

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-technologická

Fluorescenční *in situ* hybridizace pro detekci antimikrobiální rezistence
Bakalářská práce

2020

Lenka Novotná

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Novotná**
Osobní číslo: **C17569**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Fluorescenční *in situ* hybridizace pro detekci antimikrobiální rezistence**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o fluorescenční *in situ* hybridizaci.
2. Zaměřte se také na rezistenci mikroorganismů a její podstatu.
3. Z publikovaných odborných textů vypracujte rešerši k možnostem detekce bakteriální rezistence s důrazem na fluorescenční mikroskopii.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. David Šilha, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 25. 5. 2020

.....
Lenka Novotná

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji mému školiteli Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za návrh zajímavého tématu, jehož zpracování pro mě bylo přínosem. Zároveň mu děkuji za konzultace a rady ohledně vyhledávání v databázích a zajištění praxí v klinických laboratořích. Pro tuto práci pro mě byla přínosná zejména praxe v Ústavu klinické mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Dále bych chtěla poděkovat paní doktorce Palyzové a Marešové z Laboratoře charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologického ústavu AV ČR. Díky nim jsem měla možnost vyzkoušet si molekulárně biologické metody, mikrobiologické metody a navštívit Středisko sekvenace DNA a Centrum cytometrie a mikroskopie. Tyto zkušenosti mi pomohly lépe porozumět dále popisované problematice.

ANOTACE

Tato práce je rešerše věnovaná využití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pro detekci rezistence bakterií. V práci jsou také shrnuty obecné informace o FISH, o podstatě rezistence bakterií a jsou zmíněny běžně používané metody pro detekci rezistence bakterií.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bakterie, cytogenetické metody, detekce rezistence u mikroorganismů, fluorescenční *in situ* hybridizace, rezistence mikroorganismů, testování rezistence

TITLE

Fluorescence *in situ* hybridization for antimicrobial resistance detection

ANNOTATION

This theoretical work is focused on the key information about fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and its use for antimicrobial resistance detection. General information about FISH, antimicrobial resistance, and common methods for resistance detection are mentioned as well.

KEYWORDS

Bacteria, cytogenetics methods, antibiotics resistance detection, fluorescent *in situ* hybridization, antimicrobial resistance, resistance testing

OBSAH

Seznam obrázků	7
Seznam tabulek	8
Seznam zkratk	9
Úvod.....	12
1 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	13
1.1 Vývoj FISH	13
1.2 Vybavení pro metodu FISH	14
1.3 Postup metody FISH	20
1.4 Modifikace FISH.....	21
1.5 Využití FISH v mikrobiologii	24
2 Rezistence mikroorganismů.....	25
2.1 Antimikrobiální látky	26
2.2 Mechanismy rezistence mikroorganismů.....	27
2.3 Přenos genů podmiňujících rezistenci bakterií	30
3 Metody pro detekci bakteriální rezistence	32
3.1 Disková difuzní metoda	32
3.2 E-test (Epsilometer test).....	33
3.3 Mikrodiluční bujónová metoda	34
3.4 Polymerázová řetězová reakce	34
3.5 MALDI-TOF MS	35
4 Aplikace Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace pro detekci bakteriální rezistence	38
4.1 PNA-FISH pro detekci rezistence na klarithromycin u <i>H. pylori</i>	38
4.2 FISH pro detekci rezistence na makrolidy u <i>Campylobacter</i> spp.....	41
4.3 LNA-FISH pro detekci rezistence na linezolid u <i>Enterococcus</i> spp.....	43
4.4 FISH a CARD-FISH pro detekci rezistence u spor <i>B. cereus</i>	45
4.5 Detekce rezistence na ATB inhibující syntézu peptidoglykanů	48
4.6 Detekce úseků plazmidů kódujících β -laktamázy	52
4.7 FISH s nano sondami pro detekci rezistence na ampicilin u <i>E. coli</i>	54
Závěr	58
Použitá literatura	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma fluorescenčního mikroskopu	15
Obrázek 2: Schéma průtokové cytometrie.....	16
Obrázek 3: Histogram.....	17
Obrázek 4: Chemická struktura sond.....	18
Obrázek 5: Diagram mísení barev	20
Obrázek 6: Schématický průběh FISH	21
Obrázek 7: Princip CARD a TSA-FISH.....	22
Obrázek 8: Cíle působení ATB a mechanismy resistance bakterií.....	28
Obrázek 9: Mechanismy přenosu genu podmiňujících rezistenci	31
Obrázek 10: Disková difuzní metoda	33
Obrázek 11: E-test	33
Obrázek 12: Mikrodiluční bujónová metoda	34
Obrázek 13: Schéma detekce resistance bakterií pomocí PCR a elektroforézy	35
Obrázek 14: Princip metody MALDI-TOF MS	36
Obrázek 15: Záznam počítačového vyhodnocení měření pomocí MALDI-TOF MS	36
Obrázek 16: Záznam z fluorescenčního mikroskopu: <i>H. pylori</i> citlivé i rezistentní bakterie ..	40
Obrázek 17: Záznam z fluorescenčního mikroskopu: <i>H. pylori</i> ve vzorcích z biopsie	40
Obrázek 18: Snímky z fluorescenčního mikroskopu: <i>C. coli</i>	43
Obrázek 19: Detekce resistance na chloramfenikol u spor <i>B. cereus</i>	48
Obrázek 20: Záznamy z fluorescenčního mikroskopu: <i>E. coli</i> testovaná na citlivost k amoxicilinu a klavulánové kyselině.....	50
Obrázek 21: Detekce β -laktamáz u <i>E. coli</i>	54
Obrázek 22: Schéma přípravy nanosondy	55
Obrázek 23: Snímky <i>E. coli</i> ze světleného a fluorescenčního mikroskopu.....	56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady vybraných fluorescenčních barev.....	19
Tabulka 2: Přehled antibiotik dle mechanismu účinku	27
Tabulka 3: Přehled sond pro detekci rezistence na klarithromycin u <i>H. pylori</i>	38
Tabulka 4: Přehled sond pro detekci rezistence na makrolidy u <i>Campylobacter</i> spp.	42
Tabulka 5: Přehled sond pro detekci rezistence na linezolid u <i>Enterococcus</i> spp..	44
Tabulka 6: Přehled sond pro FISH a CARD-FISH pro detekci rezistence u <i>B. cereus</i>	47
Tabulka 7: Přehled sond pro detekci úseků plazmidů kódujících β -laktamázy	52
Tabulka 8: Přehled testovaných bakterií nesoucích gen pro β -laktamázy	53
Tabulka 9: Přehled sond pro detekci rezistence na ampicilin u <i>E. Coli</i>	56

SEZNAM ZKRATEK

APTMS	(3-aminopropyl) trimethoxysilan
ATB	Antibiotika
ATP	Adenosin trifosfát
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
bp	z <i>angl.</i> base pair – pár bazí
BSA	z <i>angl.</i> bovine serum albumin – hovězí sérový albumin
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
CARD FISH	z <i>angl.</i> catalysed reporter deposition fluorescence <i>in situ</i> hybridization
CFU	z <i>angl.</i> colony forming units – kolonie tvořící jednotky
CGH	z <i>angl.</i> comparative genome hybridization – komparativní genomová hybridizace
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNP	Dinitrofenol
DTT	z <i>angl.</i> dithiotreitol – (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ECDC	z <i>angl.</i> European centre for disease prevention and control – Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
E-test	Epsilonmeter test
FISH	z <i>angl.</i> fluorescence <i>in situ</i> hybridization – fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	Fluorescein izothiokyanát
FRET PCR	z <i>angl.</i> real-time fluorescence resonance energy transfer PCR
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	z <i>angl.</i> horseradish peroxidase – křenová peroxidáza
ISH	<i>In situ</i> hybridizace
kDa	Kilodalton (jednotka hmotnosti)
LNA	z <i>angl.</i> locked nucleic acid – uzamčená nukleová kyselina
MAC	Minimální antibakteriální koncentrace

MALDI-TOF MS	<i>z angl.</i> matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
M-BAND	<i>z angl.</i> multicolour banding – mnohobarevné pruhování
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
M-FISH	<i>z angl.</i> multicolour FISH – mnohobarevná FISH
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
PBS	<i>z angl.</i> phosphate buffered saline – fosfátový pufr
PCR	<i>z angl.</i> polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PLGA	(2-(2-hydroxyacetyl)oxypropanová kyselina)
PNA	Peptidová nukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SDS	<i>z angl.</i> sodium dodecyl sulfate – dodecylsírán sodný
SKY	<i>z angl.</i> spectral karyotyping – spektrální karyotypizace
SSC pufr	<i>z angl.</i> saline-sodium citrate buffer – pufr tvořený roztokem citronanu sodného a NaCl
TEOS	tetraethyl orthosilikát
tRNA	Transferová RNA
TSA	<i>z angl.</i> tyramide signal amplification – zesílení signálu tyramidem
VRE	Vankomycin rezistentní enterokoky

ÚVOD

Tato práce je souhrnem informací o rezistenci bakterií a jejich detekci, zejména v klinické praxi. Rezistentní bakterie jsou takové bakterie, na které neúčinkuje dané antibiotikum. Mnoho bakterií je přirozeně rezistentních a odolává určitému antibiotiku, jelikož nemá strukturu, na kterou antibiotikum působí. Bakterie mohou pomocí mutace nebo dalších mechanismů rezistenci i získat. Z důvodu získané rezistence dnes není možné některé bakteriální onemocnění léčit, ačkoliv dříve byla léčba pomocí určitých antibiotik úspěšná. V takovém případě se musí zvolit antibiotika jiná, někdy dokonce vhodná léčba neexistuje.

Dnes existuje mnoho metod pro detekci rezistence bakterií. Tyto metody jsou různě časově náročné, mají rozmanité nároky na vybavení a zkušenost personálu. Dnes běžně užívané metody (disková difuzní metoda, E-test (Epsilonmeter test) a mikrodiluční metoda) jsou časově náročné. Vyžadují předchozí kultivaci bakterií z odebraného materiálu (př. výtěr z krku nebo část tkáně apod.). Dalším problémem je, že ne všechny mikroby lze dobře kultivovat (například intracelulárně parazitující bakterie).

Včasná rozpoznání patogenu a volba vhodné léčby jsou velmi důležité pro uzdravení pacienta. Kvůli infekci způsobené rezistentními a nevhodně léčenými bakteriemi zemře ročně mnoho lidí. Kvůli těmto důvodům vědci vyvíjí nové metody pro detekci bakterií a jejich rezistence.

Jednou z možností je využití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tato metoda umožňuje detekovat specifické úseky DNA (dědičné genetické informace – deoxyribonukleové kyseliny) či RNA (ribonukleové kyseliny) pomocí takzvaných sond označených fluorescenční barvou. Sonden jsou řetězce nukleových kyselin, které jsou komplementární ke struktuře, jejíž přítomnost chceme ve vzorku potvrdit či vyloučit. Pokud se ve snímku z fluorescenčního mikroskopu najdou ve vzorku barevně označená místa, je nález pozitivní. Tato metoda zabere jen několik hodin a je díky ní možné pozorovat přítomnost hledaných struktur přímo v bakteriích.

Tato práce shrnuje princip, postup a materiál potřebný pro fluorescenční *in situ* hybridizaci, mechanismy rezistence bakterií a metody pro detekci bakteriální rezistence. Zmíněny jsou metody dnes běžně používané a zejména příklady využití fluorescenční *in situ* hybridizace pro detekci antimikrobiální rezistence.

1 FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je cytogenetická metoda, která se používá pro detekci a lokalizaci nukleových kyselin uvnitř buněk (Huber a kol., 2018). Jedná se o hybridizační metodu. Pomocí této skupiny metod je možné prokázat přítomnost DNA (deoxyribonukleové kyseliny) nebo RNA (ribonukleové kyseliny) díky tomu, že je možné je hybridizovat (spojit) s uměle připraveným komplementárním úsekem nukleové kyseliny (sondou), který je označen tak, aby byla možná jeho detekce. Název metody je složen ze dvou částí. *In situ* znamená, že hybridizace probíhá přímo v místě (*in situ*), kde je hledaná struktura. Není tedy potřeba izolovat DNA či RNA z buňky, tak jako je tomu například u jiných hybridizačních metod. Přívlastek fluorescenční má tato metoda, díky tomu, že se pro ni používají sondy značené fluorescenčními barvivy (Kočárek, 2007).

Pomocí FISH je možné zobrazit cytogenetické abnormality jako jsou delece chromozomů, amplifikace a translokace. Metody FISH mají využití například v prenatalní diagnostice, v onkologii pro průkaz sarkomů a při diagnostice melanomu (Garibyan a Avashia, 2013). Své využití má tato metoda i v mikrobiologii (Frickmann a kol., 2017).

1.1 Vývoj FISH

Předchůdcem FISH byly histochemické metody a různé způsoby barvení biologického materiálu. Pomocí barviv je možné zvýraznit určitou skupinu makromolekul (proteiny, lipidy či sacharidy) v buňce. Popřípadě je možné obarvit i specifitější struktury, například retikulární vlákna nebo elastin.

První detekce specifických molekul byly prováděny pomocí imunochemických metod, na základě vaznosti antigenu a protilátky. Na začátku 40. let 20. století se začaly značit protilátky fluorescenčními barvivy (Levsky, 2003). První detekce specifických nukleových kyselin pomocí fluorescenčně značených protilátek byla provedena později (Rudkin a Stollar, 1977).

Protilátky postupně nahradily sondy tvořené nukleovými kyselinami a *in situ* hybridizace byla použita na konci 60. let 20. století. Sondy se značily enzymy, zlatem či radioizotopy. Zlatem značené vzorky se prohlížely pomocí elektronového mikroskopu. U vzorků značených radioizotopy se zaznamenávalo emisní záření na fotografický papír. Značení pomocí radioizotopů mělo mnoho nevýhod a postupně se od něj upustilo. Nevýhodou radioizotopů je jejich nestálost, postupně se rozpadají a může se změnit jejich specifita.

Mezi další nevýhody patří nebezpečnost při manipulaci, transportu a likvidaci. Radioizotopové značení je i poměrně drahé (Levsky, 2003). Výhodou metody je dobrá citlivost, ale vyžaduje velmi dlouhou dobu expozice pro zaznamenání signálu (v řádech týdnů pro detekci izotopu vodíku H^3). Má bohužel i malé prostorové rozlišení a pozorování je rušeno signály pozadí (Huber a kol., 2018).

Roku 1980 byla poprvé použita fluorescenční *in situ* hybridizace. RNA sonda byla označena na 3' konci pomocí fluorescenčního barviva (Bauman a kol., 1980). Od té doby bylo použito mnoho modifikací s přímým a nepřímým značením. Nepřímé značení se používá pro zvýraznění fluorescenčního signálu. Koncem dvacátého století byly vyvinuty DNA sondy, na které je možné navázat více molekul fluorescenčního barviva a přímé značení tak vykazuje silný fluorescenční signál (Levsky, 2003).

1.2 Vybavení pro metodu FISH

Materiálové a přístrojové vybavení pro FISH není příliš specifické a často je již součástí mnoha klinických laboratoří. Je potřebná vodní lázeň, inkubátor a zejména fluorescenční mikroskop nebo průtokový cytometr. Pokud se pro stanovení používá více fluorescenčních barev je důležité, aby mikroskop disponoval různými filtry. Pro metodu jsou samozřejmě klíčové sondy označené fluorescenčními barvami. Sondy musí být specificky vybrány dle hledané struktury (Juretschko a Fritsche, 2011).

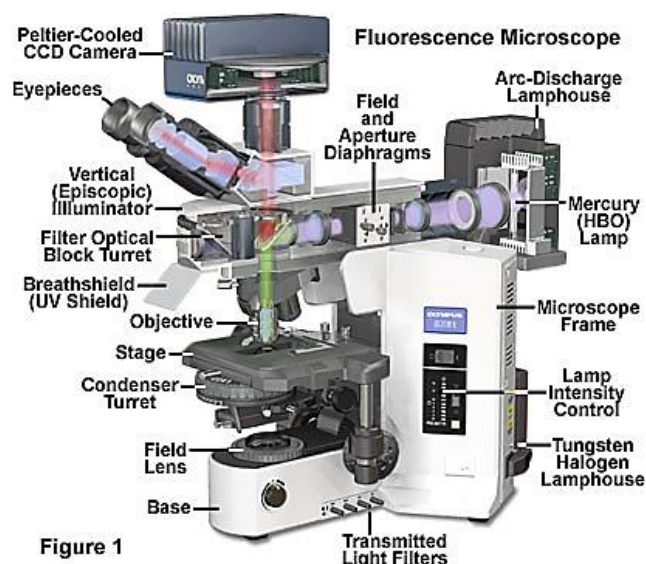
Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie se používá pro zobrazení emisního záření fluorescenčních barev, kterými jsou označené sondy. Mikroskop používá různé excitační a bariérové filtry pro detekci různých vlnových délek (Juretschko a Fritsche, 2011). Fluorescenční mikroskopie je podobná světelné mikroskopii, je ale schopná dosáhnout většího zvětšení vzorků. Oproti optickému mikroskopu používá světlo o mnohem vyšší intenzitě. Zdroj světla excituje fluorescenční molekuly, které emitují světlo o nižší energii a o vyšší vlnové délce. Emitované světlo poté vytváří viditelný obraz. Obraz se fotí a mikrofotografie umožňují vizualizaci umístění fluorescenčních molekul (Malek a kol., 2017).

Jako zdroj záření u fluorescenčního mikroskopu slouží rtuťová (dříve) nebo xenonová výbojka se širokým spektrem krátkovlnného záření. Pomocí excitačních filtrů je na vzorek propuštěno jen světlo o krátké vlnové délce (modré nebo modrofialové). Světlo poté prochází kondenzorem na vzorek. Zde dojde k excitaci fluorescenčních molekul, které začnou emitovat

záření podle toho, jaká fluorescenční molekula byla zvolena pro obarvení. Emitované záření putuje k dalšímu filtru, který se nazývá zábranný, a jeho funkcí je zamezit přístupu škodlivých paprsků do oka pozorovatele. Zábranný filtr musí být kompatibilní s filtrem excitačním (Votava, 2010).

Na obrázku 1 je vidět schéma fluorescenčního mikroskopu. Má mnoho částí podobných optickému mikroskopu. Mikroskop je tvořen mechanickou a optickou částí. Mechanická část zahrnuje masivní tělo mikroskopu, které zajišťuje stabilitu přístroje. Vzorek se umísťuje na stolek, což je plochá destička s otvorem uprostřed, umožňujícím průchod světla vzorkem. Stolkem se dá pohybovat pomocí zaostřovacího šroubu nahoru a dolů, aby byla zajištěna správná ostrost vzorku. Optickou část mikroskopu tvoří objektiv, okulár a zdroj světla (Votava, 2010). Zdrojem světla je u mikroskopu na obrázku 1 rtuťová výbojka (www.olympus-lifescience.com, 2019).



Obrázek 1: Schéma fluorescenčního mikroskopu (www.olympus-lifescience.com, 2019)

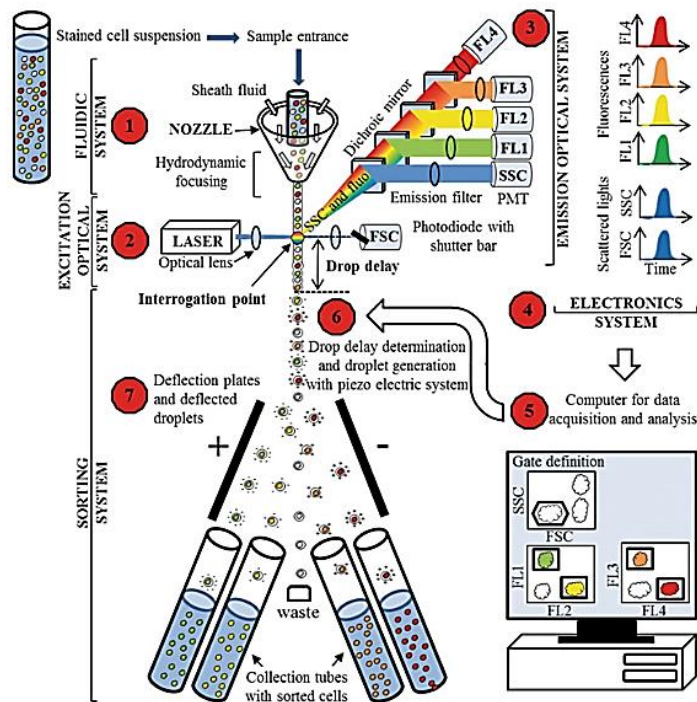
Průtoková cytometrie

Nejen pomocí fluorescenčního mikroskopu, ale i pomocí průtokové cytometrie můžeme detekovat fluorescenčně označené buňky, nebo jejich fragmenty. Tato metoda slouží ke kvalitativní a kvantitativní analýze buněk, ale i menších struktur jako jsou například fragmenty DNA v suspenzi. Průtoková cytometrie je schopna detekovat částice o průměru 1-30 μm (Shapiro, 2003). Průtokový cytometr je tvořen třemi částmi. První z nich je fluidní systém, který umožňuje transport částic. Další část je optická, tvoří ji laser, detektory záření

a systémem zrcadel. Třetí část je elektronická a umožňuje zpracování signálu pomocí počítačového softwaru (Picot a kol., 2012).

Suspenze s detekovanými buňkami se umísťují do průtokového cytometru většinou ve zkumavkách. Některé přístroje mají i zásobníky nebo stojánky, do kterých lze vzorky ve zkumavkách umístit. Přístroj je sám postupně zpracovává a rozlišuje pomocí čárového kódu umístěného na zkumavce. Součástí přístroje je i zařízení na promíchání vzorku před samotnou analýzou (Picot a kol., 2012).

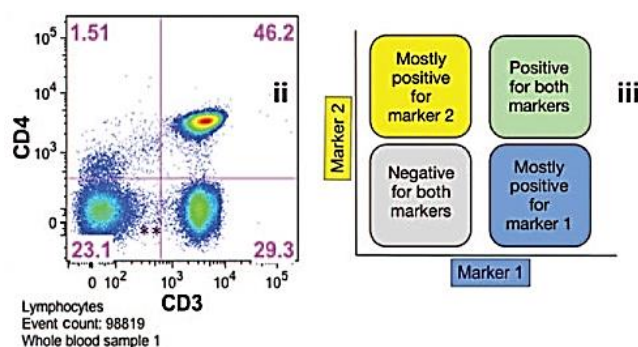
Průběh děje je zachycen na obrázku 2. Vzorek se suspenzí buněk je nejprve stlačen a poté prochází do trysky. Čím vyšší tlak působí na vzorek, tím klesá přesnost analýzy vzorku. U trysky je velmi důležité, aby byla rovná a precizně kalibrovaná. Z trysky se částice dostávají do měřicí cely, kde na ně dopadá excitační zdroj světla. Jako zdroj světla se používají lasery (Picot a kol., 2012). Některé průtokové cytometry mají i více různých zdrojů excitačního záření (Greimers a kol., 1996).



Obrázek 2: Schéma průtokové cytometrie (Picot a kol., 2012)

Další částí průtokového cytometru jsou tři typy detektorů. Prvním z nich je detektor umístěný přímo naproti zdroji záření a nazývá se detektor „forward scatter“. Forward scatter umožňuje stanovit velikost buněk (Salzman a kol., 2017). Druhý detektor je umístěn kolmo na osu dopadajícího záření a nazývá se „side scatter“ a zachycuje granularitu buněk (tento údaj se hodí například pro odlišení lymfocytů od granulocytů). Údaje z těchto detektorů jsou

zpracovány do podoby histogramu, jeho schéma je vidět na obrázku 3 vlevo. Intenzita naměřená na forward scatteru se vynáší na osu X a intenzita zachycená na side scatteru se vynáší na osu Y. Dalším detektorem je detektor fluorescenčního záření. Osy histogramu se poté označují dle použitého fluorescenčního značení pro danou strukturu. Buňky, které budou obsahovat dané struktury se budou v histogramu nacházet v pravém horním rohu. Buňky bez hledané struktury, tedy i bez fluorescenčního značení se budou nacházet v histogramu vlevo dole. Princip zobrazení je vidět na obrázku 3 vpravo (Jahan-Tigh a kol., 2012).



Obrázek 3: Histogram (Jahan-Tigh a kol., 2012)

Sondy pro FISH

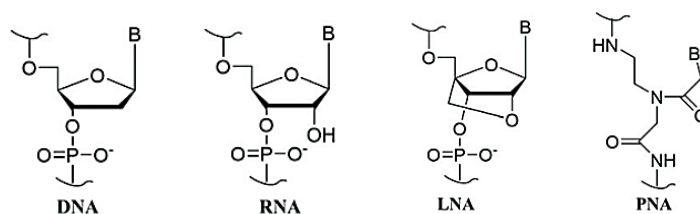
Sondy jsou úseky nukleové kyseliny, které slouží k průkazu komplementárních úseků DNA nebo RNA v buňce (Kočárek, 2007). První sondy byly získávány izolací surové RNA na konci 80. let a cílily na velké fragmenty chromozomů. V 80. letech se vytvářely i genové knihovny. Díky projektu lidského genomu došlo k mnoha pokrokům ve vývoji bioinformatických nástrojů a v syntéze oligonukleotidů. Sondy je možné díky pokroku snadněji navrhnout i syntetizovat a dnes tedy převládají sondy syntetické (Huber a kol., 2018).

Pro vytváření a testování sond se používají různé softwary a databáze jako ARB softwarový balíček, probeCheck nebo mathFISH. Vhodné sondy nebo jejich směsi se často vybírají podle výsledků Gramova barvení (Frickmann a kol., 2017). Barvení dle Grama se používá pro diferenciaci gram pozitivních a gram negativních bakterií. Do těchto dvou skupin se dělí bakterie na základně odlišnosti ve stavbě buněčné stěny (Votava, 2010).

Klíčovými vlastnostmi sondy jsou sekvence, délka a koncentrace v hybridizačním roztoku (Kočárek, 2007). Sondy mohou mít různý počet nukleotidů, čímž je ovlivněna přímo délka sondy. Dnes se upřednostňují kratší sondy o délce 15-30 bp (*base pair*, párů bází) (Amann a kol., 2001), používají se ale i sondy delší, o délce 200-400 bp. Krátké sondy snadno pronikají do buňky. Nevýhodou krátkých sond může být nízká specifita, pokud se komplementární

sekvence bude nacházet na více místech v genomu. Dlouhé sondy jsou specifičtější, ale je u nich riziko, že nebudou zachyceny malé delece. Dlouhé sondy hybridizují pomaleji a může se stát, že se na rozvinutý řetězec DNA naváže opět původní komplementární řetězec DNA právě místo sondy. Sondy musí být v hybridizačním roztoku v nadbytku oproti cílové DNA, tím se zajistí, že při reasociačních podmínkách se bude denaturovaná DNA hybridizovat se sondou (Kočárek, 2007).

Sondy mohou být tvořeny ribonukleotidy (RNA sondy) (Huber a kol., 2018), nukleotidy (DNA sondy) (Juretschko a Fritsche, 2011), nebo jinými syntetickými strukturami jako například peptidovými nukleovými kyselinami spojenými s bázemi (PNA sondy) a tzv. uzamčenými nukleovými kyselinami (LNA, *locked nucleic acids*). LNA sondy jsou podobné RNA sondám, mají vysokou afinitu k cílové struktuře a krátkou dobu hybridizace (Silahtaroglu a kol., 2004). Výhodou PNA sond je vyšší stabilita při vyšších teplotách (Cerqueira a kol., 2008). PNA sondy jsou také odolnější vůči nukleázám a proteázám oproti DNA sondám. Tyto sondy bývají i kratší (13-18 bp) a snadno tedy pronikají přes buněčnou stěnu bakterií. PNA sondy se lépe váží k DNA či RNA komplementárním sekvencím (Jung a kol., 2018). Chemické struktury sond jsou zobrazena na obrázku 4.



Obrázek 4: Chemická struktura sond (upraveno dle Xia a kol., 2017)

Cílovou strukturou, na kterou se sondy navazují, je u mikroorganismů zejména rRNA (ribosomální ribonukleová kyselina). Cílit na rRNA je výhodné z mnoha důvodů. Ribosomální RNA se nachází v buňkách všech organismů v počtu až několik tisíc molekul. (Amann a kol., 2001) a jedná se o stabilní molekulu (Laflamme a kol., 2009). Jednotlivé skupiny mikroorganismů je možné identifikovat podle charakteristických úseků rRNA. Bakterie a archea obsahují tři typy podjednotek rRNA, a to 5S, 16S a 23S. Velmi často jsou metody cíleny na gen pro 16S podjednotku rRNA (Amann a kol., 2001). Gen pro 16S podjednotku rRNA se používá pro taxonomické stanovení bakterií i archebakterií a je možné je porovnávat s genem pro 18S podjednotku rRNA u eukaryot (Clarridge, 2004). Často musí být kromě specifické sondy zařazena i kontrolní sonda, která je specifická například na celý rod bakterií.

Dnes je možné použít dohromady několik sond, kdy každá má jinou specifitu (Frickmann a kol., 2017). Označené sondy můžeme poté pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo pomocí průtokové cytometrie (Cerqueira a kol., 2008).

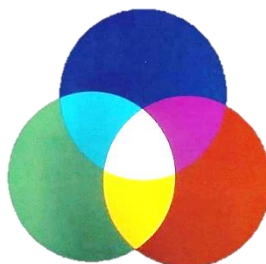
Fluorescenční barvy používané pro značení sond

V současnosti se pro značení sond používá mnoho barviv i jejich kombinací. Pokud se používá více sond a každá je označena jinou fluorescenční barvou, musí se dbát na to, aby se emisní spektra nepřekrývala. V tabulce 1 jsou uvedeny často používané fluorescenční barvy a barvy použité v experimentech uvedených v poslední kapitole. V tabulce je uvedena barva emitovaného záření, excitační a emitovaná vlnová délka (Juretschko a Fritsche, 2011).

Tabulka 1: Příklady vybraných fluorescenčních barev (Juretschko a Fritsche, 2011; Cerqueira a kol., 2011, Haas a kol., 2008; Laflamme a kol., 2009; Rohde a kol., 2016, www.thermofisher.com, 2020)

Název fluorescenční barvy	Barva fluorescence	Vlnová délka v nm	
		excitační	emisní
Alexa fluor 488	zelená	490	525
Alexa fluor 594	červená	590	617
Cy3	červenooranžová	554	568
Cy5	červenofialová	650	667
6-FAM	zelená	488	517
Fluorescein (FITC)	zelená	490	525
CAL Fluor Red 610	červená	590	610
DAPI	modrá	350	470
Tetramethylrhodamin (TRITC)	oranžová	557	576
Texaská červeně	tmavě červená	596	615

Pomocí mísení barev lze vytvořit doplňkové barvy, jak je vidět na obrázku 5 (Amann a kol., 1996). Kombinací červené a modré barvy se získá růžová, kombinací modré a zelené tyrkysová, kombinací červené a zelené barva žlutá a barva bílá vzniká smísením všech tří základních (modrá, červená, zelená) barev (Juretschko a Fritsche, 2011).



Obrázek 5: Diagram mísení barev (Amann a kol., 1996)

Sondy se fluorescenčním barvivem značí přímo, nebo nepřímo. U přímého značení jsou fluorescenční barvy navázány přímo na sondu. Nepřímé značení pomocí haptenu spadá do imunohistochemických metod. Hapteny jsou malé molekuly, které jsou schopné po navázání na větší molekulu vyvolat imunitní reakci. Hapten není sám o sobě ve fluorescenčním mikroskopu viditelný. Pro detekci části nukleové kyseliny, na kterou je hapten navázaný, se používá fluorescenčně značená protilátka se specifitou k danému haptenu (Chen a Chen, 2013).

1.3 Postup metody FISH

Metodu lze rozdělit do 4 kroků: fixace a zvýšení propustnosti buněčné membrány u vzorku (Amann a kol., 2001), hybridizace, promytí a vyhodnocení vzorku. Proces je schematicky znázorněn na obrázku 6.

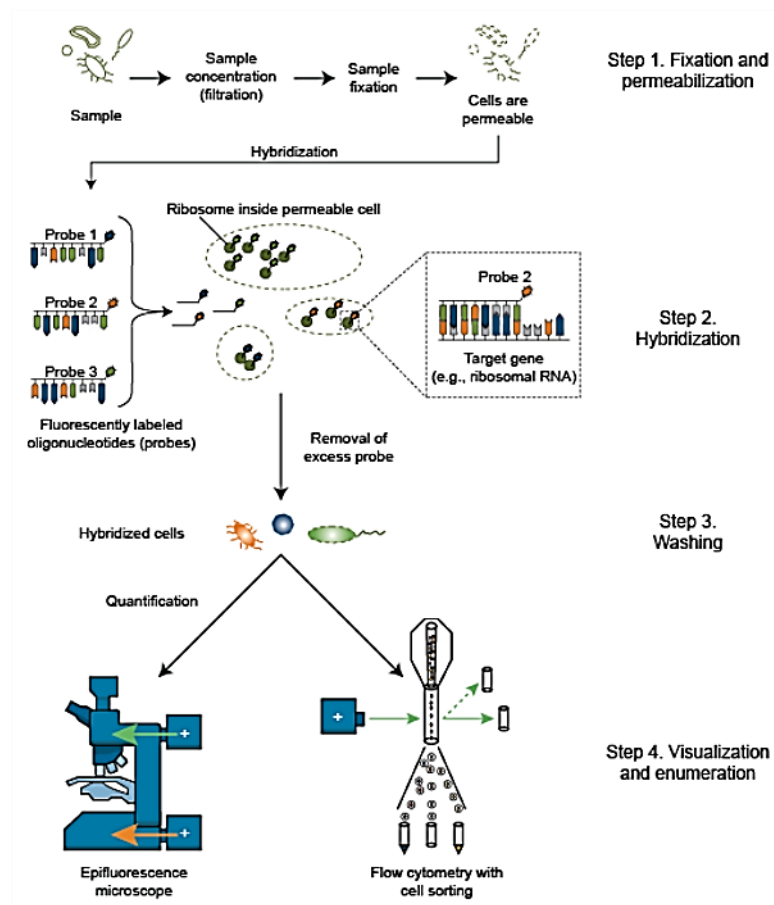
První krok zahrnuje fixaci preparátu. Fixace je nutná, aby byla zachována morfologická struktura buňky. Fixace se provádí jak u volných bakterií, tak i u vzorku tkáně. Pro fixaci se používají aldehydy (paraformaldehyd, glutaraldehyd), ethanol, methanol a mnoho dalších látek. Jsou i metody, u kterých se fixativum nepoužívá (Frickmann a kol., 2017).

Dále je nutné zajistit průnik sond do buněk. Některá fixační činidla slouží jako slabé detergenty a mohou zajistit lepší propustnost buněčné membrány. U grampozitivních bakterií je složitější narušit plazmatickou membránu, proto se ke vzorku přidávají permeabilizační činidla, například různé saponiny. U gramnegativních bakterií není vždy potřebné použít permeabilizační činidlo a zejména malé sondy proniknou do buňky snadno (Frickmann a kol., 2017).

Dalším krokem je hybridizace. Během hybridizace se fluorescenčně značené sondy, specificky váží na komplementární sekvenci DNA nebo RNA.

Poté je nutné promytí, aby se odstranily nenavázané sondy. Vzorek tkáně (Chen a Chen, 2013) nebo suspenze s kulturou je poté prohlížen ve fluorescenčním mikroskopu (Frickmann a

kol., 2017). Každá fluorescenčně značená sonda, která se naváže na cílovou strukturu, se zobrazí v dané buňce jako fluoreskující bod (Chen a Chen, 2013).



Obrázek 6: Schématický průběh FISH (Pgi a Rathnayaka, 2018)

1.4 Modifikace FISH

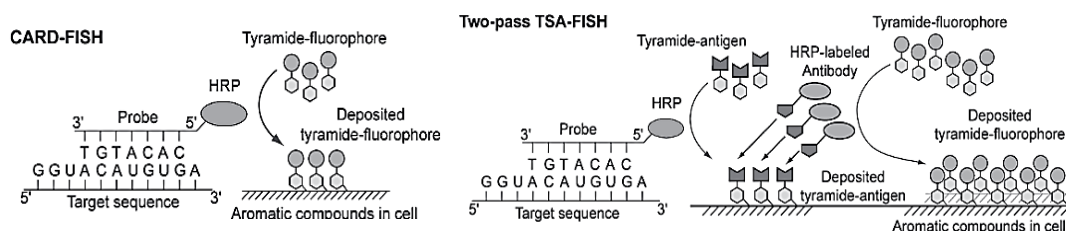
CARD-FISH (TSA)

U běžné FISH pozorujeme v některých případech slabý fluorescenční signál, hlavně pokud je v buňce málo cílových molekul (Kubota, 2013). CARD-FISH umožňuje až desetinásobné zvýraznění fluorescenčního signálu. Tato modifikace je schopná detekovat i poměrně malý počet kopií genů v buňce a to 20 až 50 kopií v některých případech. Jako detekční limit je u této metody uváděno rozmezí 100 až 1000 kopií daného genu v prokaryotické buňce (Laflamme a kol., 2009).

CARD-FISH byla vyvinuta na konci 80. let 20. století a její název vychází z počátečních písmen anglického názvu *catalysed reporter deposition*, někdy se také používá označení TSA z anglického *tyramide signal amplification* (Laflamme a kol., 2009).

Metoda využívá sondy, které jsou označené HRP (*horse radish peroxidase*, křenovou peroxidázou). K těmto sondám se přidává fluorescenčně označený tyramid, který díky HRP přejde do formy radikálu. Radikál tyramidu reaguje s aromatickými molekulami, jako je tyrosin a tryptofan. Tato reakce probíhá jen v blízkosti molekuly HRP. Kolem molekuly HRP se nahromadí velké množství fluorescenčně značeného tyramidu a díky tomu se silně zvýrazní sondy navázané na cílové struktury v buňce. Nevýhodnou této modifikace je, že molekula HRP je velká (40 kDa). Samotný fluorochrom je menší, má jen 0,5-1 kDa. HRP limituje teplotu hybridizace a promývání, tyto kroky by měly probíhat maximálně při 57 °C. Při vyšší teplotě dojde k inaktivaci křenové peroxidázy (Kubota, 2013).

CARD-FISH má v současnosti ještě další modifikaci nazývanou two pass TSA-FISH. Modifikace spočívá ve dvojnásobném navázání tyramidu. Nejprve se na HRP navazuje tyramid značený DNP (dinitrofenolem). Poté se na DNP naváže protilátka značená HRP specifická k DNP. Na HRP na molekule protilátky se v dalším kroku váže tyramid značený fluorochromem. Tato modifikace má ještě výraznější fluorescenční signál a vyšší specifitu. Schématický je princip obou metod znázorněn na obrázku 7 (Kubota, 2013).



Obrázek 7: Princip CARD a TSA-FISH (upraveno podle Kubota, 2013)

FISH na vlákně DNA (Fibre-FISH)

Pro tuto modifikaci je nutné nejprve izolovat DNA. Nejedná se tedy vyloženě o *in situ* hybridizaci. Modifikace se využívá ve výzkumu a má uplatnění při citlivé detekci mikrodeleci a pro mapování pozice genů. Tato metoda není vhodná pro detekci přestavby chromozomů, ani pro zjištění počtu chromozomů (Kočárek, 2007).

Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Komparativní genomová hybridizace byla první metodou sloužící k porovnání celého genomu. Pomocí CGH je možné sledovat změny v počtu genů (mikrodelece a amplifikace). Pro provedení metody je nutné izolovat DNA z testovaných a z referenčních buněk. DNA pacienta a referenční DNA se označí odlišnou fluorescenční barvou a poté se spojí pomocí hybridizace (Pinkel a Albertson, 2005). Při normálním nálezu je chromozom obarven oběma sondami rovnoměrně. Pokud převládá v chromozomu barva, kterou byla označena referenční DNA, znamená to, že se v DNA pacienta nachází delece. Pokud převládá barva, kterou byla označena DNA pacienta, znamená to, že v DNA došlo k amplifikaci některých genů (Kočárek, 2007).

Mnohobarevné pruhování (M-BAND)

Mnohobarevné pruhování slouží ke sledování změn na chromozomu. Slouží pro pozorování rozsahu delecí, inverzí, či dalších změn na chromozomu. Tato modifikace není vhodná pro sledování změn týkajících se většího počtu chromozomů. Používá směs sond a každá sonda je specifická k určitému úseku na chromozomu (Kočárek, 2007).

Mnohobarevná FISH (M-FISH)

Mnohobarevná FISH souží k identifikaci všech 24 lidských chromozomů a pomáhá identifikovat translokace jednotlivých chromozomů, dále je metoda vhodná pro detekci větších delecí (př. celé chybějící raménko chromozomu). Pomocí M-FISH nejde identifikovat inverze ani amplifikace chromozomu. Pomocí M-FISH je možné sledovat pouze chromozomy v metafázi. Používají se takzvané malovací sondy, kterých je 24 a každá sonda je označena jinou barvou. Pro M-FISH je nezbytné, aby měl fluorescenční mikroskop 6 filtrů a bylo tak možné zobrazit všechny použité fluorescenční barvy. M-FISH se používá ke studiu karyotypu dalších organismů (Kočárek, 2007).

Spektrální karyotypizace (SKY)

U spektrální karyotypizace se také používá 24 sond najednou. Každá sonda je specifická na jeden z lidských chromozomů a je odlišně označena, jednou až čtyřmi fluorescenčními barvami. Díky mísení barev se vytvoří dostatečné množství odstínů. Každý chromozom je označen jinou barvou (Macville a kol., 1997). U této modifikace není nutné, aby měl fluorescenční mikroskop několik filtrů. Obraz se snímá celý najednou a vyhodnocuje se pomocí

takzvaného interferometru, který je spojen s kamerou. Software vytvoří výsledný obraz, na němž jsou různobarevné chromozomy (Kočárek, 2007).

1.5 Využití FISH v mikrobiologii

FISH může být v mikrobiologii využita pro rychlý průkaz patogenů ve vzorcích. Díky FISH je možné snáze identifikovat mikroby, jejichž kultivace je složitá. Špatně se kultivují bakterie, které jsou intracelulárními parazity buňky (mykoplazmata, chlamydie). FISH je také vhodná i pro rychlou detekci rezistence bakterií. Některé FISH metody mohou detekovat bakterie přímo v primárních vzorcích a obejdou se bez kultivace bakterií. Tím se metoda stává velmi rychlou. Výsledky vyšetření mohou být známy během 60–90 minut. Čas práce laboratorního personálu je u těchto metod 5-15 minut. Ve srovnání s metodami PCR (polymerázové řetězové reakce) je tato metoda z hlediska provozních nákladů levnější (Frickmann a kol., 2017).

Pro vyhodnocení metody FISH je potřebný zkušený personál, jelikož se jedná o optickou metodu. Pro FISH je klíčový a někdy problematický výběr detekčních sond. Musíme dopředu vědět/odhadnout, jakou bakterii nebo konkrétní mutaci ve vzorku hledáme. V některých případech se pro zjednodušení výběru sond nejprve provádí barvení dle Grama. Metody FISH pro detekci rezistence jsou převážně omezeny na průkaz rezistencí způsobených mutací v rRNA (Frickmann a kol., 2017). V případě detekce rezistencí podmíněných malým počtem genů, například genů v chromozomu či plazmidu je nutné využít modifikovanou FISH, která bude mít zesílený signál, například CARD-FISH (Laflamme a kol., 2009).

2 REZISTENCE MIKROORGANISMŮ

Vznik rezistence u mikroorganismů je přirozený jev, který je ale ovlivňován a urychlován používáním antibiotik ve zdravotnictví, zemědělství a životním prostředí. Nárůst rezistence je také ovlivněn hygienickými standardy, cestováním, migrací a způsobem kontroly kvality antimikrobiálních látek (Holmes a kol., 2016).

Na začátku 20. století došlo k významnému pokroku ve vývoji antibakteriálních léčiv a začaly se zavádět kroky k zamezení šíření infekcí. Pokrok v léčbě bakteriálních onemocnění se výrazně zlepšil na počátku 40. let, kdy se penicilin začal dostávat mezi větší množství pacientů. Tehdy na krátkou dobu zavládl pocit vítězství nad bakteriálními infekcemi. Bakterie se však dokážou na působení antibiotik adaptovat. V průběhu minulých let bylo vyvinuto mnoho antimikrobiálních léčiv. Bakterie se těmto okolnostem dokázaly přizpůsobit a vytvořily si různé mechanismy rezistence, své obrany. Léčba bakteriálních infekcí se dnes stává komplikovanější (Tenover, 2006).

Rezistentní bakterie jsou příčinou mnoha úmrtí každý rok. Studie ECDC (*European centre for disease prevention and control*, Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí) o zdravotní zátěži uvedla 33 000 úmrtí zapříčiněných vlivem rezistentních bakterií v roce 2018. ECDC také uvádí, že 75 % onemocnění způsobených rezistentními bakteriemi je způsobeno nevhodnou zdravotní péčí. Měly by proto být zavedeny přísnější opatření pro kontrolu a prevenci infekčních onemocnění (www.sukl.cz, 2018).

Velké množství pacientů trpících onemocněním způsobeným rezistentními kmeny by mohlo být zachráněno, kdyby se jim včas podalo správné antibiotikum. Včasné podání vhodného antibiotika je klíčové hlavně u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Vhodný výběr antibiotik také zpomalí vývoj a šíření rezistentních bakterií (Santiso a kol., 2011). V České republice jsou bohužel velmi často předepisována širokospektrá antibiotika. Pacienti, kteří je užívají jsou vystaveni velkému množství nežádoucích účinků a tento výběr léčby urychluje rozvoj rezistence. Dobrým směrem se ubírá zemědělství v ČR. Spotřeba veterinárních antibiotik klesla mezi roky 2006 až 2016 na polovinu. Během ledna roku 2019 Vláda ČR schválila akční plán Národního antibiotického programu platného pro rozmezí let 2019–2022. Cílem plánu je zachování účinné léčby infekčních onemocnění u lidí i zvířat. Tento plán se zaměřuje na informovanost všech ohledně antibiotické rezistence, na kontrolu a prevenci antibiotické rezistence a na podporu vědy a výzkumu (www.mzcr.cz, 2019).

2.1 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou přírodní nebo syntetizované látky, které jsou schopné zabít mikroorganismy, nebo inhibovat jejich růst (Burnett-Boothroyd a McCarthy, 2011). Velkou skupinu těchto látek tvoří látky mikrobiálního původu, které nazýváme antibiotika (ATB). Synteticky připravené antimikrobiální látky se nazývají chemoterapeutika. Dnes se i pro chemoterapeutika užívá pojem ATB (Votava, 2005). ATB jsou obecně látky, které cílí na struktury a metabolismy prokaryotních buněk a nepoškozují buňky eukaryotické (např. buňky lidského těla) (Beneš, 2018). Pro předepisování, či užívání ATB platí souhrn pravidel označovaných jako racionální antibiotická terapie (Votava, 2010).

Zásady racionální antibiotické terapie

Je nutné vědět, že ATB se chovají jinak než běžná léčiva. Vlivem špatného užívání je způsobován selekční tlak na rezistentní kmeny bakterií a ty se poté více šíří. Špatně vybrané léčivo u jednoho pacienta může ovlivnit i další živé organismy (Karen a kol., 2018). Například zvýšená teplota není jasným příznakem bakteriální infekce, ale může být způsobena např. virem. V takovém případě je užívání ATB nevhodné (Votava, 2010).

Pro vhodnou antibiotickou terapii by měly být vybraná ATB účinná jen na předpokládané nejčastější patogeny. Neměla by být předepsána ATB širokospektrá a výběr vhodného ATB by měl být vždy individuální (Karen a kol., 2018).

Účinek ATB by měl u skupiny baktericidních ATB nastat do 1 až 2 dnů a u ATB bakteriostatických během 3 až 4 dnů. Léčba by tedy neměla být předčasně měněna. Měla by být dodržena i správná délka léčby, tu je možné ukončit přibližně po 3 dnech od zlepšení příznaků nemoci (Votava, 2010).

Dělení antibiotik

ATB lze dělit dle různých hledisek. Můžeme je dělit podle způsobu přípravy na chemické (vyrobeny chemickou syntézou) a na přírodní (izolované z bakterií a hub). Podle schopnosti usmrtit bakterii, či jen zpomalit její růst dělíme ATB na bakteriocidní a bakteriostatická. ATB také dělíme na úzkospektrá a širokospektrá podle toho, na jak širokou škálu mikroorganismů jsou účinná. Velmi časté je také dělení na základě chemické struktury ATB (např. heterocyklická, makrolidy, aj.) (Beneš, 2018).

ATB jsou také často dělena podle mechanismu účinku. Mechanismy zahrnují působení na syntézu buněčné stěny, inhibici syntézy proteinů, působení na syntézu nukleových kyselin,

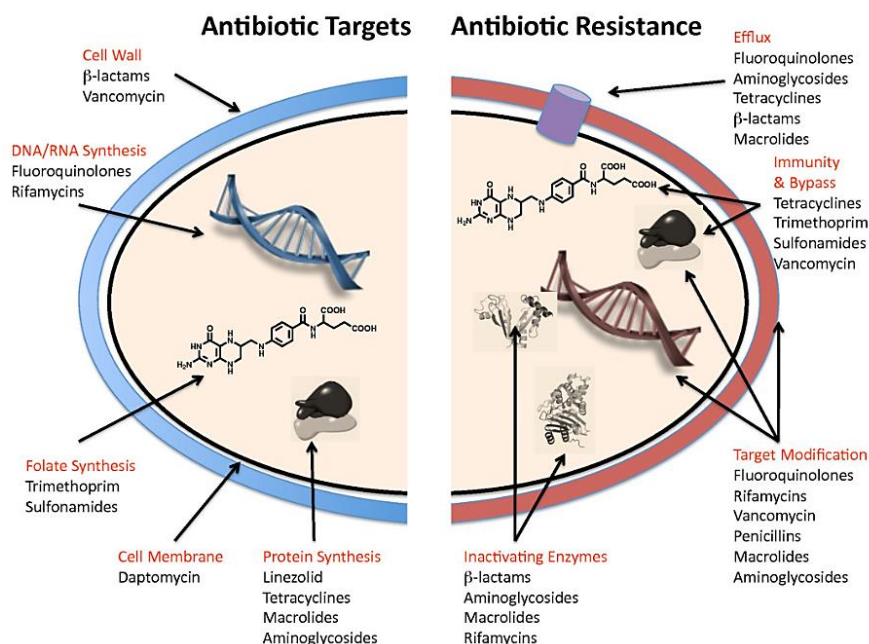
inhibici metabolických pochodů a narušování struktury bakteriální membrány (Tenover, 2006). Příklady ATB rozdělených dle mechanismu účinku jsou vypsány v tabulce 2 (Votava, 2010).

Tabulka 2: Přehled antibiotik dle mechanismu účinku (Votava, 2010)

Cíl působení ATB	Podtřída	Konkrétní ATB/skupina ATB
Buněčná stěna	Beta-laktamy	peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy
	Glykopeptidy	vankomycin
	Antituberkolotika	isoniazid, bakteriostatický ethambutol
Syntéza proteinů	Na 50 S rRNA	bakteriostatické makrolidy, linkosamidy, chloramfenikol
	Na 30 S rRNA	baktericidní aminoglykosidy, bakteriostatické tetracykliny
	Nově vyvíjená	streptograminy, oxazolidinony
Syntéza NK	Inhibující DNA	chinolony, flucytosin, griseofulvin, nitromidazoly
	Inhibující RNA	rifampin
Metabolické dráhy		sulfonamidy, trimethoprim, kyselina <i>p</i> -aminosalicylová, baktericidní cotrimoxazol
Buněčná membrána		polymyxin B, kolistin, ketokonazol, flukonazol, amfotericin B

2.2 Mechanismy rezistence mikroorganismů

Bakterie mohou být přirozeně neboli primárně rezistentní vůči jedné i více třídám antimikrobiálních látek. Bakterie mohou rezistenci také získat díky mutaci nebo přijetí genů podmiňujících rezistenci od jiných organismů, tento druh rezistence nazýváme sekundární (Tenover, 2006). Graficky jsou mechanismy rezistence i mechanismy působení ATB shrnuty na obrázku 8 (Wright, 2010).



Obrázek 8: Cíle působení ATB a mechanismy resistance bakterií (Wright, 2010)

Primární rezistence je dána stavbou nebo metabolickými drahami mikroorganismů. Lze ji využít pro izolaci určité skupiny bakterií a charakterizuje tak daný kmen. Například gramnegativní bakterie jsou přirozeně rezistentní ke glykopeptidům a enterokoky k β -laktamovým antibiotikům (Beneš, 2018).

Sekundární rezistence je rezistence získaná v průběhu života mikroorganismu. Vzniká díky mutaci nebo přenosu genů podmiňujících rezistenci pomocí různých mechanismů (Bello a Dingle, 2018). Díky získaným genům mohou bakterie produkovat enzymy, které ničí antibakteriální léčivo, mohou exprimovat efluxní systémy (díky kterým je léčivo vyloučeno z bakterie a nemůže tak zasáhnout cílenou strukturu v buňce), nebo dochází k modifikaci cílového místa, kde by mělo léčivo působit. Bakterie může získat genetickou informaci pro rezistenci pomocí konjugace, transformace nebo transdukce (Tenover, 2006). Mechanismy, kterými se bakterie brání působení ATB jsou podrobněji popsány v následujících odstavcích.

Enzymatická inaktivace antibiotika

Bakterie se brání působení ATB pomocí tvorby enzymu, který rozkládá molekulu ATB. Například gramnegativní bakterie se brání působení β -laktamových ATB vytvářením enzymu β -laktamázy, která molekuly ATB hydrolyzuje. Geny pro β -laktamázu najdeme u bakterií jak na chromozomu, tak i na plasmidech a traspozonech, což usnadňuje jejich šíření. β -laktamáz existuje více druhů (Bello a Dingle, 2018). Dalšími enzymy schopnými modifikovat ATB jsou

transferázy. Je to rozsáhlá skupina enzymů, která je schopná kovalentně upravovat hydroxylové a aminové skupiny (Wright, 2005).

Zábrana přístupu antibiotika k cílovému místu

V membráně bakterií se nacházejí poriny, kterými procházejí hydrofilní látky dovnitř buňky. Díky porinům mohou do buňky vniknout i hydrofilní ATB (β -laktamy, tetracykliny, chloramfenikol a fluorochinolony). Hydrofobní ATB (např. makrolidy) nejsou závislé na přítomnosti porinů a mohou volně projít lipidovou membránou. Díky selekčnímu tlaku ATB přežívají mutované bakterie bez porinů, nebo se změněnými poriny. Například u *Pseudomonas aeruginosa* byly nalezeny mutace, které vedly ke ztrátě funkce porinu, díky čemuž se nemohly do bakterie dostat ATB. U čeledi *Enterobacteriaceae* byla nalezena mutace, díky které byl průsvit porinů zúžen a molekuly ATB, tak nemohly pronikat dovnitř buňky (Bello a Dingle, 2018).

Efluxní pumpy

Pro antimikrobiální účinnost některých antibiotik je nutné, aby pronikly přímo do bakteriální buňky. Bakterie si proto vyvinuly mechanismus, díky kterému jsou schopné pomocí takzvaných efluxních pump vyloučit ATB ven z buňky. Tento proces vyžaduje dodání energie v podobě ATP (adenosintrifosfát). Geny nesoucí informaci pro vytvoření efluxních pump mohou být přenášeny pomocí plazmidů (Bello a Dingle, 2018). Příkladem hojně vyskytujícího se typu efluxní pumpy je komplex AcrAB-TolC, který najdeme u mnoha gramnegativních bakterií. Tato pumpa dokáže z buňky vyloučit mnoho různých ATB (Du a kol., 2014).

Zábrana aktivace antibiotika

Některá antibiotika jsou v léčivu v neaktivní formě (*prodrug*) a potřebují být aktivována enzymy bakterie. Příkladem antibiotika, které vyžaduje aktivaci je metronidazol. Některé bakterie se adaptovaly a tvoří pozměněný neúčinný enzym nebo utlumí produkci původního enzymu. Antibiotikum bez aktivace je poté neúčinné (Beneš, 2018).

Modifikace cílového místa

Díky modifikaci cílového místa se bakterie brání například působení β -laktamů (penicilin) díky změně struktury molekuly, na kterou se toto ATB váže (Votava, 2010). Jiné

bakterie se brání působení fluorochinolonu díky mutaci DNA gyrázy či topoizomerázy IV (Bello a Dingle, 2018). Oba tyto enzymy patří mezi skupinu topoizomeráz. Topoizomerázy jsou obecně enzymy schopné stočit nebo naopak i rozvolnit DNA (Štípek, 1997). Gyráza je tvořena ze dvou podjednotek a pro obranu před působením antibiotika stačí, aby se pozměnila stavba jedné z nich a bakterie se tak stane rezistentní (Bello a Dingle, 2018).

Náhrada zablokované metabolické dráhy

Bakterie mohou zabránit blokaci své důležité metabolické dráhy vlivem antibiotika tím, že dráhu obmění i přesto, že pro ně bude například energeticky náročnější. Tento mechanismus byl pozorován u enterokoků rezistentních na sulfonamidy. Sulfonamidy blokují syntézu kyseliny listové, rezistentní bakterie dokážou využít kyselinu listovou ze svého okolního prostředí (Beneš, 2018).

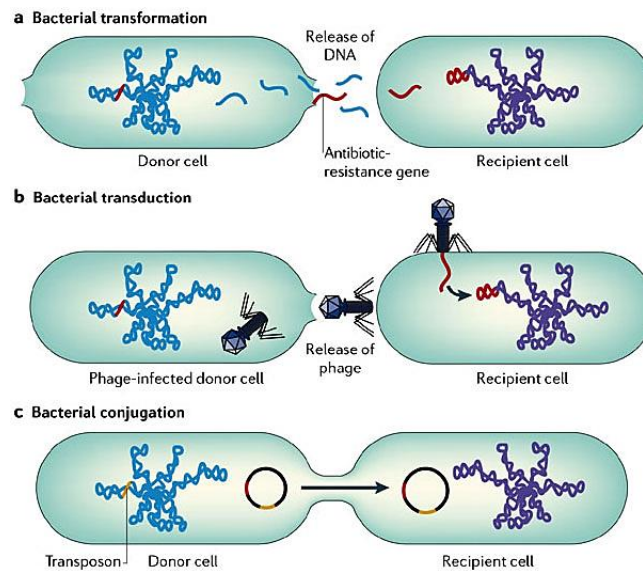
2.3 Přenos genů podmiňujících rezistenci bakterií

Počet mechanismů přenosu genů podmiňujících rezistenci je stručnější oproti počtu mechanismů, kterými se bakterie brání toxickým vlivům prostředí (Harbottle a kol., 2006). Geny se mohou šířit pomocí tzv. klonálního šíření. Tento pojem charakterizuje přenos rezistence z generace na generaci mikroorganismů (Beneš, 2018). Šíření genů, probíhající díky komunikaci buněk mezi sebou na intracelulární úrovni, se nazývá přenos horizontální. V této kategorii známe 3 hlavní mechanismy: transformaci (příjem DNA), transdukcii (přenos pomocí bakteriofágů) a konjugaci (přenos plazmidy a dalšími konjugačními prvky) (Boerlin a Reid-Smith, 2008).

Transformace je mechanismus přijetí exogenní volné DNA. Pro tento proces je nutné, aby měla bakterie vhodně uzpůsobenou buněčnou membránu. Tento proces přenosu genetické informace je mezi bakteriemi velmi rozšířený (Claverys a kol., 2009).

Transdukce je proces, při kterém jsou do bakterie přeneseny geny viru pomocí bakteriofága. Tímto mechanismem se přenáší často R-plazmidy (rezistentní plazmidy), které nesou geny pro enzymy schopné degradovat antibiotika. Tento mechanismus je častý u grampozitivních bakterií (Votava, 2010).

Konjugace probíhá pomocí přímého propojení dvou buněk díky sex-fimbriím a častěji se vyskytuje u gramnegativních bakterií (Votava, 2010). Je to jeden z klíčových mechanismů pro přenos rezistence k antibiotikům (Haaber a kol., 2017). Grafické znázornění transformace, transdukce a konjugace je zachyceno na následujícím obrázku 9.



Obrázek 9: Mechanismy přenosu genu podmiňujících rezistenci (Furuya a Lowy, 2006)

3 METODY PRO DETEKCI BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE

Tato kapitola shrnuje běžně používané metody pro zjištění citlivosti a rezistence bakterií na ATB. Jsou zde zahrnuty starší a běžně používané metody (disková difuzní metoda, E-test a mikrodiluční metoda), které se provádí na agaru nebo na mikrotitrační destičce. V kapitole jsou uvedeny i modernější metody, PCR ve spojení s elektroforézou a MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem), které vyžadují speciální přístrojové vybavení.

V mikrobiologii se určuje několik stupňů účinku ATB na bakterie. Subinhibiční koncentrace ATB neboli minimální antibakteriální koncentrace (MAC) je nejnižší koncentrace ATB, která už lehce poškozuje bakterii, nebo mění její chování, ale bakterie je stále schopná této koncentraci odolávat (Beneš, 2018). Druhou nejčastěji stanovovanou hodnotou je minimální inhibiční koncentrace (MIC) a je určena jako nejnižší koncentrace, při které je zastaven růst mikroorganismu (Votava, 2010). Hodnota této koncentrace slouží jako ukazatel pro účinnost ATB (Beneš, 2018). Poslední hodnotou je minimální baktericidní koncentrace (MBC), která je určena jako nejnižší koncentrace, která během 24 hodin zahubí většinu původního patogenu (Votava, 2010).

3.1 Disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda se provádí pomocí disků, které jsou napuštěny známými koncentracemi ATB. Tato metoda se stále často používá v mikrobiologických laboratořích pro sledování antimikrobiální rezistence. Na Petriho misku se nejprve nanese suspenze připravená z izolovaného testovaného kmene podle předepsaného stupně zákalu stupnice dle McFarlanda. Suspenze se poté nanese na povrch agaru. Disky se umístí pomocí dávkovače na povrch agaru. Takto připravené Petriho misky se zpravidla inkubují 16–24 hodin při 35 °C. Po inkubaci se odečítají průměry inhibičních zón, které se vytvořily kolem jednotlivých disků. Podle referenčních hodnot v tabulkách se porovná, zda velikosti zóny spadá do jedné z kategorií – citlivý mikroorganismus (S), středně citlivý (I) nebo rezistentní (R) (Sandle, 2016).

Na obrázku 10 je vidět agar, na kterém je naočkovaná *Klebsiella pneumoniae*. Na povrch agaru jsou přiloženy disky s různými ATB o známých koncentracích. Kolem

jednoho disku (vpravo nahoře) je vidět, že se nevytvořila inhibiční zóna a naočkovaný kmen je tedy na toto antibiotikum rezistentní (Le Page a kol., 2015).



Obrázek 10: Disková difuzní metoda (Le Page a kol., 2015)

3.2 E-test (Epsilometer test)

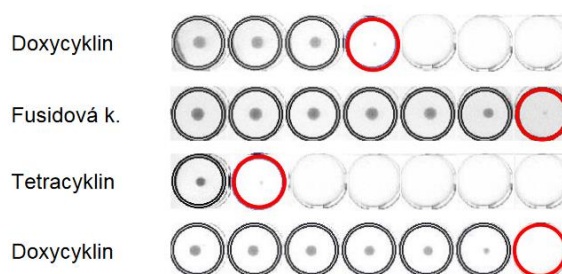
Tento test se provádí pomocí proužku, který je napuštěn postupně se zvyšující koncentrací ATB, jehož účinek na mikroorganismus se testuje. MIC se odečítá z průměru zóny, ve které neroste mikroorganismus (Mishra a kol., 2006). Na jednu misku lze umístit i několik proužků pro otestování více antibiotik, jak je vidět na obrázku 11, tím ovšem rychle narůstá cena provedeného testu (Balouiri a kol., 2016).



Obrázek 11: E-test (www.biomerieux-usa.com, 2019)

3.3 Mikrodiluční bujónová metoda

Tato metoda se provádí pomocí mikrotitrační destičky. Do destičky se pipetují dvojkovým řaděním testované antimikrobiální látky, většinou do každého řádku jeden druh látky. Do každé jamky se poté pipetuje stejný obsah suspenze připravené z fyziologického roztoku a testovaného organismu. Suspenze se připravuje tak, aby její zákal odpovídal stanovené hodnotě zákalu stupnice McFarlanda (Tenover, 2009). Takto připravená destička se inkubuje několik hodin podle toho, jaký organismus je testován. Po inkubaci odečteme hodnotu MIC jako nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která je v jamce, ve které je zcela inhibován růst mikroorganismů (Balouiri a kol., 2016). Na obrázku 12 je příklad této metody. Jamky s MIC jsou znázorněny na obrázku červeně (www.szu.cz, 2019).



Obrázek 12: Mikrodiluční bujónová metoda (www.szu.cz, 2019)

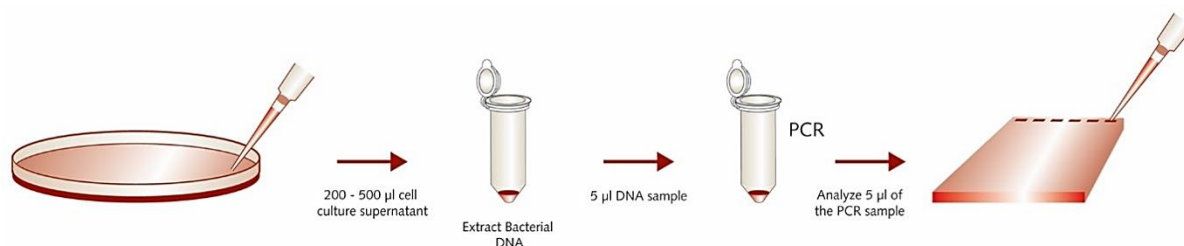
3.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulární metoda umožňující namnožení nukleové kyseliny. Genetickou informaci je poté možno osekvenovat, porovnat s databází a díky tomu prokázat mikroorganismus (Valones a kol., 2009). PCR umožňuje rychle detekovat s dostatečnou citlivostí i bakterie, které není možné jednoduše kultivovat (Amann a kol., 2001). PCR byla vynalezena už roku 1980 a Kary Mullis získal za tento objev roku 1994 Nobelovu cenu (Valones a kol., 2009).

Prvním krokem je izolace DNA z bakteriální suspenze. Poté se provádí namnožení cílených úseků DNA. Pro oba kroky se používají předpřipravené sady (kity), jejichž součástí jsou reakční roztoky. Pro PCR reakci jsou klíčové zejména roztoky obsahující specifické primery pro namnožení hledaného úseku DNA (Adwan, 2014).

Během PCR reakce je nejprve provedena denaturace DNA při vysoké teplotě kolem 92-96 °C po dobu několika sekund. Poté následuje nasednutí primerů při nižší teplotě kolem

45-65 °C. Primery nasedají na specifické úseky DNA. Posledním krokem je elongace DNA, která probíhá při 72 °C. Počet opakování těchto cyklů ovlivní výsledné množství množené DNA. Čím vícekrát cyklus zopakujeme, tím bude větší výtěžek reakce (Mazura a kol., 2001). Zmnožená DNA je poté separována a vyhodnocena pomocí elektroforézy (Adwan, 2014). Pokud se na elektroforetickém gelu v místě odpovídajícímu velikosti namnoženému úseku objeví proužek, je nález pozitivní. Pokud se proužek neobjeví, hledaná struktura v buňce není a daný úsek DNA tedy nemohl být namnožen (Strommenger a kol., 2003). Schematicky je celý proces znázorněn na obrázku 13.

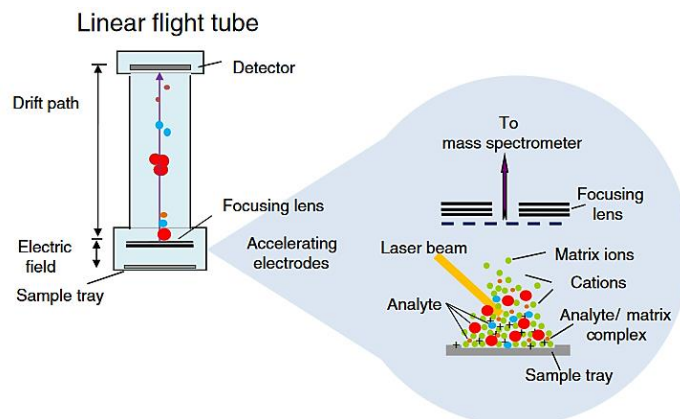


Obrázek 13: Schéma detekce rezistence bakterií pomocí PCR a elektroforézy (www.promocell.com, 2019)

3.5 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS je zkratka anglického názvu *Matrix Assisted Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* a překládá se jako hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem. První varianta této metody pro detekci mikroorganismů byla použita už v roce 1975 a od té doby se výrazně zdokonalila (Wieser a kol., 2012).

Tato metoda se používá v mikrobiologii pro rychlou detekci bakterií, kvasinek nebo i pro zjištění rezistence u bakterií. MALDI-TOF MS identifikace je založena na analýze a porovnání 16S podjednotky ribozomu. Naměřené hodnoty jsou porovnány s databází. Některé organismy, které jsou málo odlišné v 16S podjednotce ribozomu nejde identifikovat (např. *Shigella*). Mikroorganismy je pomocí této metody možné detekovat přímo ze vzorku (např. krevní kultura, moč atp.). Délka měření závisí na počtu vzorků. Jeden vzorek je proměřen přibližně za 5 minut. Schéma přístroje a princip metody je zachyceno na následujícím obrázku 14 (Wieser a kol., 2012).



Obrázek 14: Princip metody MALDI-TOF MS (Wieser a kol., 2012)

Tato technika je velmi citlivá a pro měření se využívá jen velmi malé množství bakteriální suspenze. Během měření je nutné, aby ve stroji bylo vzduchoprázdno. Pomocí pulzů laseru jsou jednotlivé vzorky odpařovány a ionizovány. Vzniklé ionty jsou ještě před vstupem do letové trubice urychleny elektromagnetickým polem. V trubici se pomocí detektoru měří doba letu (TOF) každé částice. TOF je pro každou částici charakteristický, zaznamenává se a tvoří charakterizující spektrum vzorku (Wieser a kol., 2012).

Počítačový software poté porovná naměřené hodnoty s rozsáhlou databází a vygeneruje takzvané skóre (číselná hodnota). Hodnota skóre udává, s jakou přesností je mikroorganismus určen. Pro přesné určení musí být hodnoty skóre vyšší než 2. Rozmezí skóre 1,7 - 2 je dostačující pouze pro rodové zařazení daného izolátu. Na obrázku 15 je příklad počítačového vyhodnocení měření. Na záznamu je vidět, že hodnota skóre je u několika zástupců *E. faecium* vyšší než 2 a jedná se tak jistě o tento mikroorganismus. Shodu databáze najde i s jinými zástupci kmene, kde vyhodnotí skóre nižší (Wieser a kol., 2012).

1 (++)	Enterococcus faecium DSM 17050 DSM	2.298	1352
2 (++)	Enterococcus faecium 20218_1 CHB	2.297	1352
3 (++)	Enterococcus faecium 11037 CHB	2.206	1352
4 (++)	Enterococcus faecium DSM 13589 DSM	2.116	1352
5 (++)	Enterococcus faecium DSM 2146 DSM	2.093	1352
6 (++)	Enterococcus faecium DSM 2918 DSM	2.008	1352
7 (+)	Enterococcus faecium PX_21086109_III MLD	1.949	1352
8 (+)	Enterococcus faecium DSM 6177 DSM	1.862	1352

Obrázek 15: Záznam počítačového vyhodnocení měření pomocí MALDI-TOF MS (Wieser a kol., 2012)

Předností MALDI-TOF MS je rychlost, přesnost, jednoduchá obsluha přístroje a nízká cena za jednotlivé měření. Je možné měřit velké množství vzorků najednou. Pro získání správných výsledků je důležité, aby bylo měření vyhodnoceno proškoleným personálem a výsledky byly správně odečteny. Výsledek měření by měl být porovnán s chorobopisem pacienta a internetovou databází (Scharfen, 2013).

4 APLIKACE FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE PRO DETEKCI BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE

Tato kapitola se věnuje několika případům, které využily pro detekci rezistence mikroorganismů klasickou nebo modifikovanou fluorescenční *in situ* hybridizaci.

4.1 PNA-FISH pro detekci rezistence na klarithromycin u *H. pylori*

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori je gramnegativní tyčinkovitá bakterie způsobující onemocnění žaludku (žaludeční vředy, lymfomy a karcinomy žaludku) (Thung a kol., 2016). K léčbě, která trvá většinou 7-14 dní, je předepisován metronidazol, amoxicilin nebo klarithromycin (Yilmaz, 2007). Léčba má velmi nepříjemné vedlejší účinky. Rezistence na klarithromycin u *H. pylori* je způsobena díky bodové mutaci v genu pro 23S rRNA. Tuto rezistenci najdeme v Evropě až u 20 % izolátů. Nejčastější tři bodové mutace jsou označovány A2142G, A2143G a A2142C, nebo také analogicky Hp1, Hp2, Hp3 (Cerqueira a kol., 2011).

Sondy a jejich cílové struktury

Sondy byly pro tento experiment navrženy tak, aby byly komplementární ke třem zmíněným typům mutací. Byla ještě použita čtvrtá sonda pro detekci běžně vyskytujících se kmenů *H. pylori* Hpwt (*H. pylori* wild type, divoký typ). Pro metodu byly použity PNA sondy o délce 15 nukleotidů. Sekvence, název a označení sond jsou shrnuty v tabulce 3 (Cerqueira a kol., 2011).

Tabulka 3: Přehled sond pro detekci rezistence na klarithromycin u *H. pylori* (Cerqueira a kol., 2011)

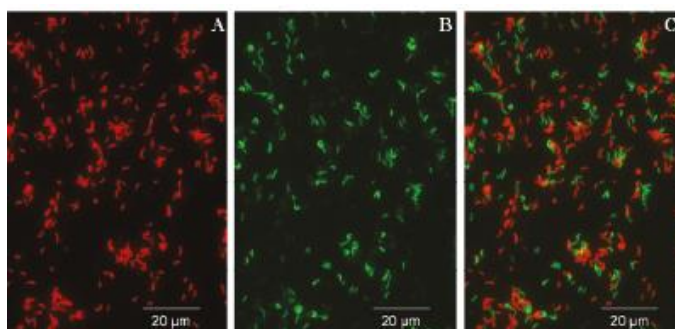
Název sondy	Cílová struktura	Sekvence sondy	Fluorochrom
Hp1	A2143G	5'-GGG TCT <u>C</u> TC CGT CTT-3'	Alexa Fluor 488
Hp2	A2142G	5'-GGG TCT <u>T</u> CC CGT CTT-3'	Alexa Fluor 488
Hp3	A2142C	5'-GGG TCT <u>T</u> GC CGT CTT-3'	Alexa Fluor 488
Hpwt		5'-GGG TCT <u>T</u> TC CGT CTT-3'	Alexa Fluor 594

Hybridizace

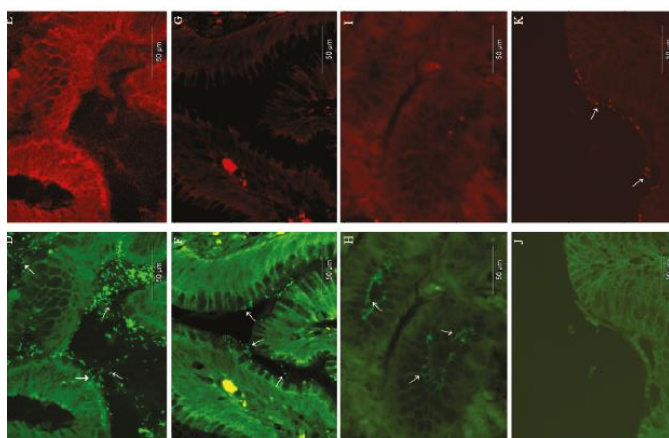
Pro experiment byly použity vodné bakteriální suspenze. Pro permeabilizaci a fixaci byl použit 4% paraformaldehyd a 50% ethanol. Hybridizační roztok byl složen z: 4 hybridizačních sond (celková koncentrace 200 nM), 10% dextran sulfátu, 10 mM NaCl, 30% formamidu, 0,1% difosforečnanu tetrasodného, 0,2% polyvinyl pyrrolidinu, 0,2% Ficoll (2-(chloromethyl)oxirane;(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-[(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxy-methyl)oxolan-2-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)cyclohexane-1,2,3-triol), 0,5 mM disodium EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 0,1% Triton X-100 a 50 mM Tris-HCl. Hybridizace probíhala 1 hodinu při 70 °C. Poté byly vzorky promyty promývacím roztokem, který obsahoval: 5 mM Tris pufru, 15 mM NaCl a 1% Triton X-100. Promývací krok trval 30 minut a byl proveden při teplotě 70 °C (Cerqueira a kol., 2011).

Výsledky experimentů

Pro první experiment bylo použito celkem 33 kmenů *H. pylori*, z toho 31 bylo klinických izolátů a 2 kmeny byly vybrány ze sbírky. V prvním experimentu bylo 20 kmenů, z 33 použitých kmenů, rezistentních. Experiment byl poté upraven pro použití na vzorcích tkáně žaludku. Pro tento účel bylo použito 39 vzorků získaných od pacientů, u kterých byla prokázána rezistence pomocí antibiogramu. Vzorky tkáně byly fixovány pomocí parafínu a byly zalaty do bločků. Bločky byly nařezány na řezy o tloušťce 3 μm. Pomocí xylolu a ethanolu byly vzorky zbaveny parafínu a rehydratovány. U zaschnutých vzorků tkáně byla provedena hybridizace za stejných podmínek (kromě fixace) jako u bakteriálních suspenzí. Celý experiment v tomto případě trval 4 hodiny a 15 minut. Pro ověření výsledků FISH byl použit E-test a sekvenace. Výsledky kontrolních měření a FISH byly shodné. Metoda je tedy schopna rozlišit rezistentní a citlivé kmeny *H. pylori* v bakteriální suspenzi i ve vzorcích žaludeční tkáně. Na obrázku 16 je záznam z fluorescenčního mikroskopu s bakteriální suspenzí *H. pylori*. Při použití červeného filtru jsou viditelné citlivé bakterie, na které byly navázány sondy Hpwt označené červenou fluorescenční barvou Alexa Fluor 594. Při použití zeleného filtru jsou viditelné rezistentní bakterie, na které se navázaly sondy Hp1, Hp2 a Hp2 označené zelenou fluorescenční barvou Alexa Fluor 488. Při použití obou filtrů je dobře viditelná směs rezistentních a citlivých kmenů *H. pylori*. Na obrázku 17 jsou snímky tkání s *H. pylori*, citlivé a rezistentní bakterie jsou označeny analogicky, jako u vzorku bakteriální suspenze (Cerqueira a kol., 2011).



Obrázek 16: Záznam z fluorescenčního mikroskopu: *H. pylori* citlivé i rezistentní bakterie (Cerqueira a kol., 2011)



Obrázek 17: Záznam z fluorescenčního mikroskopu: *H. pylori* ve vzorcích z biopsie (Cerqueira a kol., 2011)

Příklady podobných studií

Již dříve bylo publikováno několik podobných studií. V roce 2005 byl v *Journal of Clinical Microbiology* publikován článek popisující využití komerčně dostupné testovací FISH sady (seaFASTH, pyloriCombi-Kit; SeaPro Theranostics International, Lelystad, Nizozemí) pro detekci *H. pylori* a jeho citlivosti ke klarithromycinu. Testovací sada obsahovala čtyři sondy, tři sondy byly komplementární k bodovým mutacím a jedna sonda sloužila pro odhalení *H. pylori*. Pro metodu byly použity vzorky tkáně žaludku. Vzorky byly zalité do parafinových bločků a před provedením FISH byly parafinu zbaveny. Po odstranění parafinu tato metoda zabrala přibližně 3 hodiny. Metoda byla testována na 35 vzorcích tkáně bez *H. pylori*, 35 vzorcích tkáně se senzitivními kmeny *H. pylori* a 33 vzorcích s rezistentním kmeny *H. pylori*. Výsledky metody byly ověřeny agarovou diluční metodou a shodovaly se (Morris a kol., 2005).

Ve Španělské studii z roku 2007 byla použita komerčně dostupná testovací sada pro FISH (creaFAST, Oxoid Ltd., vyráběná ve Velké Británii). Komerčně dostupná sada obsahovala opět čtyři sondy, tři komplementární k bodovým mutacím podmiňujícím rezistenci na klarithromycin a jednu sondu k detekci *H pylori*. Bylo testováno 33 vzorků žaludeční tkáně dětských pacientů. Tato studie je zajímavá tím, že se zaměřuje na vzorky získané od dětí. Obsah bakterií ve tkáni žaludku dětí bývá nižší než u dospělých se stejným onemocněním. Použitá testovací sada nebyla primárně určena pro sledování bakterií v tkáni. Doporučovaný postup testovací sady musel být lehce pozměněn, z důvodu rušení pozadí. Jako kontrolní metoda byl použit E-test. U dvou vzorků vyšly u E-testu a FISH odlišné výsledky, dle metody FISH se jednalo o bakterie citlivé na klarithromycin, dle E-testu byly tyto dva vzorky označeny jako intermediární. Tato studie se také odkazuje na šest již dříve provedených studií, jednou z nich je studie uvedená v předchozím odstavci (Vega a kol., 2007)

V roce 2007 byla publikovaná podobná studie v Íránu. Ve studii bylo pomocí metody FISH otestováno 50 vzorků žaludeční tkáně. Pro ověření správnosti výsledků byl použit E-test. Výsledky E-testu a metody FISH byly shodné (Moosavian a kol., 2007).

Roku 2017 byly v Turecku provedena studie, kdy bylo pomocí komerčně dostupné sady (BactFUSH *H. pylori* Combi-Kit IZINTA Trading Co. Ltd, Budapešť, Maďarsko) otestováno 234 vzorků tkáně žaludku od pacientů. Sada opět obsahovala čtyři již zmíněné sondy. Byly použity vzorky tkáně zalité do parafinových bločků, před hybridizací byly opět nejprve zbaveny parafínu. Provedení testu zabralo necelé 3 hodiny (Demiray-Gürbüz a kol., 2017).

PNA sondy byly použité také v Korejské studii z roku 2018. Studie byly provedena na 70 vzorcích a byla v 98,6% shodná se Sangerovou metodou sekvenování (Jung a kol., 2018).

4.2 FISH pro detekci rezistence na makrolidy u *Campylobacter* spp.

***Campylobacter* spp.**

Kampylobaktery (např. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, a *C. upsaliensis*) způsobují těžká průjmová onemocnění (Haas a kol., 2008) a aborty u domácích zvířat. Kampylobaktery se běžně vyskytují v zažívacím traktu ptáků a zvířat a jsou to gramnegativní spirálovité bakterie (Votava, 2010).

Pro léčbu kampylobakterií se často předepisují makrolidy. Rezistence na tato antibiotika narůstá. Rezistentní kmeny mají mutaci genu pro 23S rRNA. Kampylobaktery způsobující onemocnění u lidí jsou až u 5 % případů rezistentní, u zvířat je výskyt rezistentních

kmenů častější, rezistentních je až 80 %. Mechanismus účinku makrolidů spočívá ve vazbě na 50S podjednotku ribozomu, čímž brání syntéze proteinů (Haas a kol., 2008).

Sondy a jejich cílové struktury

Pro hybridizaci byly použity dva typy oligonukleotidových sond. Byla použita sonda Cwt 23S pro identifikaci divokých (citlivých) kampylobakterů. Pro identifikaci rezistentních kmenů byla použita sonda Cres 23S 2059A>G. Další informace o sondách jsou uvedeny v tabulce 4 (Haas a kol., 2008).

Tabulka 4: Přehled sond pro detekci rezistence na makrolidy u *Campylobacter* spp. (Haas a kol., 2008)

Název sondy	Sekvence sondy	Fluorochrom
Cwt 23S	5'- CGG GGT CT <u>T</u> TCC GTC TT -3'	6-carboxyfluorescein (6-FAM)
Cres 23S 2059A>G	5'- CGG GGT CT <u>C</u> TCC GTC TT -3'	Cy3

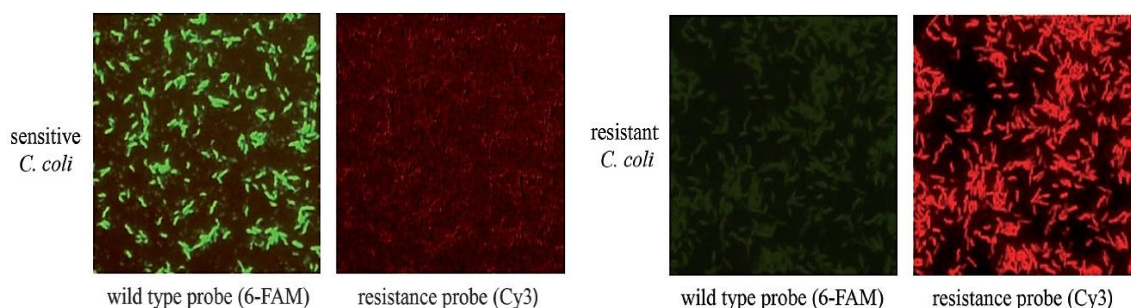
Hybridizace

Bakteriální kultury byly fixovány pomocí 2% paraformaldehydu po dobu 30 minut (Haas a kol, 2008). Po fixaci byly bakterie ještě dehydratovány pomocí 50%, 80% a 96% ethanolu. Po fixaci byl přidán hybridizační roztok, který obsahoval: 0,9 M NaCl, 0,02 M Tris/HCl, 0,01% SDS (dodecylsírán sodný), 30% formamid a 5 ng/μl každé sondy. Hybridizace probíhala 90 minut při 46 °C ve vlhké komůrce. Vzorky byly promyty promývacím pufrům zahřátým na 48 °C. Promývací pufr obsahoval: 0,112 M NaCl, 20 mM Tris/HCl a 0,01% SDS. Vzorky byly ještě opláchnuty PBS (fosfátový pufr) a zafixovány do montovacího média. Poté byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu a vyhodnoceny (Trebesius a kol, 2000).

Výsledky experimentů

Nejprve byly sondy otestovány na jednom citlivém a jednom rezistentním kmenu *C. coli*. Ne/přítomnost mutace byla podložena pomocí FRET PCR (*Real-time fluorescence resonance energy transfer PCR*). Na záznamu z fluorescenčního mikroskopu na obrázku 18 je vlevo citlivý kmen, který je dobře viditelný při použití zeleného filtru. Došlo zde k navázání sond Cwt 23S označených zelenou fluorescenční barvou. Při použití červeného filtru nejsou

citlivé bakterie se zeleně zbarvenou sondou dobře viditelné. Na snímcích vpravo je rezistentní kmen *C. coli*, který je lépe viditelný při použití červeného filtru. Na rezistentní kmeny se navázaly sondy Cres 23S 2059A>G (Haas a kol., 2008).



Obrázek 18: Snímky z fluorescenčního mikroskopu: *C. coli* (Haas a kol., 2008)

Po tomto úvodním experimentu byla metoda otestována na 70 kmenech *Campylobacter* spp., z nichž bylo 33 kmenů citlivých (MIC <2 µg/l), 33 s vysokou rezistencí (MIC >8 µg/ml) a 4 s mírnou rezistencí (MIC 2–8 µg/ml). Toto rozdělení bylo určeno na základě E-testu a mikrodiluční bujónové metody (Haas a kol., 2008).

Tato metoda se prokázala jako spolehlivá pro detekci rezistence na makrolidy. Provedení testu zabralo méně než 2 hodiny. Dnes běžně využívané metody zaberou 1 - 2 dny. Princip metody by mohl být využitelný pro detekci rezistence na makrolidy u dalších bakterií. Pro další využití metody je nutné vhodně upravit sondy (Haas a kol., 2008).

Příklady podobných studií

Další příklady využití FISH pro detekci rezistence u *Campylobacter* spp. nejsou známy. V roce 2013 byl publikován souhrn metod pro detekci rezistence u *Campylobacter* spp. V této publikaci jsou uvedeny příklady využití sekvenace a PCR metod a je zde zmíněna uvedená FISH pro detekci rezistence na makrolidy (Ge a kol., 2013).

4.3 LNA-FISH pro detekci rezistence na linezolid u *Enterococcus* spp.

***Enterococcus* spp.**

Enterokoky jsou běžnou součástí lidské střevní mikroflóry, mohou však způsobovat infekce krevního oběhu. Významnými zástupci jsou *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* (Garvey a kol., 2017). Jsou to grampozitivní koky, u kterých se objevují rezistence

na vankomycin. Tyto rezistentní kmeny se označují jako VRE (vankomycin rezistentní enterokoky). Pro léčbu infekcí způsobených VRE se používá linezolid (Werner a kol., 2007). Bohužel i na linezolid vznikají rezistence. Rezistence na linezolid je způsobena mutací (2576G>T) v genu pro 23S podjednotku rRNA. Kmeny bakterií, které mají MIC vyšší, nebo rovnou 8 mg/l jsou definované jako rezistentní. Různé druhy bakterií mají různý počet alel pro 23S rRNA. *Staphylococcus aureus* nese 5 alel, *E. faecalis* 4 alely a *E. faecium* 6 alel. U *E. faecium* způsobí rezistenci na linezolid mutace už v 1 alele ze všech 6, u *E. faecalis* je pro vytvoření rezistence nutná mutace 2 alel ze 4 (Werner a kol., 2004). Mechanismus účinku linezolidu spočívá v inhibici syntézy proteinů (Werner a kol., 2007).

Sondy a jejich cílové struktury

Pro metodu byly použity celkem tři DNA sondy obsahující LNA na místě bodové mutace. Sonda pro detekci enterokoků citlivých na linezolid byla označena zeleně a sonda pro detekci rezistentních enterokoků byla označena červeně. Pro pozitivní kontrolu hybridizace byla použita sonda EUB338, která se váže téměř na všechny bakterie. Sondy, jejich sekvence a označení fluorochromem jsou shrnuty v tabulce 5 (Werner a kol., 2007).

Tabulka 5: Přehled sond pro detekci rezistence na linezolid u *Enterococcus* spp. (Werner a kol., 2007; Amann a kol., 1990)

Název sondy	Rezistence	Sekvence sondy	Fluorochrom
Bez názvu	citlivý kmen	5'- CCC AGC TCG CGT GC-3'	FITC
Bez názvu	linezolid	5'- CCC AGC TAG CGT GC -3'	Cy3
EUB338	kontrolní sonda	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	neuvedeno

Hybridizace

Pro experiment byly použity kultury kultivované na agaru s ovčí krví. Po kultivaci byly bakterie resuspendovány ve fyziologickém roztoku a byla připravena bakteriální suspenze se stupněm zákalu 0,5 dle McFarlanda. Suspenze byla nanášena na sklíčko a zafixována pomocí methanolu (Peters a kol., 2006). Ke vzorkům byl přidán hybridizační roztok obsahující sondy, formamid, 0,9 M NaCl, 20 mM TrisHCl o pH 7,2 a 0,01 % SDS (Manz a kol., 1992).

Hybridizace a promývání bylo provedeno za pomoci mikrovln. Hybridizační komůrka byla umístěna do nádoby s vodou přehřátou na 46 °C a byla pomocí mikrovln zahřáta

na 48 °C, poté se nechala vychladnout opět na 46 °C. Tento proces byl zopakován pro hybridizaci čtyřikrát (Peters a kol., 2006).

Nenavázané sondy byly odstraněny pomocí promývacího roztoku: 20 mM Tris pufr, 0,01 % SDS, 180 mM NaCl, 5 mM EDTA. Promývání probíhalo při 48 °C 20 minut během tří mikrovlnných cyklů zahřátí. Každý cyklus zahřívání trval 4,5 minuty, celkem tedy hybridizace a promytí zabrali méně než 1 hodinu (Peters a kol., 2006). Poté byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou, usušeny a bylo přidáno montovací médium (Manz a kol., 1992).

Výsledky experimentů

Experiment byl proveden nejprve na 23 kmenech *Enterococcus* spp. Poté byl experiment proveden na 83 klinických izolátech. Oba experimenty potvrdily, že je tato metoda ve 100 % případech spolehlivá pro identifikaci mutace v genu pro 23S podjednotku rRNA způsobující rezistenci na linezolid. MIC u bakterií byla stanovena pomocí mikrodiluční metody. U rezistentních bakterií byl určován počet mutovaných alel pro 23S rRNA gen pomocí technologie LabChip a pomocí aparatury BioAnalyzer 2100 (Werner a kol., 2007).

Příklady podobných studií

Další příklady využití FISH pro detekci rezistence na linezolid u enterokoků nejsou známy. V roce 2004 byl publikován článek popisující detekci rezistence na linezolid u *E. faecium* pomocí Real-Time PCR. Metoda cílila na stejnou bodovou mutaci (2576G>T) v genu pro 23S podjednotku rRNA, jako předchozí popisovaná FISH metoda. Metoda byla otestována na 72 kmenech *E. faecium* a výsledky metody byly shodné s výsledky LabChip technologie s využitím aparatury BioAnalyzer 2100 (Werner a kol., 2004).

4.4 FISH a CARD-FISH pro detekci rezistence u spor *Bacillus cereus*

Bacillus cereus a jeho spory

Spora je klidové stádium bakterie a díky možnosti přejít do tohoto stádia mohou bakterie přežít i velmi nepříznivé podmínky. Spory rodu *Bacillus* dokážou dlouhou dobu odolávat UV záření, γ záření, nepříznivému pH, extrémní teplotě, tlaku a suchu a jsou odolné vůči dezinfekčním prostředkům. Metoda FISH pro detekci spor bakterií musí být modifikována, protože díky velké odolnosti spor nemohou dovnitř buňky proniknout sondy. Byly proto vyvinuty efektivní postupy pro permeabilizaci spor (Laflamme a kol., 2009).

Spora je obalena několika ochrannými vrstvami a každá vrstva má jiné složení. Na vnější straně je exosporium, které je tvořené proteiny, polysacharidy a lipidy. Poté následuje plášť spory, který je tvořen proteiny. Další vrstvou je kůra, která je tvořena stlačenými lipidy. Tato vrstva je málo propustná a chrání jádro obsahující DNA. Přesná stavba spory je u každé bakterie jiná. Proto je postup permeabilizace pro každý mikroorganismus jiný (Laflamme a kol., 2009).

Pro experiment bylo využito několik kmenů *B. cereus*. Rezistentní spory *B. cereus* byly získány díky transformaci plazmidu pC194. Rezistentní spory *B. cereus* měly 20-50 plazmidů pC194 na chromozom. Tento plazmid obsahuje tzv. *cat* gen, který je zodpovědný za rezistenci na chloramfenikol. Do dalšího kmene *B. cereus* byl pomocí elektroporace vložen plazmid pMTL500Eres nesoucí *erm* gen způsobující rezistenci na erythromycin. Spory obsahovaly 2 kopie *erm* genu na chromozom. Byl použit i *B. cereus* rezistentní na rifampicin. Tato rezistence byla podmíněna polymorfismem jednoho nukleotidu na chromozomu. Kmeny byly kultivovány společně s danými antibiotiky a spory byly získány kultivací na YLHG médiu po 7-14 dnech při 37 °C (Laflamme a kol., 2009).

Byla testována klasická metoda FISH, CARD-FISH a in situ PCR. Metody byly provedeny na zmíněných kmenech *B. cereus* (Laflamme a kol., 2009).

Sondy a jejich cílové struktury

Pro metodu bylo použito šest oligonukleotidových sond. Jako kontrolní sodna pro ověření permeabilizace byla použita sonda EUB338 a pro negativní kontrolu byla použita sonda notEUB383. Sonda EUB338 byla značena biotinem, a byla poté inkubována se streptavidinem na který byla navázána fluorescenční barva Alexa 488 (zelená). Dále byly použity dvě sondy pro detekci rezistence na rifampicin (RIF) (pozitivní Rif 1432-1450M a negativní kontrola Rif 1432 1450WT), jedna sodna pro detekci rezistence na chlormafenikol (CAT) (pC194cat134) a sonda pro detekci rezistence na erythromycin (ERY) (pMTLerm129). Tyto sondy byly označeny fluoresceinem (FITC) pro metodu FISH a pro metodu CARD-FISH byly označeny biotinem. Přehled sond je shrnut v tabulce 6 (Laflamme a kol., 2009).

Tabulka 6: Přehled sond pro FISH a CARD FISH pro detekci rezistence u *B. cereus* (Laflamme a kol., 2009)

Název sondy	Rezistence	Sekvence sondy	Označení
EUB338	bez	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	biotin
notEUB338	bez	5'-CGA CGG AGG GCA TCC TCA-3'	biotin
pC194cat134	CAT	5'-AGC AGA CAA GTA AGC CTC CTA-3'	biotin, FITC
pMTLerm129	ERY	5'-AAC GAC GAA ACT GGC TAA A-3'	biotin, FITC
Rif 1432-1450M	RIF	5'-GAG TTA ACT TAT AAA CGA A-3'	biotin, FITC
Rif 1432-1450WT	bez	5'-GAG TTA ACT CAT AAA CGA A-3'	biotin, FITC

Hybridizace

Hybridizaci předcházela permeabilizace. Permeabilizační činidlo bylo navrženo tak, aby zůstala zachována integrita spor, a přitom mohla sonda dobře proniknout do buňky.

Spory byly nejprve inkubovány s enzymem proteinkinásou K, aby bylo rozrušeno exosporium. Proteiny v plášti byly denaturovány pomocí směsi močoviny, SDS a DTT (dithiotreitol; (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol). Na kůru bylo působeno směsí lysozymu a mutanolysinu. Nakonec byly pomocí 1% SDS rozpuštěny stlačené lipidy v kůře.

Pro běžnou FISH byl nejprve zahřát hybridizační roztok na 42 °C. Hybridizační roztok se skládal z: 0,9M NaCl, 0,01% SDS, 20 mM Tris-HCl o pH 7,6, 6,5 ng/ml dané sondy. Každý vzorek byl hybridizován při 46 °C po dobu 2 hodin.

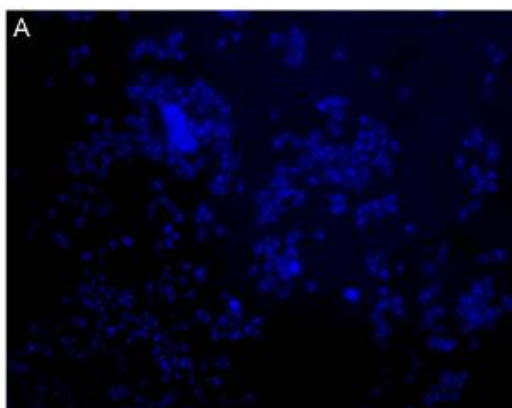
Pro CARD FISH byla použita komerčně dostupná sada (kit 22 od sopečnosti Molecular Probes). Po provedení hybridizace byl přidán blokovací roztok. Poté byl přidán roztok obsahující HRP-streptavidin a po něm byl přidán tyramid. Mezi jednotlivými kroky byly spory promyty pomocí PBS (Laflamme a kol., 2009).

Výsledky experimentu

Tato studie ukazuje, že je možné detekovat přítomnost genů podmiňujících rezistenci u *B. cereus* pomocí *in situ* metod během přibližně 6 hodin. Pomocí klasické FISH nebylo možné detekovat ani jednu testovanou rezistenci. CARD-FISH byla schopná detekovat pouze *cat* gen, který byl přítomen v počtu 20-50 kopií. V dalších dvou případech se CARD-FISH neosvědčila. Jako detekční limit se u CARD-FISH uvádí 100-1000 kopií daného genu v prokaryotické buňce. Výsledek experimentu tak není překvapivý. *In situ* PCR umožnila detekci všech

hledaných genů. V porovnání s klasickou FISH má *in situ* PCR signál 50-100krát silnější a oproti CARD-FISH 7-20 krát silnější.

Na snímcích na obrázku 19 je zachycen snímek z metody CARD-FISH se spórami *B. cereus*. Na spóry obsahující *cat* gen se navázala sonda pC194cat134 značená biotinem, na který byla navázána DAPI (modrá barva) (Laflamme a kol., 2009).



Obrázek 19: Detekce rezistence na chloramfenikol u spor *B. cereus* (Laflamme a kol., 2009)

Příklady podobných studií

Další metody pro detekci rezistence u spor *Bacillus* spp. nejsou známy. Roku 2012 byla popsána metoda pro detekci a výpočet nožství spor *B. pulmius* SAFR-032 pomocí FISH. Tato metoda využila pro narušení pouzdra spor velmi podobný protokol, jako metoda právě popsaná. Byly použity dvě FISH sondy, EUB338 a sonda BP15 specifická pro *B. pulmilus* SAFR-032 (Mohapatra a La Duc, 2012).

4.5 Detekce rezistence na ATB inhibující syntézu peptidoglykanů

Tato metoda slouží k detekci bakterií, které jsou rezistentní na ATB, která působí na buněčnou stěnu. Princip metody spočívá v pozorování, zda bakterie vystavená antibiotiku a poté lyzačnímu činidlu bude mít narušenou buněčnou membránou či nikoliv. U rezistentních bakterií zůstává buněčná stěna neporušená. U bakterií bez rezistence se do okolního prostředí uvolní DNA. Přítomnost DNA se zobrazuje pomocí FISH (Santiso a kol., 2011).

Rezistence na ATB inhibující syntézu peptidoglykanů

Rezistence na hojně používané β -laktamy (peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy, aj.) je způsobená řadou mutací. Může být způsobena změnou propustnosti buněčné membrány, snížením počtu porinů v buněčné membráně, zvýšenou syntézou efluxních pump, zvýšenou syntézou penicilin vázajících proteinů (PBPs), nebo změně struktur PBPs. Nejčastějším mechanismem je tvorba enzymu β -laktamázy, který ničí β -laktamové ATB (Bush a Jacoby, 2010).

Sondy a jejich cílové struktury

U této metody byly použity dvě celogenomové sondy, které byly připraveny izolací DNA z testovaných bakterií. Sondy byly označeny biotinem. Biotin byl na DNA sondy navázán pomocí procesu, který se označuje jako *nick-translation* (Santiso a kol., 2011) neboli metoda využívající posun jedno řetězcových zlomů. Metoda využívá působení dvou enzymů, a to nejprve enzym DNAsu, která vytvoří jednořetězcové zlomy. Poté se pomocí enzymu DNA polymerázy I zlomy opraví a dojde k jejich posunu ke 3' konci (Beránek, 2016). Díky této metodě se do vlákna začlení označené nukleotidy (Kočárek, 2007).

Hybridizace

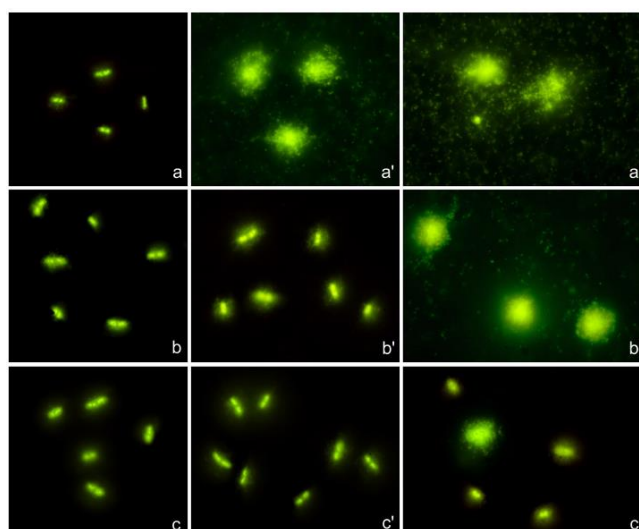
Bakteriální kultury byly nejprve kultivovány s ATB. Bakterie byly dehydratovány v několika krocích pomocí roztoku tvořeného methanolem a kyselinou octovou, poté pomocí zvyšující se koncentrace ethanolu (70, 90, 100%). Sklíčka s kulturou byly ponořeny do roztoku 75% formamidu, 2 \times SSC pufr (*saline-sodium citrate buffer*, pufr tvořený roztokem citronanu sodného a chloridu sodného) o pH 7 a teplotě 67 °C na 90 sekund, tím byla zajištěna denaturace DNA. Poté byla sklíčka s kulturami opět ponořena do lázni s postupně rostoucí koncentrací ethanolu (70, 90, 100%) o teplotě 20 °C, do každé vždy na 5 minut.

Na vysušená sklíčka byl přidán hybridizační roztok o pH 7 obsahující denaturované sondy o koncentraci 4,3 ng/ μ l sond, 50% formamid, 2 \times SSC, 10% dextran sulfát, 100 mM fosforečnan vápenatý. Hybridizace probíhala při 37 °C přes noc ve vlhké komůrce bez přístupu světla. Poté byla sklíčka dvakrát promyta pomocí promývacího roztoku o složení: 50% formamid, 2 \times SSC o pH 7,0, vždy po dobu 5 minut a poté byla dvakrát promyta pomocí dalšího promývacího roztoku obsahujícího 2 \times SSC o pH 7,0, po dobu 3 minut při 37 °C. Poté byl přidán blokovací roztok: 4 \times SSC, 0,1% Triton X-100, 5% BSA (*bovine serum albumin*, hovězí sérový albumin) na 5 min opět při 37 °C. Na sklíčka byl přidán roztok obsahující

streptavidin označený fluorochromem Cy3 v roztoku s $4 \times \text{SSC}$, 0,1% Triton X-100, 1% BSA (1:200). Sklíčka byla promyta třikrát pomocí $4 \times \text{SSC}$, 0,1% Triton X-100 vždy po dobu 2 minut a poté byla kontrastně obarvena pomocí DAPI (Santiso a kol., 2011).

Výsledky experimentu

Bylo provedeno několik experimentů. Nejprve byl proveden experiment pro potvrzení schopnosti rozlišit citlivé, intermediární a rezistentní bakterie. Pro tento účel bylo vybráno 10 kmenů *E. coli*. Kmeny byly kultivovány s různými koncentracemi amoxicilinu a kyseliny klavulánové. Koncentrace byly stanoveny tak, aby bylo možné určit, zda se jedná o citlivý kmen (lýze při koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ amoxicilinu a 4 $\mu\text{g/ml}$ k. klavulánové), intermediární (lýze při koncentraci 32 $\mu\text{g/ml}$ amoxicilinu a 16 $\mu\text{g/ml}$ k. klavulánové), nebo rezistentní (bakterie zůstaly nezměněny). Snímky z tohoto experimentu jsou na obrázku 20. V prvním sloupci jsou snímky vzorků, ke kterým nebylo přidáno žádné ATB. Na těchto snímcích je dobře vidět přirozený tvar *E. coli*. Ve druhém sloupci, jsou vzorky bakterie, ke kterým bylo přidáno 8 $\mu\text{g/ml}$ amoxicilinu a 4 $\mu\text{g/ml}$ k. klavulánové. Na prvním řádku, druhého sloupce je citlivý kmen a jeho membrány byly rozrušeny i nízkou koncentrací ATB. Na druhém řádku, druhého sloupce je vidět intermediární kmen. Ve třetím sloupci jsou snímky vzorků, ke kterým bylo přidáno 32 $\mu\text{g/ml}$ amoxicilinu a 16 $\mu\text{g/ml}$ k. klavulánové. Na posledním řádku jsou snímky zachycující rezistentní kmen, který odolává i vysoké koncentraci ATB a jeho membrány zůstávají z velké části neporušeny (Santiso a kol., 2011).



Obrázek 20: Záznamy z fluorescenčního mikroskopu: *E. coli* testovaná na citlivost k amoxicilinu a klavulánové kyselině (Santiso a kol., 2011)

V dalším kroku bylo pozorováno pozadí vzorků a byla prováděna jeho optimalizace. Byl zkoumán i vliv kultivačních podmínek a inkubační doby na správnost odečtu výsledku měření. Kultura, která neroste nebo je ve stacionární fázi, není tolik náchylná k β -laktamům. Doba kultivace s antibiotiky byla stanovena na 60 minut u kultur rostoucích 24 hodin na tuhém médiu a na 30 minut pro kultury rostoucí exponenciálně v tekutém médiu. Nakonec byla metoda otestována na 46 klinických izolátech. Tato metoda je tedy vhodná pro klinické využití ale i pro výzkum mechanismů působení ATB na buněčnou stěnu (Santiso a kol., 2011).

Příklady podobných studií

Bylo publikováno několik článků popisujících podobnou metodu. Tyto články ovšem nepoužívají pro označení DNA sondy, ale barví DNA přímo, například pomocí fluorochromu *SYBR Gold*. V roce 2009 byly provedeny dvě studie (Tamayo a kol., 2009; Santiso a kol., 2009). První z nich popisuje působení chinolonů, konkrétně ciprofloxacinu na *E. coli*. Bylo popsáno, že fragmentace DNA se zvyšuje s rostoucí dávkou ATB a také, že bakterie kultivované v tekutém LB (Luria-Bertani) médiu měli po působení ciprofloxacinu více poškozenou DNA, než bakterie vystavené stejným podmínkám ale kultivované na LB agaru (Tamayo a kol., 2009). Druhý článek popisuje aplikaci vyvinuté testovací sady, díky které je možné detekovat rezistentní kmeny *E. coli* na ciprofloxacin. Tento test zabere 80 minut a byl proveden na 95 odlišných klinických izolátech *E. coli*. Výsledky testu byly porovnány s E-testem, mikrodiluční metodou a všechny použité kmeny byly osekvenovány. Výsledky všech testů byly shodné (Santiso a kol., 2009).

V roce 2012 byla publikována další velmi podobná studie popisující detekci rezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii* na karbapenemy (konkrétně meropenem) a ciprofloxacin. Princip metody je naprosto shodný s předchozími zmíněnými metodami. Bakterie jsou vystaveny nejprve působení ATB a poté lyzačnímu roztoku. Bakteriální DNA je obarvena *SYBR Gold*. Výsledky se vyhodnocují pomocí fluorescenčního mikroskopu, kdy u citlivých bakterií dojde k fragmentaci DNA a ta je uvolněna do okolí, u rezistencí bakterií DNA zůstává uvnitř buňky. Tato metoda byla použita na 322 klinických izolátech *A. baumannii* (Bou a kol., 2012). Roku 2013 byla publikována další podobná studie popisující detekci rezistentních kmenů *A. baumannii* na kolistin. Metoda byla opět velmi podobná. Byla provedena na 66 izolátech a celkový čas této metody je 3 hodiny a 30 minut (Tamayo a kol., 2013).

4.6 Detekce úseků plazmidů kódujících β -laktamázy

Tato metoda je zajímavá tím, že popisuje detekci molekul mRNA. Dále byly pomocí imunofluorescence identifikovány odpovídající proteiny. Tyto dva testy byly ještě porovnány s kolorimetrickým nitrocefínovým testem pro hodnocení enzymatické aktivity TEM β -laktamázy (Rohde a kol., 2016).

Bakterie s rezistencí na ATB inhibující syntézu peptidoglykanů

Bakterie schopné produkovat β -laktamázy se běžně vyskytují v prostředí a produkce β -laktamáz je jednou z nejčastějších příčin rezistence k antimikrobiálním látkám. Geny podmiňující tuto rezistenci se často nacházejí na plazmidech a díky tomu se mohou snadno šířit mezi jednotlivými kmeny (Rohde a kol., 2016).

Sondy a jejich cílové struktury

Pro tuto metodu FISH byly použity celkem tři sondy. Jejich označení a cílová struktura jsou shrnuty v tabulce 7. Jeden typ sond cílil na přepis TEM β -laktamáz do mRNA. Další typ cílil na rRNA, tento typ sondy sloužil pro určení druhu bakterií. Hybridizační roztok obsahoval vyšší koncentrace sond cílených na mRNA, díky tomu bylo možné mRNA molekuly detekovat. Detekovat mRNA v bakteriích není tak snadné, jako detekovat rRNA, jelikož mRNA je v bakterii menší množství (Rohde a kol., 2016).

Tabulka 7: Přehled sond pro detekci úseků plazmidů kódujících β -laktamázy (Rohde a kol., 2016)

Název sondy	Sekvence sondy	Cílová struktura	Fluorochrom	
Enterobac-Alexa488	5'-TCG TGT TTG CAC AGT GCT GTG TTT-3'	23S rRNA	Alexa 488	
Enterobac-Komp	5'-TCG TGT TTG CAG AGT GCT GTG TTT-3'	23S rRNA	-----	
Bla-TEM-CalFluor610	5'-GGAAATGTTGAATACTCAT CAGGAAGGCAAAATGCCGC CAGCATCTTTACTTTAC GATCCAGTTCGATGTAACC GTTCTTCGGGGCGAAAAC CGCCACATAGCAGAACTTT GACCGAGTTGCTCTTGCCC GTGAGTACTCAACCAAGTC CTCTTACTGTCATGCCATC CCGCAGTGTATCACTCAT TTAGTCTCTTCGGTCTCC CAAGGCGAGTTACATGATC CGTCTTTGGTATGGCTTC GCAACGTTGTTGCCATTGC GCCGGGAAGCTAGAGTAAG GTCCTGCAACTTTATCCGC CAGCAATAAACCCAGCCAGC CAATGATACCCGAGACCC TAACTACGATACGGGAGGG TATTTGTTTATCCATAGT ACCAATGCTTAATCAGTGA	AAAAGGGAATAAGGGCGAC GCGTTTCTGGGTGAGCAAA CTCGTGCACCAACTGATC CAAGGATCTTACCGCTGTT AAGTGCTCATCATTGGAAA CGTCAACACGGGATAATAC TCTGAGAATAGTGTATGCG TAAAGATGCTTTCTGTGAC TTATGGCAGCACTGCATAA TCGTTGTCAGAAAGTAAGTT CCATGTTGTGCAAAAAAGC TCAGCTCCGGTCCCAACG CAGGCATCGTGGTGCACG GTTCCGCAGTTAATAGTTT CCATCCAGTCTATTAATTG GAAGGGCCGAGCCGAGAAG GCTCACCGGCTCCAGATTT TACCATCTGCCCCAGTGC CCTGACTCCCGTCGTGTA CACCTATCTCAGCGATCTG-3'	mRNA	Fluor 610

Hybridizace

Bakteriální kultury byly fixovány pomocí roztoku 4% PBS / formaldehyd po dobu 2 hodin při teplotě 4 °C. Po promytí pomocí PBS, byly buňky přeneseny do směsi PBS a 50% ethanolu. Tato směs byla pipetována na sklíčko, které bylo vysušeno pomocí zahřátí na 52 °C. Dalším krokem byla dehydratace kultury pomocí 50, 80 a 96% ethanolu, vždy po dobu 3 minut. Sklíčka byla potažena hybridizačním roztokem: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl o pH 7,2, 0,01% SDS, 15% formamid a FISH sondy o celkové koncentraci 800 nM (20 nM každé sondy). Hybridizace probíhala při teplotě 30 °C, přibližně 1,5 hodiny ve vlhké komůrce, ve tmě. Sklíčka byla poté opláchnuta destilovanou vodou a promyta roztokem: 310 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl o pH 7,2, 0,01% SDS při 30 °C. Po dalším oplachu destilovanou vodou byla sklíčka vložena do roztoku obsahujícího DAPI (Rohde a kol., 2016).

Výsledky experimentu

Každý bakteriální kmen byl testován ve třech nezávislých hybridizačních experimentech. Metoda byla otestována na několika kmenech bakterií, z nichž některé nesly rezistenci a jiné byly citlivé. Použité kmeny jsou shrnuty v tabulce 8. Metoda zabrala celkově přibližně 5 hodin (Rohde a kol., 2016).

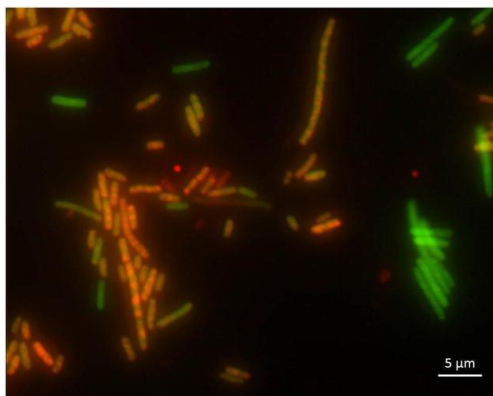
Tabulka 8: Přehled testovaných bakterií u kterých byly detekovány úseky plazmidů kódujících β -laktamázy (Rohde a kol., 2016)

Kmen	Rezistence	Plazmid
<i>E. coli</i> DH5 α	ampicilin	pLitmus38; pUC18; vektor pBR328
<i>E. coli</i> ATCC35218	ampicilin	TEM-1 gen
<i>E. coli</i> DH5 α	bez rezistence	-
<i>E. coli</i> Gene Hogs	bez rezistence	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833	ampicilin	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K2	ampicilin	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> My6107	ampicilin	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> DSM 13030	ampicilin	-

Poté bylo použito 25 izolátů *E. coli* z různých environmentálních vzorků a s různými TEM variantami k ověření spolehlivosti metod. Na závěr byly připraveny směsi bakteriálních

kultur (*Salmonella enterica*, termofilní *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157). U metody bylo prokázáno že je možné ji využít i pro druhovou identifikaci.

Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu na obrázku 21 je vidět červeně označené TEM β -laktamové mRNA. Zeleně jsou označeny úseky rRNA charakteristické pro enterobakterie. Překrytí červené a zelené sondy se projeví oranžovožlutým signálem. Oranžovožluté zbarvení tedy značí navázání obou sond (Rohde a kol., 2016).



Obrázek 21: Detekce β -laktamáz u *E. coli* (Rohde a kol., 2016)

Metoda FISH se v tomto případě osvědčila a bylo pomocí ní možné identifikovat všechny kmeny produkující TEM β -laktamázu během přibližně 5 hodin. I další dvě provedené metody měly úspěšné výsledky. Nitrocefínová metoda je rychlá a dostupná, není ale vhodná pro pozorování jednotlivých buněk a je méně citlivá v případě, kdy je ve vzorku malé množství rezistentních bakterií. Je z těchto metod ale nejrychlejší, zabere méně než 1 hodinu. Imunofluorescenční metoda se osvědčila jako velmi citlivá. Její nevýhodou je nejvyšší cenová a časová náročnost, zabere přibližně 7 hodin a déle (Rohde a kol., 2016). Podobné studie nejsou známé.

4.7 FISH s nano sondami pro detekci rezistence na ampicilin u *E. coli*

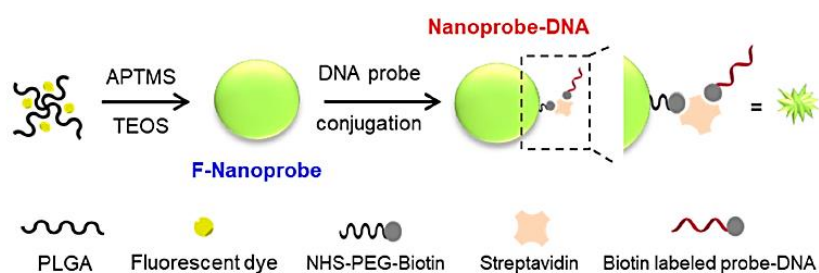
E. coli

E. coli je gramnegativní bakterie, která má mezi vnější a vnitřní membránou periplazmatický prostor tvořený peptidoglykany. β -laktamová ATB působí právě na tuto vrstvu peptidoglykanů, ke které se dostanou skrz poriny ve vnější membráně. β -laktamy, mezi které patří například zmíněný ampicilin, zabraňují tvorbě peptidoglykanů a tím i buněčnému dělení. Bakterie se tomuto působení brání tvorbou β -laktamáz (enzymy schopné

štěpit β -laktamová ATB), nebo zúžením či snížením počtu porinů ve vnější membráně (Zamani a kol., 2019). Pro studii byl použit kmen *E. coli* DH5a a pro vytvoření rezistentního kmene *E. coli* byl použit plazmid pUC19 (Lee a kol., 2019).

Sondy a jejich cílové struktury

Pro tuto metodu byly sondy připraveny dle schématu na obrázku 22. Nejprve byly spojeny molekuly fluorescenčního barviva s PLGA (2-(2-hydroxyacetyl) oxypropanová kyselina). Pro každý typ sondy bylo použité jiné barvivo. PLGA byla použita pro zvýšení stability fluorescenčních barev. Poté byla PLGA napojena na APTMS ((3-aminopropyl) trimethoxysilan). Dalším krokem bylo vysolování pomocí TEOS (tetraethyl orthosilikát) ve směsi cyklohexanu a vodného roztoku L-argininu. Po vysolování bylo možné oddělit sondy pomocí centrifugace. Přes APTSM byla navázána na sondu daná sekvence ssDNA. V dalším kroku se nechala sonda reagovat s biotinem. Po navázání biotinu a promytí byl přidán k sondám streptavidin. Takto připravené sondy byly promyty a rozmíchány ve fosfátovém pufru (Lee a kol., 2019).



Obrázek 22: Schéma přípravy nanosondy (Lee a kol., 2019)

Byly připraveny dva typy sond, *F nano sonda rrnB* pro detekci *E. coli*, označená zelenou fluorescenční barvou. *F nano sonda rrnB* byla komplementární k úseku 16S rDNA. Druhá sonda nesla označení *R nano sonda bla*, tato sonda byla označena červeným fluorescenčním barvivem a byla komplementární k sekvenci *bla* genu, podmiňujícího rezistenci na ampicilin. Sekvence sond a další informace jsou shrnuty v tabulce 9 (Lee a kol., 2019).

Tabulka 9: Přehled sond pro detekci rezistence na ampicilin u *E. coli* (Lee a kol., 2019)

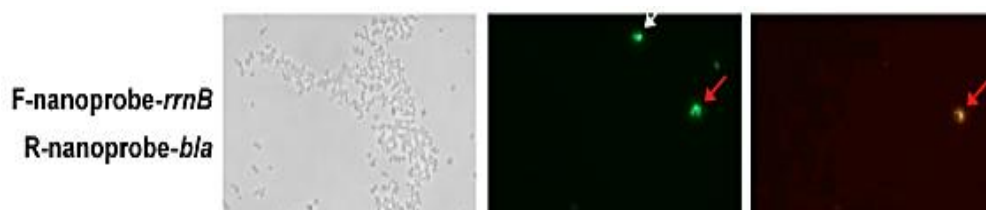
Název sondy	Sekvence	Cílová struktura	Barevné označení
<i>F nano sonda rrnB</i>	5'-GCW GCC WCC CGT AGG WGT-3'	16S rDNA	FITC
<i>R nano sonda bla</i>	5'-AGT GGT CCT GCA ACT TTA TCC CTC CGA TCG TTG TCA GAA GTA AG-3'	bla gen	rhodamin-B isothiokyanát

Hybridizace

Před hybridizací byly bakterie permeabilizovány pomocí 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 3-12 hodin při 4 °C. Poté byly bakterie rozmíchány v 50% roztoku ethanolu. Tato suspenze byla pipetována na sklíčka pokrytá tenkou vrstvou želatiny. Sklíčka byla vysušena. Poté byla sklíčka ponořena vždy na 30 minut do lázni s rostoucí koncentrací ethanolu (50, 80 a 95%) a následně vysušena. Zahřátý hybridizační roztok o složení: 0,9 NaCl, 20mM Tris-Cl o pH 8, 0,01% SDS, formamid a 10 pmol nanosond byl přenesen na sklíčko s bakteriemi. Poté bylo přiloženo krycí sklíčko. Hybridizace probíhala 4 hodny při 46 °C. Po hybridizaci bylo odstraněno krycí sklíčko a sklíčka byla opláchnuta promývacím roztokem o složení: 5mM EDTA, 20mM Tris-Cl o pH 8, 0,01% SDS, NaCl. Promývací krok probíhal 10 minut při 48 °C, poté byla sklíčka opláchnuta studenou vodou (Lee a kol., 2019).

Výsledky experimentu

Na obrázku 23 vidíme tři snímky. První snímek zachycuje bakterie ve světelném mikroskopu. Další dva snímky jsou z fluorescenčního mikroskopu. Červená šipka označuje jednu buňku, u které se navázaly obě sondy. Tato skutečnost dokazuje, že je možné detekovat rezistenci i bakteriální druh současně. Zeleným fluorescenčním barvivem jsou označeny buňky *E. coli*, červeným barvivem jsou označeny buňky nesoucí gen podmiňující rezistenci na ampicilin. Výhodou této metody je silný fluorescenční signál sond. Sondy jsou také dobře stabilní na světle a mají stabilní pH (Lee a kol., 2019).



Obrázek 23: Snímky *E. coli* ze světelného a fluorescenčního mikroskopu (upraveno dle Lee a kol., 2019)

Příklady podobných studií

Další využití nano sond pro detekci rezistence u bakterií není známé. Nano sondy se dají ale využít například pro včasné odhalení rakoviny. Pomocí nano sond komplementárních k mRNA je možné sledovat přímo v buňkách nadměrnou expresi mRNA, či detekovat mRNA spojované s tumory (Li a kol., 2012; Pan a kol., 2013).

ZÁVĚR

Tato práce shrnuje téma antimikrobiální rezistence a její detekce, a to zejména pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Velkou výhodou FISH pro detekci antimikrobiální rezistence je rychlý odečet výsledků, a to v rámci několika hodin. Doba provedení diagnostiky se v uvedených člancích pohybuje v rozmezí 2 hodin až 1 dne. Oproti tradičním kultivačním metodám (disková difuzní metoda, E-test, mikrodiluční metoda) trvajícím několik dní je to pokrok. Většina zmíněných metod pracovala až s kultivovanými a izolovanými bakteriemi, a ne přímo s odebraným vzorkem. U některých metod FISH je možné použít přímo vzorek.

Článků popisujících detekci rezistence pomocí FISH zatím není mnoho. Našla jsem pouze 11 článků popisujících uplatnění FISH pro detekci rezistence. Studie cílí zejména na detekci rezistence podmíněnou bodovou mutací v genu pro 23S podjednotku rRNA. Cílit na rRNA je výhodné, protože rRNA se nachází v buňkách všech organismů ve velkém množství. Pro detekci rRNA lze použít běžnou FISH. Metodu FISH je možné použít i pro detekci rezistence u spor. U spor je klíčové narušit všechny vrstvy, aby mohly sondy proniknout k DNA či RNA.

Další alternativou je pomocí FISH označit celou DNA bakterie a pozorovat působení antibiotik inhibujících syntézu peptidoglykanů a narušujících integritu buněčné stěny bakterií. Tato metoda využívá přímé působení antibiotik na vzorek. Je možné ji použít i pro určení účinné koncentrace antibiotika a je tak podobná tradičnějším metodám jako je mikrodiluční bujónová metoda.

Pokud se použije vyšší koncentrace sond, je možné detekovat i molekuly mRNA. V případě detekce rezistencí podmíněných malým počtem genů je nutné využít modifikovanou FISH, která bude mít zesílený signál. Takovým překladem je CARD-FISH. Jako detekční limit je u této metody uváděno rozmezí 100 až 1000 kopií daného genu v prokaryotické buňce. Pokud je kopií genu v buňce ještě méně, musí být zvolena jiná metoda, například *in situ* PCR.

Kromě CARD-FISH existuje mnoho dalších modifikací FISH. Sondy používané pro FISH jsou zdokonalovány, aby měly lepší vaznost a stálost. Vyrábějí se už i komerčně dostupné testovací sady pro detekci rezistence.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ADWAN, K. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant *staphylococci*. *Folia Microbiologica*. 2014, roč. 59, č. 1, s. 5-8.
2. AMANN, R. I., B. J. BINDER, R. J. OLSON, S. W. CHISHOLM, R. DEVEREUX a D. A. STAHL. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*. 1990, roč. 56, č. 6, s. 1919-1925.
3. AMANN, R., SNAIDR, J., WAGNER, M., LUDWIG, W. a SCHLEIFER, K. H. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *Journal of bacteriology*. 1996, roč. 178, č. 12, s. 3496–3500.
4. AMANN, R., B. M. FUCHS a S. BEHRENS. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, roč. 12, č. 3, s. 231-236.
5. BALOUIRI, M., M. SADIKI, a S. K. IBNSOUDA. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, roč. 6, č. 2, s. 71-79.
6. BAUMAN, J. G. J., J. WIEGANT, P. BORST a P.VAN DUIJN. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Experimental Cell Research*. 1980, roč. 128, č. 2, s. 485-490.
7. BELLO, A. a T. C. DINGLE. What's that resistance mechanism? Understanding genetic determinants of gram-negative bacterial resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2018, roč. 40, č. 15, s. 165-174.
8. BENEŠ, J. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
9. BERÁNEK, M. *Molekulární genetiká pro bioanalytiku*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 8024632241;9788024632247.
10. BOERLIN, P. a R. J. REID-SMITH. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews*. 2008, roč. 9, č. 2, s. 115-126.
11. BOU, G., F. M. OTERO, R. SANTISO, M. TAMAYO, M. d. C. FERNANDEZ, M. TOMAS, J. GOSALVEZ a J. L. FERNANDEZ. Fast assessment of resistance to carbapenems and ciprofloxacin of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, roč. 50, č. 11, s. 3609-3613.
12. BURNETT-BOOTHROYD, S.C. a B.J. MCCARTHY. Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. *Textiles for Hygiene and Infection Control*. Elsevier, 2011. ISBN 9781845696368.
13. BUSH, K. a G. A. JACOBY. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010, roč. 54, č. 3, s. 969-976.

14. CERQUEIRA, L., N. F. AZEVEDO, C. ALMEIDA, T. JARDIM, C. W. KEEVIL a M. J. VIEIRA. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, roč. 9, č. 10, s. 1944-1960.
15. CERQUEIRA, L., R. M. FERNANDES, R. M. FERREIRA, F. CARNEIRO, M. D. RIBEIRO, C. FIGUEIREDO, C. W. KEEVIL, N. F. AZEVEDO a M. J. VIEIRA. PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiology*. 2011, roč. 11, č. 1, s.1-7.
16. CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004, roč.17, č. 4, s.840-862.
17. CLAVERY, J. P., B. MARTIN a P. POLARD. The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009, roč. 33, č. 3, s. 643-656.
18. DEMIRAY-GÜRBÜZ, E., Ö. YILMAZ, A. Z. OLIVARES, et al. Rapid identification of *Helicobacter pylori* and assessment of clarithromycin susceptibility from clinical specimens using FISH. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2017, roč. 3, č.1, s. 29-37.
19. DU, D., Z. WANG, N. R. JAMES, et al. Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014, roč. 509, č. 7501, s. 512-515.
20. FRICKMANN, H., A. E. ZAUTNER, A. MOTER, J. KIKHNEY, R. M. HAGEN, H. STENDER, a S. POPPERT. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017, roč. 43, č. 3, s. 263-293.
21. FURUYA, E. Y. a F. D. LOWY. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*. 2006, roč. 4, č. 1, s. 36-45.
22. GARIBYAN, L. a N. AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, roč. 133, č. 3, s. 1-4.
23. GARVEY, M. I., C. W. BRADLEY a E. HOLDEN. Blossoming vancomycin-resistant *Enterococci* infections. *Journal of Hospital Infection*. 2017, roč. 97, č. 4, s. 421-423.
24. GE, B., F. WANG, M. SJÖLUND-KARLSSON a P. F. MCDERMOTT. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiological Methods*. 2013, roč. 95, č. 1, s. 57-67.
25. GREIMERS, R., M. TREBAK, M. MOUTSCHEN, N. JACOBS a J. BONIVER. Improved four-color flow cytometry method using fluo-3 and triple immunofluorescence for analysis of intracellular calcium ion ([Ca²⁺]_i) fluxes among mouse lymph node B- and T-lymphocyte subsets. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1996, roč. 23, č. 3, s. 205-217.
26. HAABER, J., J. R. PENADÉS a H. INGMER. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*. 2017, roč. 25, č. 11, s. 893-905.

27. HAAS, M., A. ESSIG, E. BARTELT, a S. POPPERT, Detection of resistance to macrolides in thermotolerant *Campylobacter species* by fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008, roč. 46, č. 11, s. 3842-3844.
28. HARBOTTLE, H., S. THAKUR, S. ZHAO a D. G. WHITE. Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*. 2006, roč. 17, č. 2, s. 111-124.
29. HOLMES A. H., L. S. P. MOORE, A. SUNDSFJORD, M. STEINBAKK, S. REGMI, A. KARKEY, P. J. GUERIN a L. J. V. PIDDOCK. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016, roč. 387, č. 10014, s. 176-187.
30. HUBER, D., L. VOITH VON VOITHENBERG a G.V. KAIGALA. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? *Micro and Nano Engineering*. 2018, roč. 1, č. 1, s.15-24.
31. CHEN, A.Y.Y. a A. CHEN. Fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, roč. 133, č. 5, s. 1-4.
32. JAHAN-TIGH, R. R., C. RYAN, G. OBERMOSER a K. SCHWARZENBERGER. Flow cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012, roč.132, č.10., s.1-6.
33. JUNG, D. H., J.H. KIM, S. J. JEONG, S. Y. PARK, I.M. KANG, K. H. LEE a Y. G. SONG. Peptide nucleic acid probe-based analysis as a new detection method for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut and Liver*. 2018, roč. 12, č. 6, s. 641-647.
34. JURETSCHKO, S. a T. R. FRITSCHKE. Applications of fluorescence *in situ* hybridization in diagnostic microbiology. *Molecular microbiology*. American Society of Microbiology, 2011, s. 3-19. ISBN 9781555814977.
35. KAREN, I., V. KOLEK, M. MATOUŠKOVÁ, H. ROHÁČOVÁ, J. HERCOGOVÁ, M. TROJÁNEK, F. ROB. *Antibiotická terapie respiračních, močových a kožních infekcí v ordinaci všeobecného praktického lékaře: doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře 2018*. Praha: Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Společnost všeobecného lékařství, 2018. ISB N 978-80-88280-11-8.
36. KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 9788070134504.
37. KUBOTA, K. CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and environments*, 2013, roč. 28, č. 1, s. 3-12.
38. LAFLAMME, C., L. GENDRON, N. TURGEON, G. FILION, J. HO, a C. DUCHAINE. *In situ* detection of antibiotic-resistance elements in single *Bacillus cereus* spores. *Systematic and Applied Microbiology*. 2009, roč.32, č.5, s. 323-333.
39. LE PAGE, S., A. VAN BELKUM, C. FULCHIRON, R. HUGUET, D. RAOULT a J. M. ROLAIN. Evaluation of the PREVI® Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015, roč. 34, č. 9, s. 1859-1869.

40. LEE, W. S., S. LEE, T. KANG, Ch. M. RYU a J. JEONG. Detection of ampicillin-resistant *E. coli* using novel nanoprobe-combined fluorescence *in situ* hybridization. *Nanomaterials*. 2019, roč.9, č.5, s.1-10.
41. LEVSKY, J. M. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*. 2003, roč. 116, č. 14, s. 2833-2838.
42. LI, N., C. CHANG, W. PAN a B. TANG. A multicolor nanoprobe for detection and imaging of tumor-related mRNAs in living cells. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, roč. 51, č. 30, s. 7426-7430.
43. MACVILLE, M., T. VELDMAN, H. PADILLA-NASH, D. WANGSA, P. O'BRIEN, E. SCHRÖCK, a T. RIED. Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. *Histochemistry and Cell Biology*. 1997, roč.108, č.4-5, s.299-305.
44. MALEK, A., A. SCOTT, S. PAMPANIN a G. MACRAE. Post-event damage assessment of concrete using the fluorescent microscopy technique. *Cement and Concrete Research*. 2017, roč. 102, s. 203-211.
45. MANZ, W., R. AMANN, W. LUDWIG, M. WAGNER a K. H. SCHLEIFER. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*. 1992, roč. 15, č. 4, s. 593-00.
46. MAZURA, I., K. MICHALOVÁ, R. BRDIČKA a J. MÁCHA. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum, 2001. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0258-X.
47. MISHRA, K. K., S. SRIVASTAVA, A. GARG a A. AYYAGARI. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* clinical isolates: comparative evaluation of disk-diffusion and E-test methods. *Current Microbiology*. 2006, roč. 53, č. 4, s. 329-334.
48. MOHAPATRA, B. R. a M. T. LA DUC. Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization to detect encapsulated *Bacillus pumilus* SAFR-032 spores released from poly(methylmethacrylate). *Microbiology and Immunology*. 2012, roč. 56, č. 1, s. 40-47.
49. MOOSAVIAN, M., S. TAJBAKHSH a A. R. SAMARBAF-ZADEH. Rapid detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) compared with the E-test. *Annals of Saudi Medicine*. 2007, roč. 27, č. 2, s.84-88.
50. MORRIS, J. M., A. L. REASONOVER, M. G. BRUCE, D. L. BRUDEN, B. J. MCMAHON, F. D. SACCO, D. E. BERG a A. J. PARKINSON. Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescent *in situ* hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, roč. 43, č. 7, s. 3494-3496.
51. PAN, W., T. ZHANG, H. YANG, W. DIAO, N. LI a B. TANG. Multiplexed detection and imaging of intracellular mRNAs using a four-color nanoprobe. *Analytical Chemistry*. 2013, roč. 85, č. 21, s. 10581-10588.

52. PETERS, R. P. H., M. A. VAN AGTMAEL, A. M. SIMOONS-SMIT, S. A. DANNER, C. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS a P. H. M. SAVELKOUL. Rapid identification of pathogens in blood cultures with a modified fluorescence *in situ* hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, roč. 44, č. 11, s. 4186-4188.
53. PGI, D. a R. RATHNAYAKA. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in food pathogen detection. *International Journal of Molecular Biology*. 2018, roč. 3, č. 3, s. 143-149.
54. PICOT, J., C. L. GUERINC, LE VAN KIM a C. M. BOULANGER. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012, roč. 64, č. 2, s. 109-130.
55. PINKEL, D. a D. G. ALBERTSON. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature Genetics*. 2005, roč. 37, č.6., s.11-17.
56. ROHDE, A., J. A. HAMMERL a S. AL DAHOUK. Rapid screening for antibiotic resistance elements on the RNA transcript, protein and enzymatic activity level. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2016, roč. 15, č. 1, s. 1-8.
57. RUDKIN, G. T. a B. D. STOLLAR. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature*. 1977, roč. 265, č. 5593, s. 472-473.
58. SALZMAN, G. C., M. E. WILDER a J. H. JETT. Light scattering with stream-in-air flow systems. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 2017, roč. 27, č. 1, s. 264-267.
59. SANDLE, T. Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology*. Elsevier, 2016 ISBN 9780081000229.
60. SANTISO, R., M. TAMAYO, J. L. FERNANDEZ, M. DEL CARMEN FERNANDEZ, F. MOLINA, R. VILLANUEVA, J. GOSALVEZ a G. BOU. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, roč. 47, č. 8, s. 2593-2595.
61. SANTISO, R., M. TAMAYO, J. GOSÁLVEZ, G. BOU, M. DEL CARMEN FERNANDEZ a J. L. FERNÁNDEZ. A rapid *in situ* procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. *BMC Microbiology*. 2011, roč. 11, č. 1, s. 1-14.
62. SHAPIRO, H. M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2003. ISBN 04-714-1125-6.
63. SCHARFEN, J. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, 2013. Mikrobiologie. ISBN 978-80-87009-32-1.
64. SILAHTAROGLU, A., H. PFUNDHELLER, A. KOSHKIN, N. TOMMERUP a S. KAUPPINEN. LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenetic and Genome Research*. 2004, roč. 107, č. 1-2, s.32-37.
65. STROMMENDER, B., C. KETTLITZ, G. WERNER a W. WITTE. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, roč. 41, č. 9, s.4089-4094.

66. ŠTÍPEK, S. *Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace*. Praha: Medprint, 1997. Učební texty (Medprint). ISBN 80-902-0362-0.
67. TAMAYO, M., R. SANTISO, F. OTERO a kol. Rapid determination of colistin resistance in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* by use of the micromax assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, roč. 51, č. 11, s. 3675-3682.
68. TAMAYO, M., R. SANTISO, J. GOSALVEZ, G. BOU a J. FERNÁNDEZ. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an *in situ* DNA fragmentation assay. *BMC Microbiology*. 2009, roč 9, č.1, s. 1-11.
69. TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 2006, roč. 119, č. 6, s. S3-S10.
70. TENOVER, F.C. Antibiotic Susceptibility Testing. *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd edition. London: Elsevier, 2009. ISBN 978-0-12-373944-5.
71. THUNG, I., S. GUPTA, J. Y. PARK, S. E. CROWE, M. A. VALASEK, V. VAVINSKAYA a H. ARAMIN. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2016, roč. 43, č.4, s. 514-533.
72. TREBESIUS, K., K. PANTHEL, S. STROBEL, K. VOGT, G. FALLER, T. KIRCHNER, M. KIST, J. HEESEMANN a R. HAAS. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridisation. *Gut*. 2000, roč. 46, č. 5, s. 608-614.
73. VALONES, M. A. A., R. L. GUIMARÃES, L. A. C. BRANDÃO, P. R. E. de SOUZA, A. de A. T. CARVALHO a S. CROVELA. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, roč. 40, č. 1, s. 1-11.
74. VEGA, A. E., T. ALARCÓN, D. DOMINGO a M. LÓPEZ-BREA. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in frozen gastric biopsies from pediatric patients by a commercially available fluorescent *in situ* hybridization. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007, roč. 59, č. 4., s. 421-423.
75. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.
76. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie-vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
77. WERNER, G., B. STROMMENGER, I. KLARE a W. WITTE. Molecular detection of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* by use of 5' nuclease real-time PCR compared to a modified classical approach. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, roč. 42, č.11, s. 5327-5331.
78. WERNER, G., M. BARTEL, N. WELLINGHAUSEN, A. ESSIG, I. KLARE, W. WITTE a S. POPPERT. Detection of mutations conferring resistance to linezolid in *Enterococcus* spp. by fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, roč. 45, č. 10, s. 3421-3423.

79. WIESER, A., L. SCHNEIDER, J. JUNG a S. SCHUBERT. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics--identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 93, č. 3, s. 965-74.
80. WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, roč. 57, č. 10, s. 1451-1470.
81. WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*. 2010, roč. 8, č. 1, s. 1-6.
82. XIA, Y., R. ZHANG, Z. WANG, J. TIAN a X. CHEN. Recent advances in high-performance fluorescent and bioluminescent RNA imaging probes. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46.10: 2824-2843.
83. YILMAZ, Ö. Clinical role and importance of fluorescence *in situ* hybridization method in diagnosis of *H. pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H. pylori* eradication therapy. *World Journal of Gastroenterology*. 2007, roč. 13, č. 5, s. 671-675.
84. ZAMANI, E., S. CHATTERJEE, T. CHANGA, C. IMMETHUN, A. SARELLA, R. SAHA a S. K. DISHARI. Mechanistic understanding of the interactions of cationic conjugated oligo-and polyelectrolytes with wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1, s. 1-12.
85. www.biomerieux-usa.com. ETEST® Telavancin. In: *Biomerieux-usa* [online]. 2019 [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/styles/original/public/etest_telavancin-strips-smaller_0.png
86. www.mzcr.cz. Akční plán Národního antibiotického programu České republiky (AP NAP) na období 2019-2022. In: *Ministerstvo zdravotnictví České republiky* [online]. Praha, 05.02.2019 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: www.mzcr.cz/Verejne/Soubor.ashx?souborID=36416&typ=application/pdf&nazev=Ak%C4%8Dn%C3%AD%20pl%C3%A1n%20NAP%202019-22.pdf
87. www.olympus-lifescience.com. ABRAMOWITZ, M., B. HERMAN, D.B. MURPHY, M. W. DAVIDSON. Anatomy of the Fluorescence Microscope. In: *Olympus lifescience* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy/>
88. www.promocell.com.PCR Bacteria Test Kit: Test Kit for Conventional PCR. In: *PromoCell* [online]. [cit. 2019-07-24]. Dostupné z: https://www.promocell.com/product/pcr-bacteria-test-kit/#tab-data_figures
89. www.sukl.cz. Počet infekcí vyvolaných mikroby odolnými vůči antibiotikům se zvyšuje. In: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, 20. 11 2018 [cit. 2019-06-16]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/pocet-infekci-vyvolanych-mikroby-odolnymi-vuci-antibiotikum-1>
90. www.szu.cz. Stanovení MIC u nenáročných a náročných bakterií. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 19.1.2019 [cit. 2019-05-22]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/MIC/Navod_k_odecitani_BMD_v_1.0_2019.pdf

91. www.thermofisher.com.Fluorophore Selection, *Thermo Fisher: Scientific* [online]. [cit. 2020-01-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores.html>