ng/μl. I přes naředění sondy nedošlo k odstranění nespecifických vazeb. Stejného výsledku bylo dosaženo při použití koncentrace 15,945 ng/μl. Z tohoto důvodu byla koncentrace sondy snížena až na 6,38 ng/μl. Při této koncentraci byly vyloučeny nespecifické vazby s kontrolními kmeny a síla signálu u *L. monocytogenes* byla zachována.

Sonda s označením RL-2 použitá v práci Oliveira *et al.* (2003) byla dále také použita v práci Weiler *et al.* (2013), kde byla použita k detekci *L. monocytogenes* v biofilmech vytvořených v čerstvém mléce. V této práci byla použita koncentrace sondy 25 ng/μl za stejných hybridizačních podmínek jako v práci Oliveira *et al.* (2003). Tato koncentrace mohla být použita pro zvýšení signálu v biofilmu, který může zhoršovat vazbu sondy na cílové místo.

V práci Fang *et al.* (2003) bylo použito dávkování 9 μl hybridizačního pufru a 1 μl sondy o koncentraci 8 μmol/l, což dává výslednou koncentraci v kapce 0,8 μmol/l DNA sondy. V práci Fuchizawa *et al.* (2008) byla použita sonda mRL-2 kdy bylo na sklíčko aplikováno 10 μl hybridizačního pufru s koncentrací sondy 1 μmol/l. Zde byla sonda naředěna hybridizačním pufrům již předem a na sklíčko byla dávkována výsledná směs.

4.1.6 Doba a teplota hybridizace

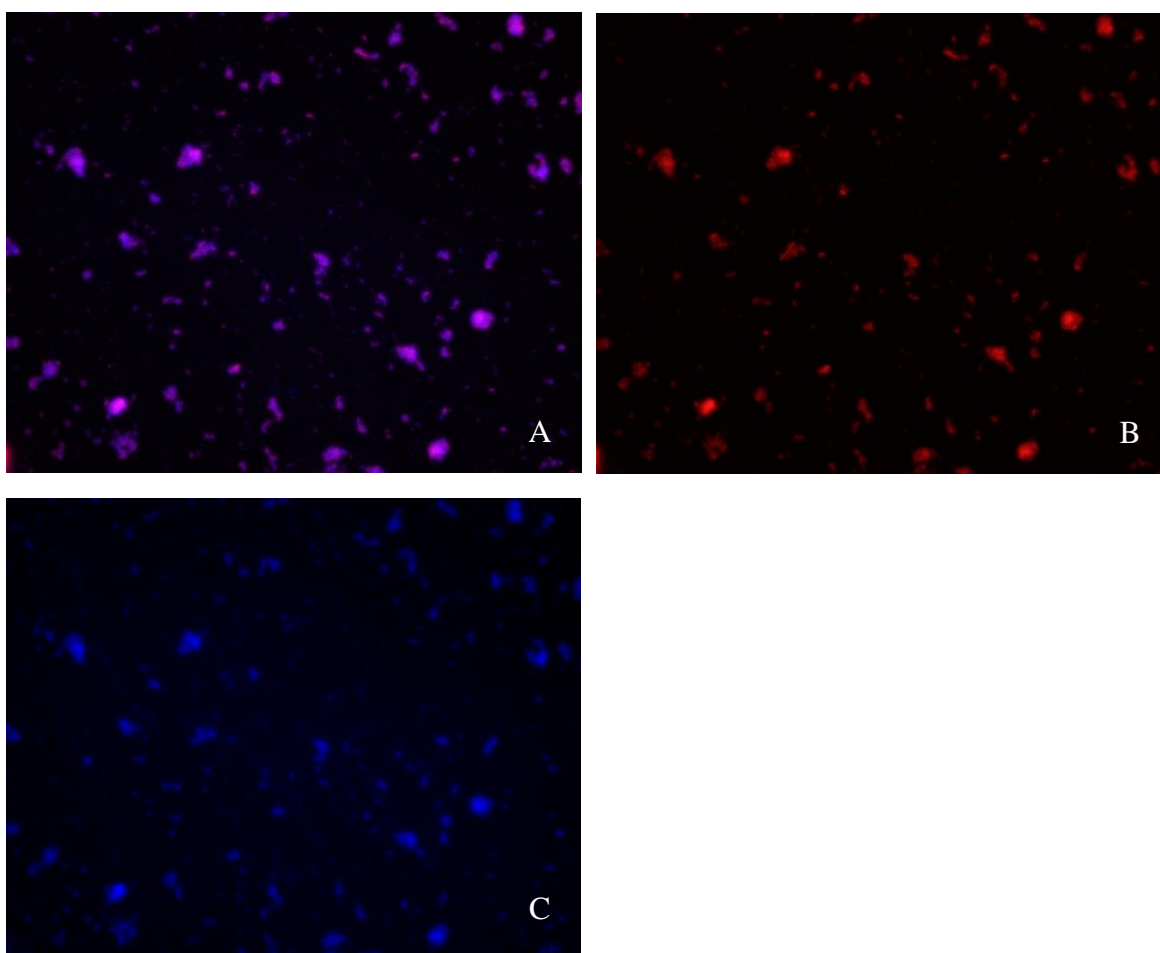
Z důvodu přetrvávající nespecifické vazby sondy na kontrolní kmeny, byla provedena optimalizace teploty a doby hybridizace. Při volbě vhodné teploty hybridizace se vychází z teploty tání sondy. Zvolená hybridizační teplota je nižší než teplota tání.

Publikace Oliveira *et al.* (2003) uvádí teplotu tání sondy RL-2 48 °C. Proto bylo pro optimalizaci zvoleno rozpětí teplot a doby hybridizace, které uvádí **Tabulka 7**.

Tabulka 7 Teploty a doba hybridizace sondy RL-2 použité pro optimalizaci metody

Teplota hybridizace (°C)	Doba hybridizace (hodiny)		
43	3	4	5
44	3	4	5
45	3	4	5
46	3	4	5
47	3	4	5

Z provedených optimalizací poskytovala nejlepší výsledek teplota 43 °C s časem 4 hodiny. Došlo ke specifické vazbě na *L. monocytogenes* bez křížové hybridizace na ostatní použité kmeny. Výslednou hybridizaci *L. monocytogenes* zobrazuje **Obrázek 11**. Tento výsledek se neshoduje s publikací Oliveira *et al.* (2003), kde byla pro hybridizaci zvolena teplota 45 °C.



Obrázek 11 Hybridizace buněk *Listeria monocytogenes* se sondou RL-2, hybridizace při 43 °C 4 hodiny (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- překryv buněk obarvených DAPI a buněk s navázanou sondou; B- buňky s navázanou sondou; C- buňky obarvené DAPI; celkové zvětšení 400x

Fuchizawa *et al.* (2008) taktéž prováděli detekci *L. monocytogenes* pomocí FISH. V tomto případě byla provedena hybridizace při 46 °C 1 hodinu. Práce Wang (2009) zaměřená na detekci *Staphylococcus* spp. pracuje s teplotou hybridizace 50 °C a časem hybridizace 90 minut.

Práce Wu *et al.* (2010) zabývající se detekcí *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) popisuje rozdílné podmínky hybridizace u těchto tří kmenů. Gramnegativní *E. coli* byla hybridizovaná při 48 °C 60 minut. Grampozitivní kmeny *S. aureus* a *E. faecalis* byly hybridizovány při teplotě 55 °C také 60 minut.

Z uvedených prací je patrné, že hybridizační teploty a časy se liší dle detekovaných bakterií a také podle použitých sond.

4.1.7 Doba promývání

Pro zlepšení vymytí nespecificky navázaných sond, které mohou způsobovat falešné výsledky, byl optimalizován čas promývání. Jako promývací roztok byl zvolen hybridizační pufr, použitý v práci Oliveira *et al.* (2003).

Promývací krok byl prováděn při teplotě 43 °C po dobu 15, 20 nebo 30 minut. Po vyjmutí sklíček z promývacího pufru byla sklíčka opláchnuta ve sterilní destilované vodě.

Po mikroskopickém vyhodnocení, nebyly v jednotlivých preparátech pozorovány žádné významné změny. Již po patnácti minutách došlo k vymytí nespecificky navázaných sond, v naší práci jsme jako optimální zvolili čas 20 minut. Promývací krok ovlivňuje spíše odstranění nehybridizovaných sond ze shluků bakterií, kde se mohou zadržovat.

Publikace Wang (2009) zabývající se detekci *Staphylococcus* spp. uvádí teplotu promývání 50 °C a čas 10 minut. Tato teplota se shoduje s teplotou použitou při hybridizaci. Obdobné podmínky uvádí i práce Rohde *et al.* (2016) kde bylo promývání prováděno při 52 °C 10 minut. I zde je teplota promývání shodná s teplotou hybridizace.

Frickmann *et al.* (2013) ve své práci, zabývající se detekci rodu *Salmonella*, uvádí teplotu promývání 46 °C po dobu 15 minut.

4.1.8 Specifičnost sondy RL-2

Pro zjištění specifičnosti sondy RL-2, která byla převzata z práce Oliveira *et al.* (2003), byly použity kmeny mikroorganismů z několika rodů, jak grampozitivních, tak gramnegativních a několik druhů z rodu *Listeria*. Použité kmeny a výsledky hybridizace uvádí **Tabulka 8.7**

Tabulka 8 Specifičnost sondy RL-2 s použitými mikrobiálními kmeny

Mikroorganismus	Výsledek
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Citrobacter brakii</i>	-
<i>Escherichia coli</i> CCM 2024	-
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	-
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	-
<i>Listeria innocua</i>	-
<i>Listeria ivanovii</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
<i>Listeria welshimeri</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-

Při prvním použití sondy došlo k nespecifickým hybridizacím se zástupci rodu *Listeria*, které se povedlo odstranit při změně hybridizačního pufru a fixačního roztoku.

K výrazné nespecifické hybridizaci docházelo u kmenů *E. coli*. Tyto nespecifické interakce byly odstraněny při optimalizaci teploty hybridizace na 43 °C. Určité nespecifické vazby se vyskytovaly i u dalších zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Stejně jako u *E. coli* byla tato nespecifičnost u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* odstraněna při změně hybridizační teploty. Námí zvolená hybridizační teplota se neshoduje s teplotou zvolenou autory sondy. V práci Oliveira *et al.* (2003) je uvedena jako optimální hybridizační teplota 45 °C.

Práce Oliveira *et al.* (2003) uvádí 100% specifitu při použití 58 referenčních kmenů a sérotypů. Dále bylo použito 17 sérotypů *L. monocytogenes*. Referenční kmeny, které autoři ve své práci použili, uvádí **Tabulka 9**. Žádný z použitých referenčních kmenů nevykazoval křížovou hybridizaci a 15 sérotypů *L. monocytogenes* poskytlo silný signál hybridizační sondy. Dva z použitých sérotypů *L. monocytogenes* vykazovali pozitivní výsledek s nižší intenzitou

fluorescence. Dle uveřejněné práce se kromě této nižší intenzity fluorescence, nevyskytly žádné problémy při zavedení sondy RL-2.

Tabulka 9 Referenční bakteriální kmeny použité v práci Oliveira *et al.* (2003)

Bakteriální kmen	Bakteriální kmen
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Salmonella</i> Anatum
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella</i> Derby
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> Dublin
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Salmonella</i> Heidelberg
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Salmonella</i> Infantis
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	<i>Salmonella</i> Newport
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Listeria grayi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Listeria innocua</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Morganella morganii</i>	

4.1.9 Detekce *Listeria monocytogenes* ve směsi bakterií

Pro detekci *L. monocytogenes* ve směsi byly zvoleny jako kontrolní bakterie *L. welshimeri*, *L. innocua*, *S. aureus* a *S. Typhimurium*. Z těchto kmenů byly vytvořeny směsi o různém poměru. Testované směsi bakterií uvádí **Tabulka 10** a **Tabulka 11**.

Tabulka 10 uvádí směsi buněk, které byly hybridizovány při 45 °C 4 hodiny. Tyto podmínky byly zvoleny dle publikace Oliveira *et al.* (2003). U takto provedené hybridizace došlo k dostatečnému rozlišení *L. monocytogenes* a kontrolních kmenů *L. welshimeri* a *S. aureus*. Tyto výsledky ovšem nebyly shodné s experimenty k potvrzení specifčnosti sondy. V těchto experimentech docházelo při použití těchto hybridizačních podmínek k nespecifickým vazbám na další použité kmeny.

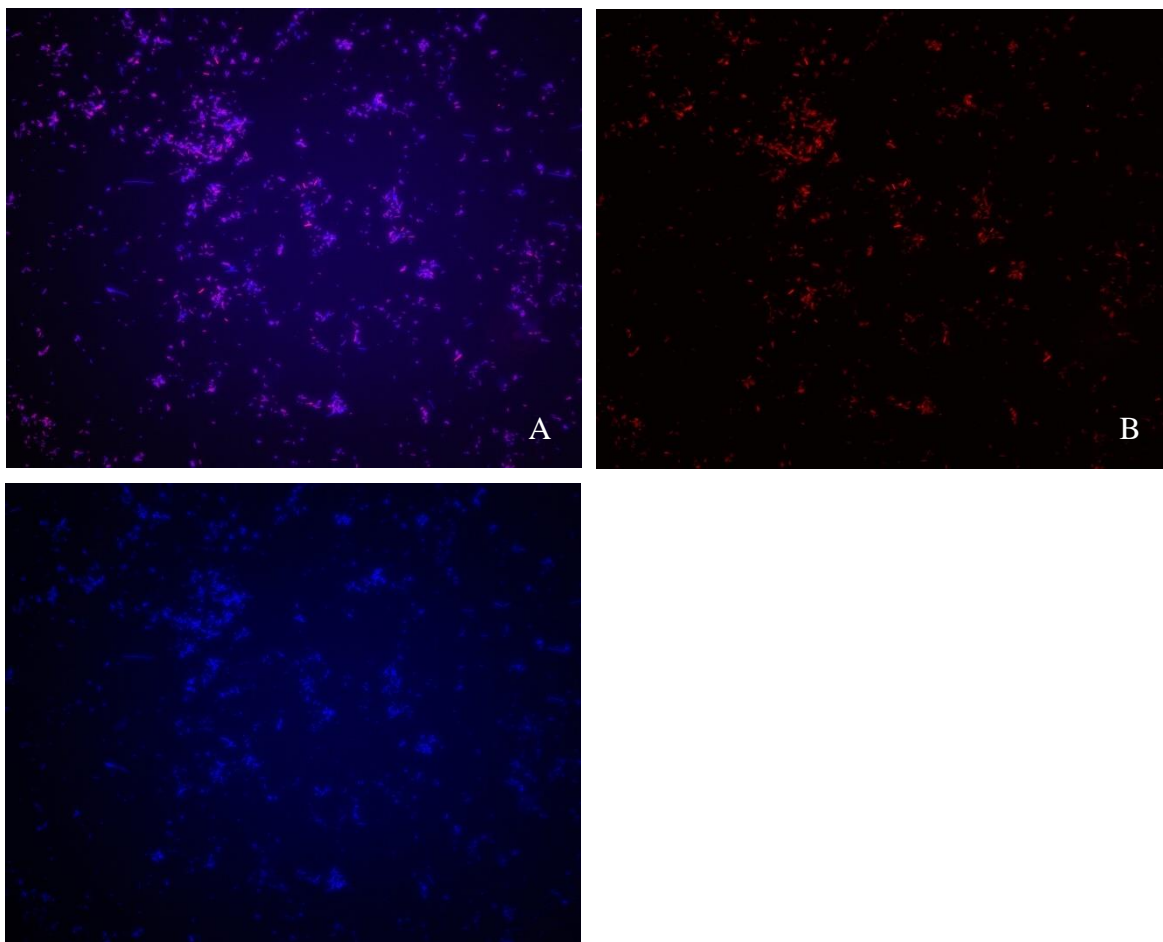
Z tohoto důvodu byla teplota hybridizace opět optimalizována. Po provedení experimentů a vyhodnocení výsledků byla jako optimální teplota hybridizace zvolena 43 °C a doba 4 hodiny. V případě použití této teploty vykazovaly všechny použité bakteriální kultury 100% specifitu. Proto bylo opět přistoupeno k detekci *L. monocytogenes* ve směsi. Vybrané kmeny použité v tomto experimentu uvádí **Tabulka 11**. Bohužel v tomto případě detekce směsi došlo k nespecifickým vazbám na *L. innocua* i *S. Typhimurium*. Tyto výsledky mohou poukazovat na rozdílnou afinitu sondy při použití s čistými kulturami a při použití na směs bakteriálních kmenů. Z tohoto důvodu by bylo vhodné v navazující studii provést další optimalizaci hybridizačních podmínek, při použití FISH pro detekci *L. monocytogenes* ve směsi bakterií.

Tabulka 10 Směsi bakterií s *Listeria monocytogenes* 1- hybridizace provedena při 45 °C 4 hodiny

Jamka	Směs v jamce	Poměr
1	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. welshimeri</i>	1:1
2	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. welshimeri</i>	2:1
3	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. welshimeri</i>	1:2
4	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. welshimeri</i> : <i>S. aureus</i>	2:1:1
5	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. welshimeri</i> : <i>S. aureus</i>	1:1:1
6	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. aureus</i>	1:1
7	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. aureus</i>	2:1
8	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. aureus</i>	1:2

Tabulka 11 Směsi bakterií s *Listeria monocytogenes* 2- hybridizace provedena při 43 °C 4 hodiny

Jamka	Směs v jamce	Poměr
1	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. innocua</i>	1:1
2	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. innocua</i>	1:2
3	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. innocua</i>	1:3
4	<i>L. monocytogenes</i> : <i>L. innocua</i>	2:1
5	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. Typhimurium</i>	1:1
6	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. Typhimurium</i>	1:2
7	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. Typhimurium</i>	1:3
8	<i>L. monocytogenes</i> : <i>S. Typhimurium</i>	2:1



Obrázek 12 Hybridizace směsi *Listeria monocytogenes* a *Listeria welshimeri* se sondou RL-2 v poměru 2:1, hybridizace při 45 °C 4 hodiny (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- překryv buněk obarvených DAPI a buněk s navázanou sondou; B- buňky s navázanou sondou; C- buňky obarvené DAPI

4.2 Zavedení PNA-FISH pro detekci rodu *Salmonella*

Dalším cílem této diplomové práce bylo zavedení metody PNA-FISH pro detekci *Salmonella* spp. na základě publikace Almeida *et al.* (2010). Bohužel ani při 100% dodržení postupu popsaného v uvedené publikaci, ani po zavedení několika modifikací, které jsou popsány níže, nebyla metoda PNA-FISH schopna detekovat námi vybrané kmeny *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis*, neboť nedošlo k hybridizaci s PNA sondou.

4.2.1 Volba fixačního roztoku a doby fixace

Jako první způsob fixace byl použita postup dle Almeida *et al.* (2010), kde bylo využito 4% roztoku paraformaldehydu a fixace byla provedena po dobu 1 hodiny s následnou fixací v 50% ethanolu 30 minut. Po provedení hybridizace nebylo možné pozorovat fluorescenci buněk. Z tohoto důvodu byla zvolena fixace v 2% formaldehydu dle práce Vodová (2013).

Bakteriální suspenze byla fixována ve 2% formaldehydu 24 hodin při teplotě 4 °C. Bohužel ani po provedení dalšího způsobu fixace nedošlo k navázání sondy.

Uvedené způsoby fixace byly dostačující pro navázání DAPI barviva, což značí, že fixace proběhla. Tým autorů Almeida *et al.* (2010) ve své práci neuvádí žádné problémy při fixaci pomocí 4% paraformaldehydu.

V práci Perry-O'Keefe *et al.* (2001) zameřené na použití PNA-FISH pro detekci *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* a *Salmonella* spp. byla využita fixace pomocí 4% paraformaldehydu a 50% ethanolu. V tomto hybridizačním protokolu byly použity stejné fixační podmínky jako v práci Almeida *et al.* (2010). Výsledky autorů ukazují, že fixační postup je dostačující.

Tým autorů Almeida *et al.* (2013) popisuje také fixaci přímo na sklíčku. V tomto případě je bakteriální suspenze aplikována na sklíčko a po uschnutí je sklíčko postupně ponořeno do roztoku 4% paraformaldehydu a 50% ethanolu vždy na 10 minut.

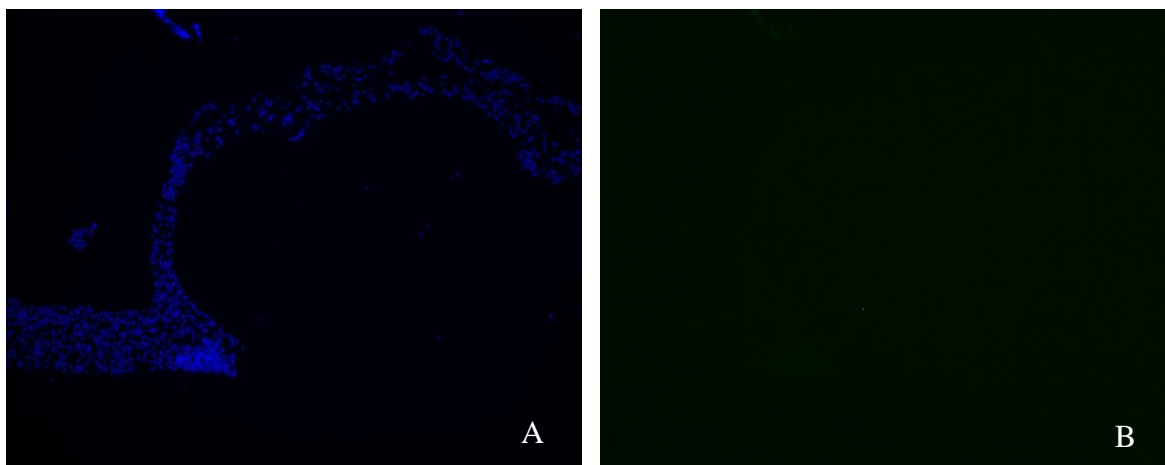
Vědecký tým Lehtola *et al.* (2005) zabývající se detekcí *Campylobacter* spp. využil pro fixaci roztok ethanolu. Bakteriální suspenze byla nanášena na sklíčko a usušena. Následně bylo sklíčko ponořeno do 90% ethanolu na 10 minut.

Z uvedených prací a práce Almeida *et al.* (2010) je patrné, že námi použité způsoby fixace jsou více než dostačující. Proto bylo při optimalizaci postoupeno k permeabilizaci buněčné membrány pro zlepšení prostupu hybridizační sondy.

4.2.2 Způsob permeabilizace buněčné membrány

Po neúspěšné hybridizaci i přes změnu způsobu fixace, bylo do postupu zahrnuto i enzymatické natrávení buněčné membrány, pro usnadnění vstupu PNA sondy.

Po provedení fixace, jak 2% formaldehydem, tak 4% paraformaldehydem, bylo do jamek podložního skla aplikováno 10 μ l lysozymu (10 mg/ml) a ponecháno inkubovat 45 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo sklíčko postupně opláchnuto v 50%, 80% a 96% ethanolu. Následně byla provedena hybridizace při 57 °C po dobu 30, 60 či 90 minut. Při vizualizaci pod fluorescenčním mikroskopem nebyla opět pozorována hybridizace buněk u žádného z provedených časů, přičemž čas 90 minut je trojnásobný oproti času použitému v práci Almeida *et al.* (2010). Výsledek po provedení 30 minutové hybridizace zobrazuje **Obrázek 13**. Tento výsledek potvrzuje, že neschopnost hybridizace není způsobena fixací ani nedostatečnou permeabilizací buněčné membrány.



Obrázek 13 Hybridizované buňky *Salmonella* Typhimurium se sondou SalPNA1873 po fixaci ve 4% paraformaldehydu a po permeabilizaci lysozymem, hybridizace při 57 °C 30 minut (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- buňky obarvené DAPI; B- buňky hybridizované sondou SalPNA1873

Publikace Perry-O'Keefe *et al.* (2001) hovoří o PNA sondách a jejich schopnosti hybridizovat buňky bez jejich permeabilizace. Tato vlastnost je dána jejich nenabitou strukturou a malou velikostí.

Tyto závěry vedou k tomu, že permeabilizace pomocí lysozymu, není u gramnegativních bakterií nutná. Z tohoto důvodu byla provedena změna hybridizačních podmínek.

4.2.3 Doba a teplota hybridizace

Dalším optimalizovaným krokem byla doba a teplota hybridizace. Pokud není hybridizace dostatečně dlouhá, nemusí dojít k navázání sondy na cílovou sekvenci. Stejně tak může hybridizaci ovlivňovat i teplota.

Při optimalizaci byl proveden rozsah teplot 53-59 °C a u každé použité teploty byly provedeny tři hybridizační časy 30, 60 a 90 minut. Žádný z uvedených hybridizačních časů a teplot nevedl k navázání sondy. U všech uvedených teplot došlo k úspěšnému navázání DAPI barviva.

Práce Almeida *et al.* (2010) ze které byla převzata sonda a hybridizační podmínky hovoří o optimální hybridizaci při 57 °C po dobu 30 minut. Při provedených experimentech ovšem nedošlo k hybridizaci při žádné z provedených teplot ani při 90-ti minutové hybridizaci. Čas 90 minut je nadstandardní oproti jiným pracím používajících PNA sondy.

Podmínky použité týmem Perry-O'Keefe *et al.* (2001) uvádí hybridizační čas 30 minut s teplotou 55 °C. Obdobné podmínky lze vidět i v práci Almeida *et al.* (2009), kde byly provedeny optimalizace s časy 30, 45, 60 a 90 minut při 57 °C. I zde byl vybrán čas 30 minut jako optimální jak při hybridizaci na sklíčku, tak v suspenzi.

Tým Zhang *et al.* (2015) zabývající se detekcí *Vibrio* spp. optimalizovali své hybridizační podmínky v rozmezí 52-58 °C s časem 15-90 minut. Jako optimální podmínky po provedených experimentech uvedli teplotu 55 °C s časem hybridizace 45 minut.

Z těchto uvedených prací a z vlastních experimentů lze usuzovat, že neúspěšná hybridizace nebyla způsobena nevhodnou hybridizační teplotou, ani časem.

4.2.4 Koncentrace sondy

Optimalizaci byla podrobena i vhodná koncentrace sondy. Při optimalizaci byly použity koncentrace sondy 200, 400 a 800 nM.

Při provádění jednotlivých optimalizací byly postupně zvyšovány koncentrace sondy, pro zlepšení jejich hybridizace na cílové místo. Žádná z uvedených koncentrací nevedla k hybridizaci. Práce Almeida *et al.* (2010) uvádí koncentraci sondy 200 nM. Stejná koncentrace se vyskytuje i u jiných prací využívajících PNA sondy. V našem případě nedošlo k hybridizaci ani při čtyřnásobné koncentraci sondy oproti publikované práci Almeida *et al.* (2010).

Práce Lehtola *et al.* (2005) zabývající se detekcí *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Campylobacter lari* uvádí použití PNA-FISH. Použitý hybridizační pufr měl stejné složení a koncentraci, jako pufr použitý v práci Almeida *et al.* (2010), s koncentrací sondy také 200 nM. Do jamek bylo nakapáno 25 μ l hybridizačního pufru a podložní sklíčko bylo překryto krycím sklem. Následná hybridizace probíhala při 50 °C 90 minut.

Další prací, kde byly použity PNA sondy je práce autorů Perry-O'Keefe *et al.* (2001). Zde byly navrhnuty PNA sondy specifické pro *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *Salmonella* spp.. Dále pak eubakteriální sonda. V této práci probíhala hybridizace v suspenzi. Buňky byly fixovány ve 4% paraformaldehydu a poté v 50% ethanolu. Z této suspenze bylo poté odebráno 100 μ l, které byly centrifugovány. Sediment byl posléze resuspendován ve 100 μ l hybridizačního pufru. Tento pufr měl odlišné složení, než pufr použitý v práci Almeida *et al.* (2010) a Lehtola *et al.* (2005). Obsahoval 25 mM Tris-HCl o pH 9,0, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS a koncentrace sondy se v závislosti na použité variantě pohybovala mezi 50-300 nM. Hybridizace probíhala při 55 °C 30 minut.

Práce týmu Rocha *et al.* (2016) hovoří o vlivu koncentrace sondy, dextran sulfátu a pH v hybridizačním pufru, na hybridizaci PNA sond. Popisují rozdílnou dynamiku průniku sondy do buňky v závislosti na složení buněčné stěny, což je rozdílné u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Prostup sondy do buňky lze rozdělit do tří částí. První je difuze v hybridizačním roztoku, druhým je difuze přes membránu buňky a třetím je difuze v cytoplasmě buňky. Při hybridizaci grampozitivních bakterií je limitním krokem průnik sondy přes buněčnou membránu. Tento krok je ztížen množstvím peptidoglykanu v buněčné membráně. Tyto problémy lze vyřešit zvýšením koncentrace sondy. Stejně tak zvýšením viskozity hybridizačního pufru pomocí dextran sulfátu. Ten v hybridizačním pufru zvyšuje viskozitu, čímž zvyšuje zdánlivou koncentraci fluorescenční sondy. Na závěr je uvedeno, že

v práci byla použita koncentrace sondy 300 nM. Přičemž autoři tuto hodnotu uvádí jako vysokou.

Z těchto dat lze usuzovat, že pro úspěšnou hybridizaci gramnegativních buněk rodu *Salmonella* by nemělo být zapotřebí zvyšovat koncentraci sondy z 200 nM až na 800 nM, která byla použita na závěr v našich experimentech. Proto lze říci, že neúspěch v hybridizaci nebyl způsoben koncentrací sondy.

5 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala zavedením a optimalizací metody FISH pro detekci *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* spp. pomocí oligonukleotidových sond navržených v pracích Oliveira *et al.* (2003) a Almeida *et al.* (2010).

Zavedení FISH pro detekci *L. monocytogenes* bylo provedeno na základě práce Oliveira *et al.* (2003). Po optimalizaci metody bylo dosaženo úspěšné detekce *L. monocytogenes*. Optimální denzita buněk pro detekci byla 10^8 CFU/ml. Při této koncentraci buňky netvoří shluky a jsou rovnoměrně rozptýleny. Jako vhodný způsob fixace byla stanovena fixace 4% roztokem paraformaldehydu po dobu jedné hodiny. Dále byl optimalizován způsob permeabilizace buněčné membrány pomocí lysozymu o koncentraci 10 mg/ml po dobu 45 minut. Hybridizace probíhala při teplotě 43 °C po dobu 4 hodin s koncentrací hybridizační sondy 6,378 ng/μl. Oplach nenavázaných sond byl proveden po dobu 20 minut při 43 °C. Optimalizovaný protokol použitý v této práci, není shodný s protokolem použitým v práci Oliveira *et al.* (2003) ve které byla námi použitá sonda poprvé navržena. Protokol, který autoři popisují ve své práci se ukázal pro naši detekci jako nedostatečný, a proto byly v některých jeho částech provedeny změny. Námi navržený protokol se zakládá na pracích Oliveira *et al.* (2003), Vodová (2013) a Almeida *et al.* (2010). I přes úspěšné zavedení metody FISH bude na tuto práci navazovat další studie, která bude mít za úkol zkrátit celkovou dobu experimentu a zabránit nespecifím vazbám při detekci *L. monocytogenes* ve směsi s jinými kmeny bakterií.

Zavedení PNA-FISH pro detekci *Salmonella* spp., bylo provedeno na základě postupu popsaného v práci Almeida *et al.* (2010). I přes modifikace popsané výše v práci, nebylo dosaženo úspěšné hybridizace. Vzhledem k těmto popsaným modifikacím lze usuzovat, že neschopnost provést hybridizaci nebyla způsobena nevhodnou fixací, nedostatečným časem hybridizace ani nízkou koncentrací sondy. Metodu je nutné dále optimalizovat, neboť jsou dostupné úspěšné studie využívající podobné podmínky.

I přes neúspěšnou detekci *Salmonella* spp. která nepotvrzuje závěry autorů Almeida *et al.* (2010), kteří navrhli použitou sondu, hodnotím metodu FISH jako perspektivní metodu pro detekci patogenních mikroorganismů. Tato metoda je schopna dosáhnout stejných výsledků jako běžně používané kultivační metody, pokud je před hybridizací zařazen pomnožovací krok. Díky tomu lze získat výsledky do 48 hodin. Dalšími optimalizacemi by mohlo být využití FISH při detekci mikroorganismů v přítomnosti potravinové matrice.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alberts, A., D. Bray, A. Jonson, J. Lewis, M. Raff and K. Roberts, P. Walter.** (1998) *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero publishing. ISBN 80-902906-0-4.
- Almeida, C., J. M. Sousa, R. Rocha, L. Cerqueira, S. Fanning, N. F. Azevedo and M. J. Vieira.** (2013) 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*. **79** (20), 6293–6300.
- Almeida, C., N. F. Azevedo, C. Iversen, S. Fanning, C. W. Keevil and M. J. Vieira.** (2009) Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* genomospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. *Applied and environmental microbiology*. **75** (9), 2925-2930.
- Almeida, C., N. F. Azevedo, R. M. Fernandes, C. W. Keevil and M. J. Viera.** (2010) Fluorescence *in situ* hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Applied and environmental microbiology*. **76** (13), 476–4485.
- Amann, R.** (1995) *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular microbial ecology manual*. 331-345.
- Azevedo, N. F., C. Almeida, L. Cerqueira and M. J. Vieira.** (2013). Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. *International journal of food microbiology*. **161**, 16-22.
- Baudart, J. and P. Lebaron.** (2010) Rapid detection of *Escherichia coli* in waters using fluorescent *in situ* hybridization, direct viable counting and solid phase cytometry. *Journal of applied microbiology*. **109**, 1253-1264.
- Bauman, J. G. J., J. Wiegant, P. Borst and P. van Duijn.** (1980) A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Experimental cell research*. **128** (2) 485-490.

- Behnam, F., A. Vilcinskas, M. Wagner and K. Stoeckerb.** (2012) 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*. **78** (15), 5138-5142.
- Beimfohr, C., A. Krause, R. Amann, W. Ludwig, K. Schleifer.** *In situ* Identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *Systematic and applied microbiology*. **16** (3), 450-456.
- Bell, R. L., K. G. Jarvis, A. R. Ottesen, M. A. McFarland and E. W. Brown.** (2016) Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microbial biotechnology*. **9**, 279-292.
- Bohnert, J., B. Hübner and K. Botzenhart.** (2000) Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *International journal of hygiene and environmental health*. **203**, 77-82.
- Bottari, B., A. Mancini, D. Ercolini, M. Gatti and E. Neviani.** (2016) FISHing for food microorganisms. *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. 511-530.
- Dias and Rathnayaka.** (2018) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in food pathogen detection. *International journal of molecular biology*, **3** (3), 141-147.
- Fang, Q., S. Brockmann, K. Botzenhart and A. Wiedenmann.** (2003) Improved detection of *Salmonella* spp. in foods by fluorescent *in situ* hybridization with 23S rRNA probes: A comparison with conventional culture methods. *Journal of food protection*. **66** (5), 723-731.
- Frickmann, H., A. Hänle, A. Essig, D. Dekker, K. Boahen, S. Acquah, N. Sarpong, Y. Adu-Sarkodie, N. G. Schwarz, J. May, F. Marks, R. M. Hagen and S. Poppert.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for rapid identification of *Salmonella* spp. from agar and blood culture broth—An option for the tropics? *International journal of medical microbiology*. **303**, 277-284.
- Fuchizawa, I., S. Shimizu, Y. Kawai and K. Yamazaki.** (2008) Specific detection and quantitative enumeration of *Listeria* spp. using fluorescent *in situ* hybridization in combination with filter cultivation (FISHFC). *Journal of applied microbiology*. **105**, 502-509.
- Gall, J. G. and M. L. Pardue.** (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the national academy of sciences*. **63**, 378-383.

- Gasnov, U., D. Hughes and P. M. Hansbro.** (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology reviews*. **29**, 851-875.
- Gey, A., C. Werckenthin, S. Poppert and R. K. Straubinger.** (2013) Identification of pathogens in mastitis milk samples with fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. **25** (3), 386-394.
- Görner, F. and E. Valík.** (2004) *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum. ISBN 80-967064-9-7.
- Grimont, P. A. D. and F. X. Weill.** (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*. 9th edition.
- Guimarães, N., N. F. Azevedo, C. Figueiredo, C. W. Keevil and M. J. Vieira.** (2007) Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Journal of clinical microbiology*. **45** (9), 3089-3094.
- Jadhav, S., M. Bhave and E. A. Palombo.** (2012) Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of microbiological methods*. **88**, 327-341.
- Jansen, G.J., M. Mooibroek, J. Idema, H. J. Harmsen, G. W. Welling and J. E. Degener.** (2000) Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Journal of clinical microbiology*. **38**, 814-817.
- Kaakoush, N. O., N. Castaño-Rodríguez, H. M. Mitchell and S. M. Man.** (2015) Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical microbiology reviews*. **28** (3) 687-720.
- Kempf, V.A., K. Trebesius and I.B. Autenrieth.** (2000) Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. **38**, 830-838.
- Křížková, V., M. Korabečná, J. Kočová and Z. Tonar.** (2003) Princip a příklady využití demonstované varianty *in situ* hybridizace. In: *Univerzita Karlova* [online]. Plzeň: Ústav histologie a embryologie LF v Plzni, [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: http://web.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ish_low_res.pdf.

- Lehtola, M. J., C. J. Loades and C. W. Keevil.** (2005) Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *Journal of microbiological methods*. **62**, 211-219.
- Levsky, J. M. and R. H. Singer.** (2003) Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *Journal of cell science*. **116** (14), 2833-2838.
- Lo Piccolo, S., V. Ferraro, A. Alfonzo, L. Settanni, D. Ercolini, S. Burrano and G. Moschetti.** (2010) Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Annals of microbiology*. **60**, 161-167.
- Machado, A., J. Castro, T. Cereija, C. Almeida and N. Cerca.** (2015) Diagnosis of bacterial vaginosis by a new multiplex peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization method. *The journal of life and environmental sciences*. **3**, 1-12.
- Moreno, Y., L. Ballesteros, J. García-Hernández, P. Santiago, A. González and M. A. Ferrús.** (2011) Specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in spanish wastewater treatment plants by fluorescent *in situ* hybridization and PCR. *Water research*. **45** (15), 4634-4640.
- Moter, A. and U. B. Göbel.** (2000) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods*. **41**, 85-112.
- Navarro, E., G. Serrano-Heras, M. J. Castaño and J. Solera.** (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*. **439**, 231-250.
- Oliveira, M., G. Andrade, M. Guerra and F. Bernardo.** (2003) Development of a fluorescent *in situ* hybridization protocol for the rapid detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. **98** (547) 119-124.
- Orsi, R. H. and M. Wiedmann.** (2016) Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied microbiology and biotechnology*. **100**, 5273-5287.
- Pernthaler, J. F., O. Glöckner, W. Schönhuber and R. Amann.** (2001) Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in microbiology*. **30**, 207-210.

- Pernthaler, A., J. Pernthaler and Rudolf Amann.** (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and environmental microbiology*. **68** (6), 3094-3101.
- Perry-O'Keefe, H., S. Rigby, K. Oliveira, D. Sørensen, H. Stender, J. Coull a J.J. Hyldig-Nielsen.** (2001) Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *Journal of microbiological methods*. **47**, 281-292.
- Peutherer, J. F., R. C. B. Slack and D. Greenwood.** (1999) *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada. ISBN 80-7169-365-0.
- Pitkänen, T.** (2013). Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *Journal of microbiological methods*. **95**, 39-47.
- Poppert, S., M. Riecker and A. Essig.** (2010) Rapid identification of *Propionibacterium acnes* from blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. **66**, 214-216.
- Price, C. M.** (1993) Fluorescence *in situ* hybridization. *Blood reviews*. **7** (2), 127-134.
- Raap, A. K.** (1998) Advances in fluorescence *in situ* hybridization. *Mutation research*. **400** (1-2), 287-298.
- Rohde, A., J. A. Hammerl and S. Al Dahouk.** (2016) Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence *in situ* hybridization. *Food Control*. **69**, 297-305.
- Rohde, A., J. A. Hammerl, B. Appel, R. Dieckmann and S. Al Dahouk.** (2015) FISHing for bacteria in food-A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria?. *Food microbiology*. **46**, 395-407.
- Rocha, R., C. Almeida and N. F. Azevedo.** (2018) Influence of the fixation/permeabilization step on peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria. *Public library of science one*. **13** (5), 1-13.
- Rocha, R., J. M. Sousa, L. Cerqueira, M. J. Vieira, C. Almeida and N. F. Azevedo.** (2019) Development and application of peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization for the specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology*. **80**, 1-8.

- Rocha, R., R. S. Santos, P. Madureira, C. Almeida and N. F. Azevedo.** (2016) Optimization of peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria: The effect of pH, dextran sulfate and probe concentration. *Journal of biotechnology*. **226**, 1-7.
- Sedláček, I.** (2007) *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-4207-9.
- Schindler, J.** (2010) *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- Schmid, M., M. Walcher, A. Bubert, M. Wagner, M. Wagner and K.-H. Schleifer.** (2003) Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*. *Immunology and medical microbiology*. **35**, 215-225.
- Schweickert, B., A. Moter, M. Lefmann and U. B. Göbel.** (2004) 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*. **112** (11-12), 856-885.
- Silahtaroglu, A., H. Pfundheller, A. Koshkin, N. Tommerup and S. Kauppinen.** (2004) LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenetic and genome research*. **107**, 32-72.
- Šilhová, L.** (2016) *Problematika tvorby, detekce a ovlivňování bakteriálních biofilmů*. Disertační práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Jarmila Vyřasová, CSc.
- Tompkin, R. B.** (2002) Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of food protection*. **65** (4), 709-725.
- Välimaa, A.-L., A. Tilsala-Timisjärvi and E. Virtanen.** (2015) Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain-A review. *Food control*. **55**, 103-114.
- Vodová, S.** (2013) *Zavedení nových metod pro detekci biofilmu*. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Petra Mořková, Ph.D.
- Votava, M. a kol.** (2003) *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.

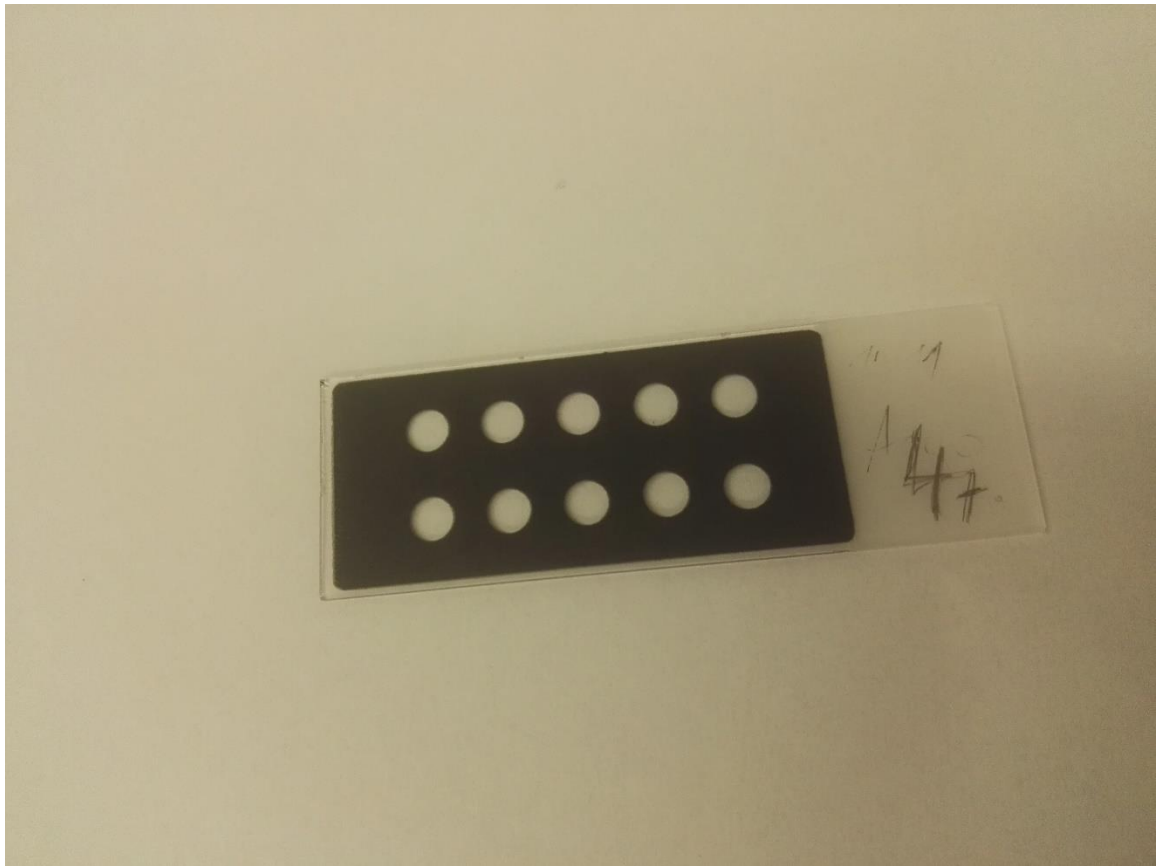
- Wagner, M. and S. Haider.** (2012) New trends in fluorescence *in situ* hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current opinion in biotechnology.* **23**, 96-102.
- Wang, P.** (2010) Simultaneous detection and differentiation of *Staphylococcus* species in blood cultures using fluorescence *in situ* hybridization. *Medical principles and practice.* **19**, 218-221.
- Weiler, Ch., A. Ifland, A. Naumann, S. Kleta and M. Noll.** (2013) Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *International journal of food microbiology.* 161 (2), 61-68.
- Wu, Q., Y. Li, M. Wang, X. P. Pan and Y. F. Tang.** (2010) Fluorescence *in situ* hybridization rapidly detects three different pathogenic bacteria in urinary tract infection samples. *Journal of microbiological methods.* **83**, 175-178.
- Zhang, X., K. Li, S. Wu, J. Shuai and W. Fang.** (2015) Peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization for identification of *Vibrio* spp. in aquatic products and environments. *International journal of food microbiology.* **206**, 39-44.
- Zhao, X., Chii-Wann Lin, J. Wang and D. Hwan Oh.** (2014) Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of microbiology and biotechnology.* **24** (3), 297-312.
- Zwirgmaier, K..** (2005) Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) – the next generation. *FEMS Microbiology letters.* **246**, 151-158.

7 PŘÍLOHY

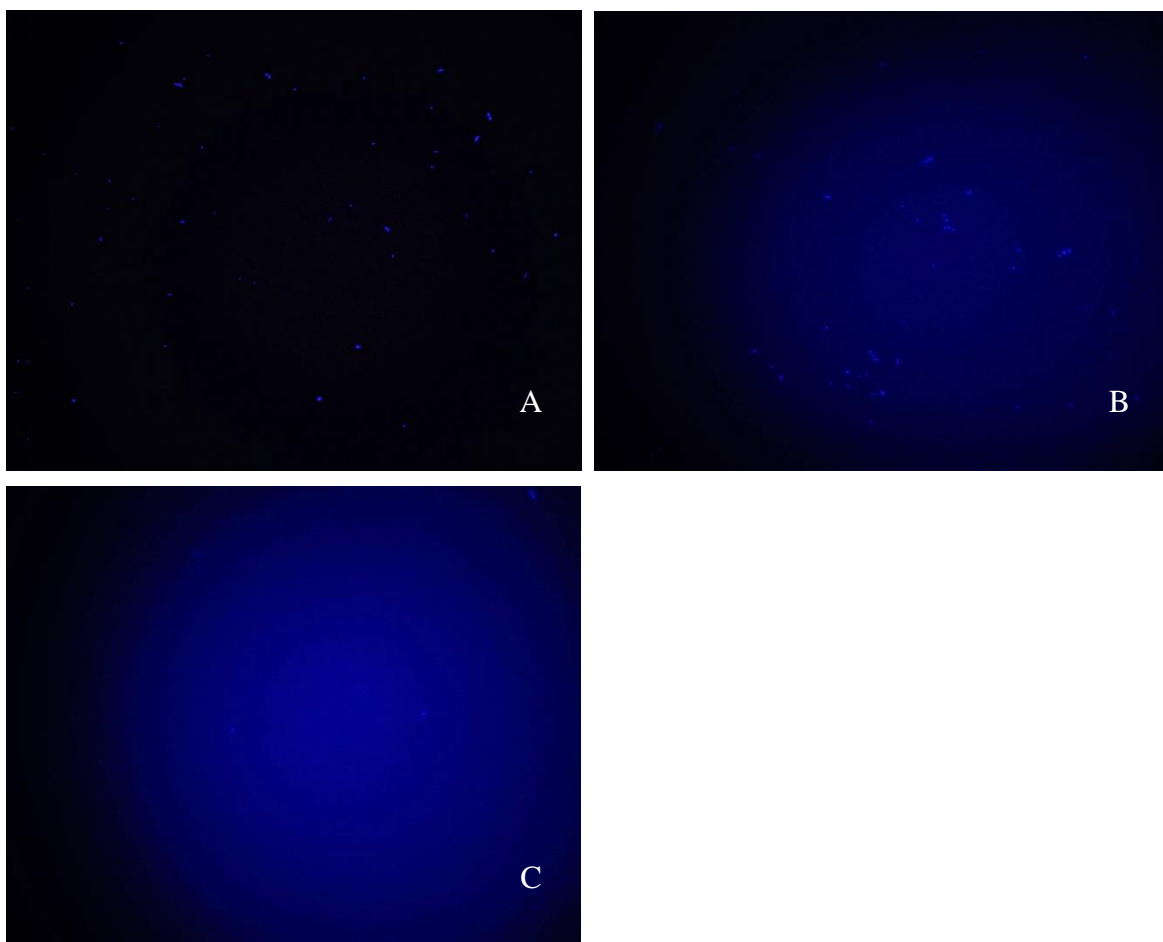
Příloha 1 Epifluorescenční mikroskop Nikon ECLIPSE 80i.....	84
Příloha 2 Podložní sklíčko s epoxidovou maskou	85
Příloha 3 Rozdíly v počtu buněk <i>Listeria monocytogenes</i> při použití různých denzit	86
Příloha 4 Rozdíly v počtu buněk <i>Staphylococcus aureus</i> při použití různých denzit	87
Příloha 5 Hybridizace buněk <i>Listeria monocytogenes</i> , denzita 10^8 CFU/ml, hybridizace při 43 °C 3 hodiny po fixaci ve 4% paraformaldehydu 1 hodinu při laboratorní teplotě a permeabilizaci lysozymem	88
Příloha 6 Hybridizace buněk <i>Listeria monocytogenes</i> , denzita 10^8 CFU/ml, hybridizace při 43 °C 3 hodiny po fixaci 2% formaldehydem 24 hodin při 4°C a permeabilizaci lysozymem I ..	89



Příloha 1 Epifluorescenční mikroskop Nikon ECLIPSE 80i

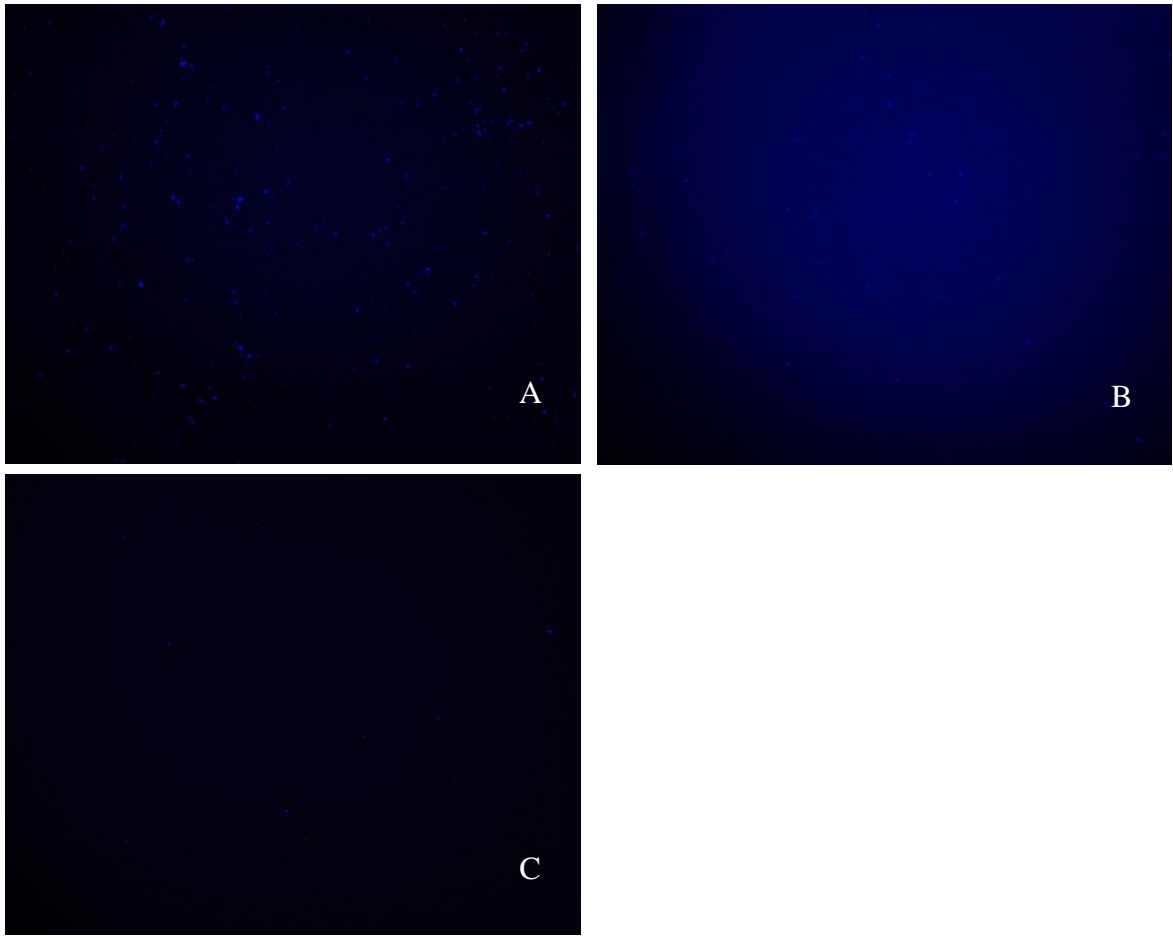


Příloha 2 Podložní sklíčko s epoxidovou maskou



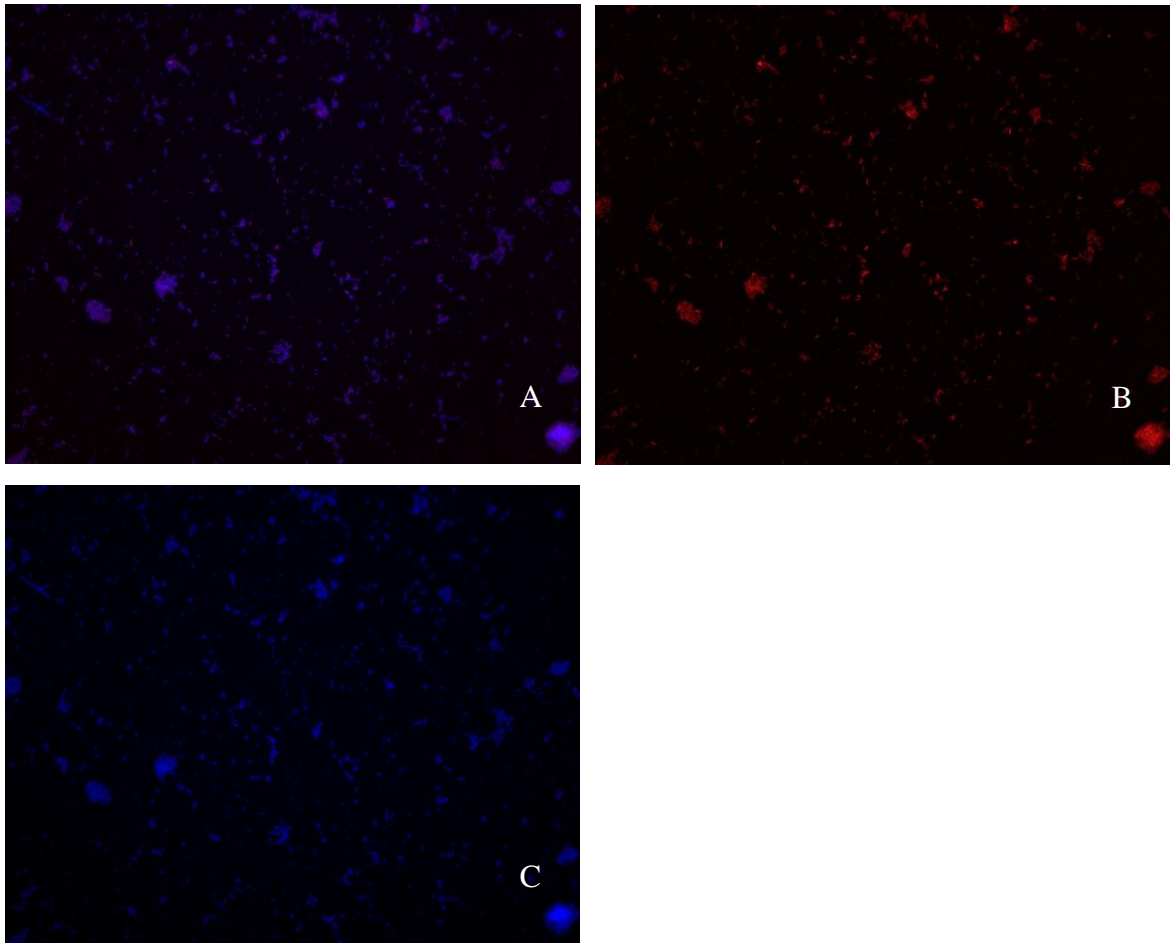
Příloha 3 Rozdíly v počtu buněk *Listeria monocytogenes* při použití různých denzit (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x, buňky obarveny DAPI barvivem)

A- 10^8 CFU/ml; B- 10^7 CFU/ml; C- 10^6 CFU/ml



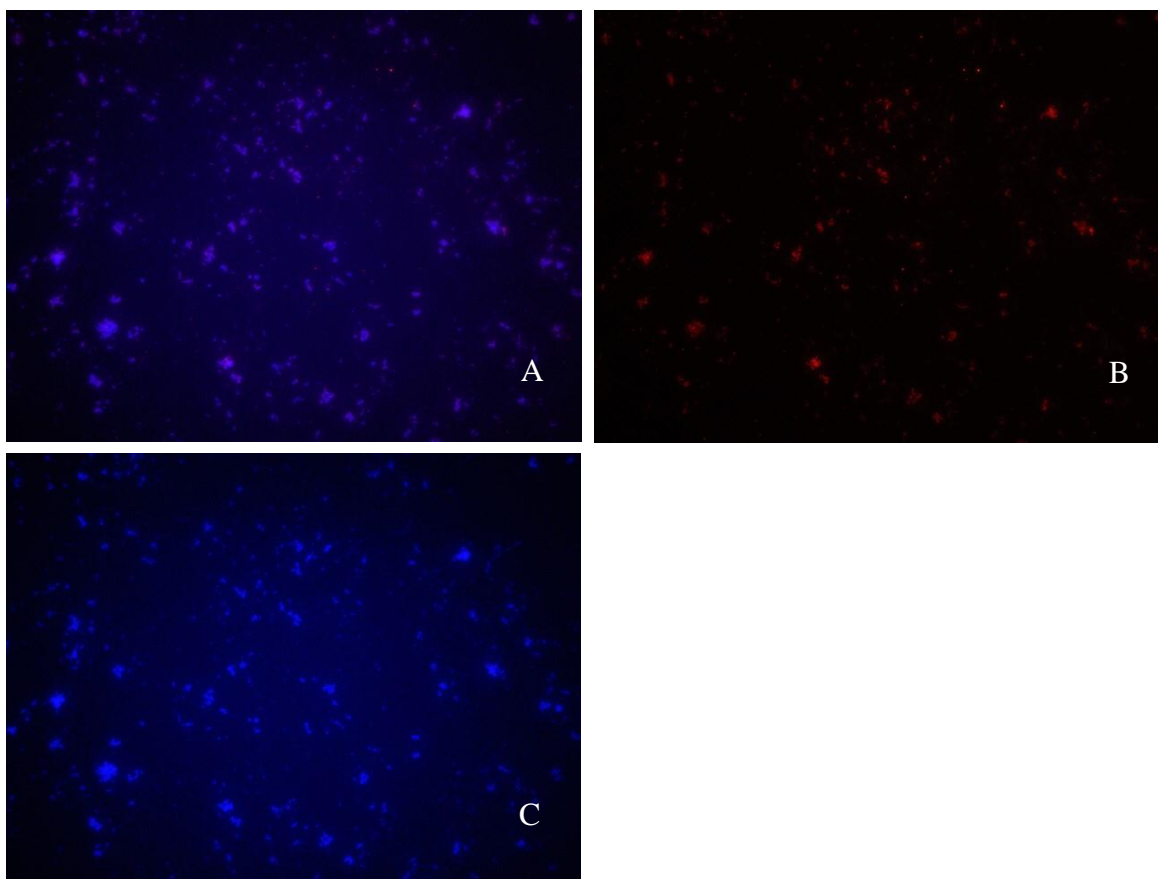
Příloha 4 Rozdíly v počtu buněk *Staphylococcus aureus* při použití různých denzit (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x, buňky obarveny DAPI barvivem)

A- 10⁸ CFU/ml; B- 10⁷ CFU/ml; C- 10⁶ CFU/ml



Příloha 5 Hybridizace buněk *Listeria monocytogenes*, denzita 10^8 CFU/ml, hybridizace při $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 hodiny po fixaci ve 4% paraformaldehydu 1 hodinu při laboratorní teplotě a permeabilizaci lysozymem (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- překryv buněk obarvených DAPI a buněk s navázanou sondou; B- buňky s navázanou sondou; C- buňky obarvené DAPI; celkové zvětšení 400x



Příloha 6 Hybridizace buněk *Listeria monocytogenes*, denzita 10^8 CFU/ml, hybridizace při $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 hodiny po fixaci 2% formaldehydem 24 hodin při 4°C a permeabilizaci lysozymbem (epifluorescenční mikroskop, celkové zvětšení 400x)

A- překryv buněk obarvených DAPI a buněk s navázanou sondou; B- buňky s navázanou sondou; C- buňky obarvené DAPI