

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití průtokové cytometrie v mikrobiologii

Jitka Tomanová

Bakalářská práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jitka Tomanová**
Osobní číslo: **C15286**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Využití průtokové cytometrie v mikrobiologii**
Zadávající 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. Vyhledání a zpracování vybraných základních elektronických a tištěných literárních zdrojů o průtokové cytometrii a jejímu možnému využití v oblasti mikrobiologie.
2. Obecná charakteristika a technické uspořádání průtokového cytometru.
3. Využití průtokové cytometrie v biologických oborech při rutinní analýze.
4. Možnosti využití této metody v mikrobiologii: analýza populací mikroorganismů, kvantitativní stanovení a stanovení vitality buněk v klinické mikrobiologii, ekologii atd. Použití fluorescenčních barviv a specifická detekce.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Vladimír Beran, PhD.

Katedra biologických a biochemických věd

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

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

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

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

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

V Pardubicích dne 4. 7. 2020

Jitka Tomanová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Vladimíru Beranovi, Ph.D. za ochotu, pomoc, vstřícný přístup a cenné rady, které mi poskytoval po celou dobu vypracovávání bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá využitím průtokové cytometrie v mikrobiologii. V první části práce je krátce popsána historie vývoje přístroje, princip fungování a popis jeho jednotlivých částí. Následuje krátká kapitola o využití v jiných biologických oborech, např. v hematologii a imunologii. Další kapitoly pojednávají o jejím možném využití v mikrobiologii obecně a dále v klinické mikrobiologii, potravinářství a biotechnologii.

KLÍČOVÁ SLOVA

průtoková cytometrie, mikrobiologie, fluorescenční barviva, životaschopnost buněk, specifická detekce mikroorganismů

TITLE

Use of flow cytometry in microbiology

ANNOTATION

This work deals with the use of flow cytometry in microbiology. In the first part of the thesis, the history of the instrument development, the principle and a description of its individual parts is briefly described. It is followed by a short chapter about the use of flow cytometry in other biological fields, for example in hematology and immunology. Other chapters deal with its potential application in microbiology in general and in clinical microbiology, food industry and biotechnology.

KEYWORDS

flow cytometry, microbiology, fluorescent dyes, cell viability, specific detection of microorganisms

OBSAH

Seznam obrázků.....	8
Úvod	10
1 průtoková cytometrie	11
1.1 Historie a vývoj přístroje	11
1.2 Princip metody	11
1.2.1 Fluidní systém.....	12
1.2.2 Optický systém	13
1.2.3 Elektronický systém.....	14
2 průtoková cytometrie v biologických oborech	16
2.1 Využití FCM v hematologii a imunologii	16
2.1.1 Fenotypizace subpopulací leukocytů	16
2.1.2 Analýza erytrocytů.....	17
2.1.3 Stanovení apoptózy.....	17
2.2 Využití FCM v buněčné biologii	18
3 Průtoková cytometrie v mikrobiologii	19
3.1 Fluorochromy	19
3.2 Hodnocené parametry	22
3.2.1 Počet buněk.....	22
3.2.2 Třídění buněk.....	23
3.2.3 Viabilita buněk.....	24
4 Využití FCM v potravinářském průmyslu a biotechnologii	30
4.1 Mléčný průmysl to první číslo nějak nejde vymazat	30
4.2 Výroba alkoholických nápojů.....	31
4.3 Úprava odpadních vod.....	31
4.4 Farmaceutický průmysl a lékařské aplikace	31
5 Využití průtokové cytometrie v klinické mikrobiologii	32
5.1 Specifická detekce mikroorganismů.....	32

5.1.1	Stanovení G+ a G- bakterií	32
5.1.2	Identifikace mikroorganismů za použití protilátek a fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) spolu s FCM.....	33
5.2	Testování citlivosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám.....	35
5.2.1	Antimikrobiální látky.....	35
5.2.2	Tradiční metody testování citlivosti na antimikrobiální látky	36
5.2.3	Testování citlivosti na antimikrobiální látky pomocí FCM.....	37
5.3	Využití průtokové cytometrie ve virologii.....	38
5.3.1	HIV infekce a AIDS	39
Závěr		40
Citovaná literatura		41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Fluidika průtokového cytometru	12
Obrázek 2: Uspořádání průtokového cytometru.....	14
Obrázek 3: Grafické záznamy výsledků z FCM.....	15
Obrázek 4: Dot plot popisující zastoupení jednotlivých typů buněčné smrti.....	18
Obrázek 5: Bürkerova komůrka.....	22
Obrázek 6: Oddělení buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> od nebuněčných částic v průtokovém cytometru za pomoci FSC a SSC signálů	23
Obrázek 7: Strukturální vzorec propidium jodidu	25
Obrázek 9: Strukturální vzorec bis-oxonolu.....	28
Obrázek 10: Strukturální vzorec fluorescein diacetátu.....	29
Obrázek 11: Ukázka výsledku diskové difúzní metody	37
Tabulka 1: Přehled zmíněných fluorochromů.....	21

SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
BOX	bis-(1,3-dibutylbarbiturová kyselina) trimethin oxonol
CDCF	5,6-karboxy-2',7'-dichlorfluorescein diacetát
CFDA	karboxyfluorescein diacetát
CFDA-SE	karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester
CTC	5-kyano-2,3-ditolyl tetrazolium chlorid
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FCM	průtoková cytometrie (flow cytometry)
FSC	signál dopředního rozptylu (forward scatter)
FDA	fluorescein diacetát
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
HI	hexidium jodid
Ig	imunoglobulin
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
pH _{in}	intracelulární pH
PI	propidium jodid
PNA	peptidová nukleová kyselina
PS	fosfatidylserin
PTM	fotonásobič (photomultiplier tube)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
SSC	signál bočního rozptylu (side scatter)
WGA	aglutinin pšeničných klíčků (wheat germ agglutinin)

ÚVOD

Život ohrožující infekce vyžadují rychlé nasazení antimikrobiální léčby, a proto vyžadují rychlé a přesné diagnostické testy. Problémem mikrobiologických laboratoří ve srovnání s jinými klinickými laboratořemi je časová náročnost při diagnostice mikroorganismů. Tradiční metody bakteriologie a mykologie vyžadují izolaci a kultivaci organismů před identifikací a dalšími stanoveními. Ve většině případů jsou tak výsledky spojené s kultivací dostupné za 48 až 72 hodin.

Díky postupům nevyužívajících kultivaci, které detekují například přítomnost antigenů nebo specifickou imunitní reakci hostitele, se výrazně zkrátil diagnostický čas. Rozvoj molekulárně biologických technik, zejména těch, které jsou založeny na sondách nukleových kyselin kombinovaných s amplifikačními technikami, zvýšil rychlost a specificitu mikrobiologické diagnostiky. Tyto techniky vedly k revoluční změně mnoha tradičních postupů používaných v klinických mikrobiologických laboratořích. Díky těmto metodám je diagnostika snazší a lze identifikovat i nekultivovatelné patogeny (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Biologické metody používané pro měření různých parametrů buněk se obecně nazývají cytometrií. Průtoková cytometrie je potom metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu fyzikálních a chemických vlastností na úrovni jedné buňky nebo různých částic v suspenzi během jejich průchodu laserovým paprskem rychlostí až 100 000 částic za vteřinu (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

V této práci je nejprve uvedena charakteristika a princip fungování průtokového cytometru a jeho částí. Dále se zde stručně pojednává o jeho využití v biologických oborech, jako je hematologie, imunologie nebo klinická biochemie.

V další části práce je uvedena aplikace průtokové cytometrie v mikrobiologii. Zde se řeší využití fluorochromů a parametry, které lze pomocí průtokové cytometrie na poli mikrobiologie stanovovat, jako například životaschopnost buněk nebo její využití při specifické detekci mikroorganismů. V poslední části práce je zmíněno použití průtokové cytometrie v praktických aplikacích v klinické mikrobiologii, potravinářství či biotechnologii, například při stanovení citlivosti na antimikrobiální látky.

1 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

1.1 Historie a vývoj přístroje

První buňka byla objevena po sestavení prvního mikroskopu v 17. století. Po dobu dalších 200 let byly buňky rozlišovány pouze na základě morfologie pozorované právě mikroskopy. První přístroj podobný průtokovému cytometru byl sestaven Andrew Moldavanem v roce 1934 (Hawley, 2004). Jednalo se o první popsany přístroj počítající buňky, který se skládal z průtokové kapiláry a fotoelektrického systému připevněných na optický mikroskop (Melamed et al., 2001).

Tuto metodu použil pro detekci bakterií v aerosolu v roce 1947 Gucker. Poté vedl rozvoj metody k dalšímu využití v mikrobiologii, jako např. ke stanovení životaschopnosti buněk na základě sledování jejich metabolické aktivity nebo integrity buněčné membrány, rozlišení gramnegativních a grampozitivních bakterií anebo sledování kinetiky buněčného cyklu (Lochmanová et al., 2017).

V 60. letech 20. století byl sestaven první průtokový cytometr, který dokázal kvantifikovat fyzikální a chemické vlastnosti buněk a poprvé se stal jeho součástí i sorter pro výběr jednotlivých typů částic. V 70. letech se pak začaly průtokové cytometry vyrábět komerčně, ačkoli tehdy byly kvůli jejich vysoké ceně a náročné obsluze určeny pouze pro vědecké účely. Průtokové cytometry byly z prvopočátku používány výhradně pro analýzu buněk. Velký posun nastal díky objevu elektronové mikroskopie, monoklonálních protilátek a používání fluorescenčních barviv. V dnešní době už lze analyzovat jakoukoli suspenzi částic, díky čemuž se stal průtokový cytometr součástí většiny klinických laboratoří (Shapiro, 2003; Roubalová, 2012).

1.2 Princip metody

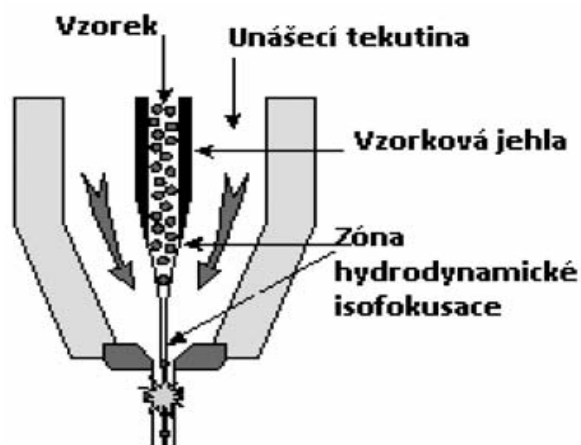
Průtoková cytometrie (FCM) je metoda umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu chemických (fluorescenčních) a fyzikálních (optických) vlastností buněk nebo jakýchkoliv jiných částic v suspenzi během průchodu laserovým paprskem (Brown a Wittwer, 2000; Roubalová, 2012). Princip FCM spočívá v detekci fluorescenčního nebo jiného světelného signálu. Buňka sama o sobě vyzařuje fluorescenci jen zřídka kdy, a proto se využívají fluorescenční barviva nebo fluorescenčně značené protilátky. Taková buňka je potom ozářena lasery se specifickou vlnovou délkou a sleduje se emitovaná fluorescence. FCM lze využít

k typizaci jakýchkoliv buněk, lze také pozorovat buněčný cyklus, apoptózu nebo životaschopnost buněk. Pomocí FCM lze také buňky rozřadit pomocí určitých znaků.

Průtokový cytometr se skládá ze tří základních částí, a to z fluidního, optického a elektronického systému. Tyto části jsou dále složeny z excitačního zdroje, měřící optické cely, fotodetektorů, optických filtrů, systému zrcadel a několika fluorescenčních detektorů seřazených podle vzrůstající vlnové délky emitované fluorescence (Brown a Wittwer, 2000; Roubalová, 2012; Lochmanová et al., 2017).

1.2.1 Fluidní systém

Jak již bylo zmíněno, je nutné, aby byly částice pro analýzu průtokovou cytometrií v suspenzi. Suspendovány jsou nejčastěji ve fyziologickém roztoku. Dále je třeba, aby částice procházely systémem jedna po druhé, čehož se dosahuje hydrodynamickým zaostřováním, které zajišťuje právě fluidika. Samostatný průchod buňky systémem je nezbytný pro přesnost měření a zamezení ucpávání trysky (Díaz et al., 2010; Aebisher et al., 2017).



Obrázek 1: Fluidika průtokového cytometru (Roubalová, 2012).

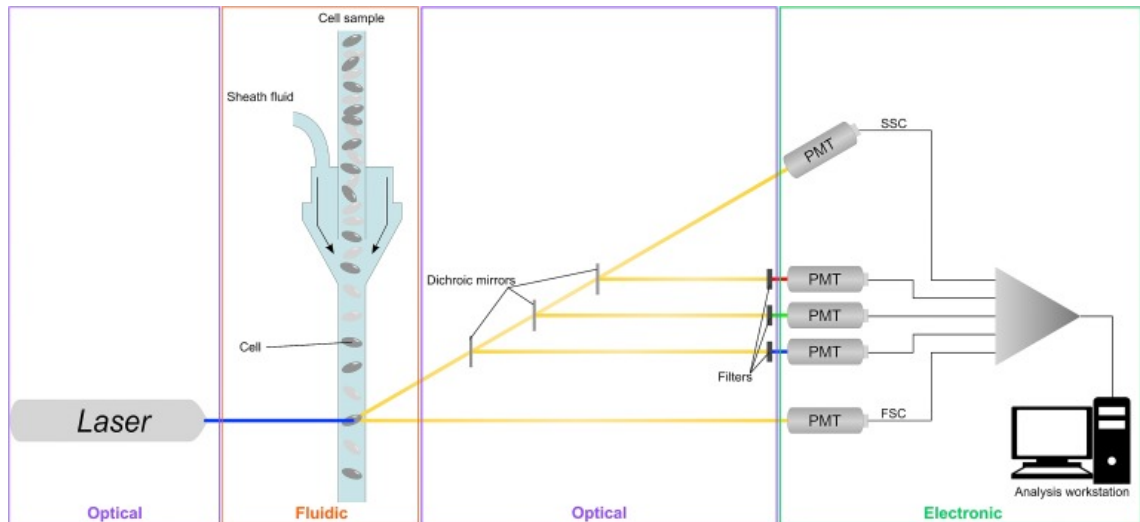
Fluidní složka se skládá z průtokové komory, která odděluje a vyrovnává částice. U většiny průtokových cytometrů je toho dosahováno vstříknutím suspenze obsahující buňky do laminárního proudu tekutiny pláště nebo do fyziologického roztoku tzv. nosné kapaliny (Díaz et al., 2010; Roubalová, 2012). Kapalina pláště prochází postupným zrychlením a tím se buňky vyrovnávají uprostřed trysky tak, že procházejí v řadě za sebou, čemu napomáhá i zúžení kapiláry. Vzorek je vstříkovan tak, aby nedošlo k jeho smísení s nosnou tekutinou (viz obr. 1; Brown a Wittwer, 2000; Marinov, 2008; Díaz et al., 2010).

1.2.2 Optický systém

Optický systém průtokového cytometru zajišťuje interakci samotných analyzovaných částic nebo částic označených excitovaným fluorochromem, který lze použít za účelem získání většího množství informací o dané buňce, a elektromagnetického vlnění emitovaného laserem, které se potom odrazí, rozptýlí nebo vyvolá fluorescenci (Laguado, 2007; Novák a Basařová, 2008; Díaz et al., 2010). Částice nacházející se v měřicí cele jsou ozařovány monochromatickým zářením, nejčastěji laserem. Běžně používané jsou argonové lasery chlazené vzduchem emitující záření o vlnové délce 488 nm, dále neonové, kryptonové, helium-neonové a Yag lasery (Shapiro, 2003; Roubalová, 2012). Laserový paprsek je na měřicí celu zaměřován zaostřovací čočkou (Marinov, 2008). Světlo je vyzařováno ve všech směrech a poté se shromažďuje přes optiku, která ho směřuje na řadu filtrů a dichroických zrcadel, a ty potom izolují jednotlivá pásma vlnových délek (Brown a Wittwer, 2000).

Vyzařovaná fluorescence jednotlivých fluorochromů je detekována pomocí fluorescenčních kanálů s volitelnou vlnovou délkou analyzovaného signálu pomocí soustavy optických zrcadel a filtrů (Lochmanová et al., 2017). U nejdražších průtokových cytometrů, které slouží hlavně pro vědecké účely, může být počet kanálů větší než deset. Pro klinické účely se používají průtokové cytometry s nejméně čtyřmi kanály (obvykle se šesti až osmi kanály), které tedy umožňují detekci až osmi znaků jedné buňky (Šinkorová a Zárybnická, 2008).

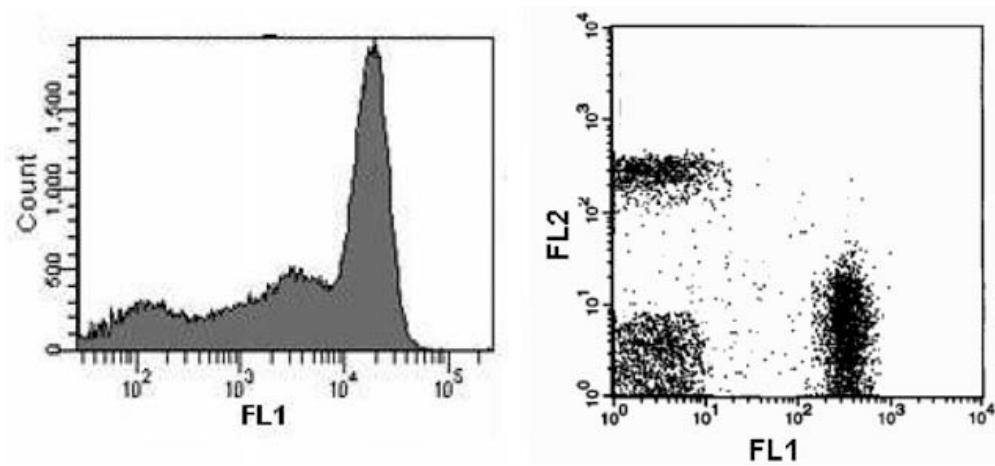
Na základě rozptylu a fluorescence světla lze získat informace o velikosti, tvaru a granularitě analyzovaných buněk. Signál rozptylu v přímém směru toku paprsku (forward scatter, FSC) zachycuje tzv. forward scatter detektor. Tento signál je úměrný velikosti buněk (Šinkorová a Zárybnická, 2008; Díaz et al., 2010; Longin et al., 2017). Signál bočního rozptylu paprsku je zachycován tzv. side scatter detektorem a odráží vnitřní strukturu částic. To znamená, že se jedná o světlo, které je rozptýleno pod úhlem 90° k dopadajícímu paprsku laseru (side scatter, SSC). Tento parametr je spojen s drsností povrchu a počtem organel uvnitř buňky. Čím větší počet organel nebo struktur se uvnitř nachází, tím větší je složitost zaznamenaná detektorem SSC (Laguado, 2007). Detektory fluorescence a bočního rozptylu se skládají z fotonek s násobičem (PTM), které jsou uspořádané do trojúhelníku či do osmiúhelníku. Osmiúhelník sestává z pěti fotonek s násobiči a detekuje záření z laseru o vlnové délce 488 nm. Trojúhelník obsahuje dvě fotony s násobičem detekující záření o vlnové délce 635 nm. Signály jsou poté spektrálně rozděleny dichroickými zrcadly a filtry (Marinov, 2008).



Obrázek 2: Uspořádání průtokového cytometru (Longin et al., 2017).

1.2.3 Elektronický systém

Světlo procházející optickým systémem je konvertováno na elektrické impulzy generované fotodiodami a fotonásobiči, které jsou následně shromažďovány a analyzovány. Počítačový systém slouží k logaritmickému nebo lineárnímu zesílení tohoto signálu snímaného detektory. Dále následuje digitalizace a grafické znázornění. Výstupem měření je jednoparametrový histogram nebo tzv. dvouparametrový dot plot, kde je na ose x vynesena intenzita jednoho signálu a na ose y intenzita signálu druhého (obr. 3). V takovém dvouparametrovém grafu jsou potom jednotlivé impulzy (částice) vyobrazené jako tečky. Do těchto grafů jsou zaneseny intenzity všech sledovaných znaků a podle nich jsou poté jednotlivé buňky rozříděny do skupin. Na základě toho je poté možné určit jednotlivé buněčné populace (Marinov, 2008; Lochmanová et al., 2017; Longin et al., 2017).



Obrázek 3: Grafické záznamy výsledků z FCM, vlevo: jednoparametrový histogram, vpravo: dvouparametrový dot plot (Roubalová, 2012).

2 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE V BIOLOGICKÝCH OBORECH

Cytometrické analýzy se provádějí v různých oblastech biologie, ale nejširší využití mají v biomedicínských výzkumech i v běžné klinické diagnostice. Díky možnosti analyzovat jednotlivé buňky v suspenzi v poměrně krátkém čase se FCM stala rutinním nástrojem používaným v hematologii, imunologii, onkologii a v klinické biochemii. Aplikace FCM je široká a zahrnuje například typizaci krevních buněk na základě jejich intracelulárních a povrchových antigenů, počítání buněk, stanovení jaderné DNA (deoxyribonukleová kyselina), provádění funkčních testů krevních buněk, stanovení apoptózy, vyšetření moči na přítomnost bakterií, krevních a epitelových buněk a mnoho dalších (Drouet a Lees, 1993; Pecka a Bláha, 2010).

2.1 Využití FCM v hematologii a imunologii

Hlavní roli v diagnostice hraje imunofenotypizace. Obecně je to určení povrchových a intracelulárních antigenů pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek (Kačirková a Campr, 2007). Pro každou buňku jsou charakteristické rozdílné antigeny, díky kterým ji lze identifikovat. Zásadou hybridomové technologie započala výroba monoklonálních protilátek, které pomáhají rozpoznávat rozdíly mezi buňkami s podobnými morfologickými charakteristikami. Díky monoklonálním protilátkám namířeným vůči specifickým antigenům lze rozpoznávat antigeny, které odpovídají určitému stádiu buněčné diferenciace a dozrávání, nebo antigeny charakteristické pro určitou hematopoetickou řadu (Marinov, 2008; Pecka a Bláha, 2010; Penka a Slavíčková, 2011).

2.1.1 Fenotypizace subpopulací leukocytů

Určení relativní četnosti jednotlivých subpopulací leukocytů ve vzorcích je klíčové například při rozpoznávání hematologických poruch, různých typů imunologických nedostatečností nebo při typizaci leukémií. Protože terapie a prognóza jsou u každého typu leukémie zcela odlišné, je jejich klasifikace náramně důležitá (Drouet a Lees, 1993). K rozlišení jednotlivých leukocytárních druhů průtokovou cytometrií se buněčné suspenze označují monoklonálními protilátkami, na které jsou navázané fluorochromy (Hoy, 1990; Hořejší a Bartůňková, 1998).

2.1.2 Analýza erytrocytů

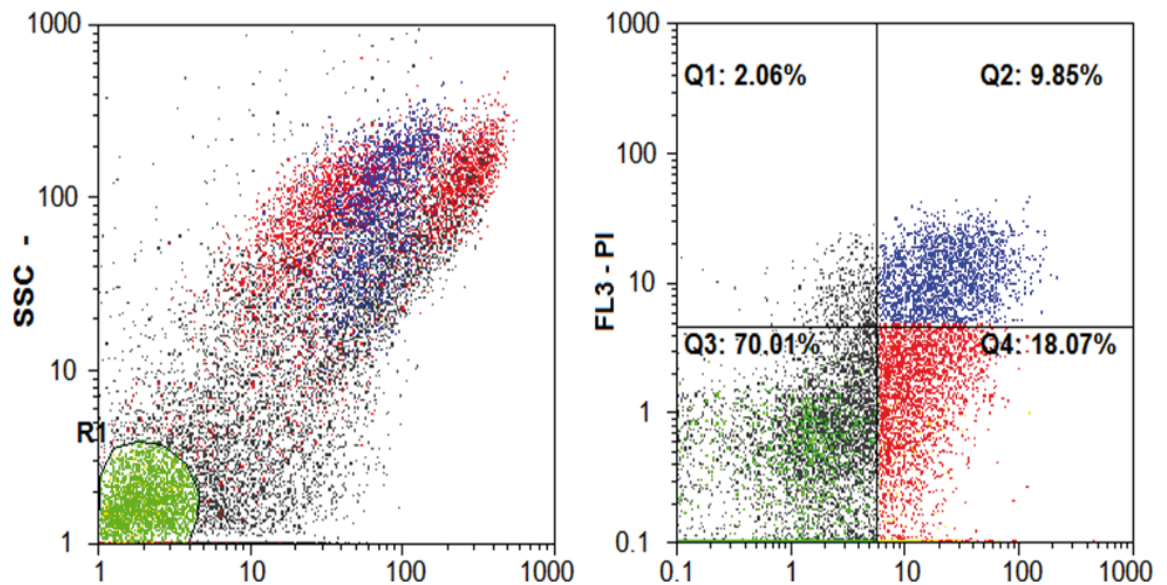
Kromě počítání erytrocytů FCM našla uplatnění i při detekci a kvantifikaci červených krvinek plodu v krvi matky čili při kvantifikaci fetomaternálního krvácení (Brown a Wittwer, 2000). Princip spočívá v detekci RhD pozitivních erytrocytů plodu ve vzorku krve RhD negativní těhotné a průkazu fetálního hemoglobinu v krvi matky. Použití FCM pro detekci fetálních buněk je mnohem objektivnější, reprodukovatelnější a citlivější než test Kleihauer-Betke, který využívá faktu, že je dospělý hemoglobin rozpustný při nízkém pH a tím pomocí kyseliny eluován z erytrocytů (Bayliss et al., 1991; Brown a Wittwer 2000; Dziegiel et al. 2006; Masopust a Písačka, 2016). Dále lze FCM využít při křížových zkouškách krve (Stites a Terr, 1994).

2.1.3 Stanovení apoptózy

Apoptóza je forma programované buněčné smrti. Je to pochod, při kterém dochází k rychlému odstranění infikovaných, porušených nebo neúčinných buněk. Je koordinována pomocí cysteinových kaspázových proteáz, které po aktivaci spouští řadu morfologických změn, včetně zmenšení buněk, kondenzace chromatinu, hydrolýzy DNA a jaderné fragmentace. Tyto dramatické strukturní a biochemické změny vedou nejen k řízené smrti buňky, ale také k účinnému rozpoznání a odstranění apoptotických buněk fagocyty (Balvan et al., 2014).

Jednou z nejcitlivějších a nejpoužívanějších technik při analýze průtokovou cytometrií je test využívající vazby FITC-konjugovaného annexinu V na fosfatidylserin (PS). Fosfatidylserin se u zdravých buněk nachází na vnitřní straně membrány a během apoptózy je přesunut na její vnější stranu, kde dochází k vazbě s annexinem V (Balvan et al., 2014).

Tímto testem lze detekovat a rozlišovat, ve kterém stádiu apoptózy se buňka nachází. Protože integrita plazmatické membrány je udržována pouze v raných stádiích apoptózy, umožňuje použití vitálního barviva, jako je propidium jodid (PI), rozlišení mezi živými buňkami, které jsou annexin V-negativní a PI-negativní, časnými apoptotickými buňkami, které jsou annexin V-pozitivní a PI-negativní a pozdními apoptotickými, které jsou annexin V-pozitivní a PI-pozitivní (Rieger et al., 2010; Balvan et al., 2014; Hollville a Martin, 2016).



Obrázek 4: Dot plot popisující zastoupení jednotlivých typů buněčné smrti v populaci barvené annexinem V a PI. V levém horním rohu označeném Q1 jsou buněčné fragmenty pozitivní na PI a negativní na annexin V. V části Q2 jsou buňky nekrotické pozitivní jak na PI tak i na annexin V. Q3 část znázorňuje živé buňky negativní na obě barviva a v Q4 jsou apoptotické buňky negativní na PI a pozitivní na annexin V (Balvan et al., 2014).

2.2 Využití FCM v buněčné biologii

Infekce močových cest je nejčastější bakteriální infekcí u lidí. Z toho vyplývá, že vzorky moči představují významný podíl v rutinních mikrobiologických laboratořích. Během posledních 20 let byly vyvinuty plně automatizované přístroje pro analýzu a počítání částic v moči, včetně bakterií, kvasinek, leukocytů, erytrocytů a epitelových buněk. Screening moči pomocí FCM urychluje hlášení negativních výsledků, čímž se zabrání zbytečným kultivačním testům, bezvýznamné léčbě antibiotiky a zvyšování rizika rezistence (Delanghe et al., 2000; Yang et al., 2016; De Rosa et al., 2018).

3 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE V MIKROBIOLOGII

Průtoková cytometrie byla původně vyvinuta hlavně pro studium eukaryotických buněk vzhledem k jejich větší velikosti ve srovnání s prokaryotickými buňkami (Hulett et al., 1969; Díaz et al., 2010). Až pokroky ve vývoji přístrojové elektroniky, optiky a v oblasti fluorescenčních sond umožnily využití této metody i v mikrobiologii. První studie o aplikaci FCM na mikrobiologické analýzy kultur kvasinek a bakterií pochází z konce 70. let (Bailey et al., 1977; Allman et al., 1992). I přes tento posun se však její využití potýká s řadou problémů. Prvním je malá velikost bakterií, které je těžké odlišit od buněčné drti. Druhým problémem je, že řada bakterií tvoří shluky a řetízky a z tohoto důvodu je třeba před vlastní analýzou provést důkladnou homogenizaci vzorku. Další komplikace způsobuje nižší propustnost bakterií pro fluorescenční barviva a případná přítomnost účinných efluxních pump. Dále hraje velkou roli stavba a složení zevní buněčné stěny u G⁺ a G⁻ bakterií. I přes tyto problémy má využití FCM v mikrobiologických laboratořích značné výhody. Mezi ty hlavní patří rychlost měření a možnost stanovení několika parametrů současně (multiparametrová analýza). V mikrobiologii se nejčastěji stanovují parametry, jako je velikost, granularita a celkový počet buněk, počet živých a mrtvých buněk v populaci, metabolická aktivita, změny v rychlosti růstu, vlastnostech cytoplazmatické membrány, buněčného cyklu a také intracelulární pH (Novák a Basařová, 2008; Lochmanová et al., 2017).

3.1 Fluorochromy

Fluorochromy se rozumí fluorescenční barviva, která se naváží na určitou strukturu v buňce. Metody fluorescenčního barvení jsou obecně rychlé a usnadňují vizualizaci buněk v komplexních směsích podle jejich biochemických, fyziologických nebo fylogenetických vlastností. Rovněž lze díky nim určit specifické složky buněk, jako jsou například organely, enzymy nebo povrchové markery (Laguado, 2007).

Fluorochrom musí mít určité vlastnosti, aby byl vhodný pro cytometrické analýzy (Davey a Kell, 1996; Shapiro, 2000). Musí mít nízkou toxicitu, úzké emisní spektrum kvůli zamezení překryvu excitačních pásem a musí být biologicky inertní (Díaz et al., 2010).

Při interakci částice značené fluorochromem s laserem začne fluorochrom fluoreskovat. Fluorescence je fotoluminiscenční jev, ke kterému dochází díky schopnosti látky pohlcovat budící elektromagnetické záření a její způsobilost nahromaděnou energii vydat ve formě charakteristického emisního záření. Tím, že látka absorbuje záření, je excitována do

nestabilního energeticky bohatšího stavu, kdy jsou elektrony posunuty do vyšších hladin. Z tohoto stavu se následně elektrony vrací na původní hladiny pomocí zářivých přechodů s uvolněním fotonu. Prakticky platí, že excitační záření má kratší vlnovou délku než záření následně emitované. Každá látka s fluorescenčními vlastnostmi má charakteristická excitační a emisní pásma (Aebischer et al., 2017).

Některé z fluorochromů, jako např. ethidium bromid, propidium jodid a DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), se samovolně vážou na jisté molekuly, což má za následek přirozenou fluorescenci vzorku.

Pro velkou část struktur v buňce však neexistuje fluorochrom specificky se na ně vážící a proto se pro biologický výzkum používají tzv. nevlastní fluorochromy. Ty se uměle zavedou do studovaného systému a mají jasně definovaná emisní a excitační maxima. V případě, že se používá více fluorochromů najednou, může dojít k tomu, že z důvodu překryvu vlnových délek obsahuje signál daného fluorochromu zároveň i podíl signálu sousedícího fluorochromu. To by mohlo v závěru vést k chybám při vykládání výsledků měření. Z tohoto důvodu je zapotřebí volit fluorochromy s vhodnými spektry (Baumgarth a Roederer, 2000; Davey a Winson, 2003; Lochmanová et al., 2017).

Nevlastní barviva mohou být rozdělena podle druhu vazby na biologickou strukturu buňky na fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Fluorescenční značky se vážou na biologické matrice kovalentně, zatímco nekovalentně se vážou fluorescenční sondy (Novák a Basařová, 2008). Použité fluorochromy pak mohou být dále klasifikovány podle svého mechanismu účinku. Mezi barviva, kterým brání při vstupu do buňky neporušená buněčná membrána, řadíme např. propidium jodid (PI). Jeho důležitou cílovou strukturou pro vazbu uvnitř buňky je DNA, a proto se používá jak ke stanovení životaschopnosti buněk, tak k analýze buněčného cyklu u eukaryotních buněk. Další druhy fluorochromů, jako např. rhodamin 123, se hromadí v metabolicky aktivních buňkách. Zároveň se může jednat o non-fluorogenní prekurzory, které jsou převedeny na fluorochrom až prostřednictvím specifických enzymů nacházejících se ve viabilních buňkách (Davey a Winson, 2003; Rosselló a Bouza, 2012; Lochmanová et al., 2017).

Tabulka 1: Přehled zmíněných fluorochromů (Branská et al. 2011; Sigma-Aldrich, 2020).

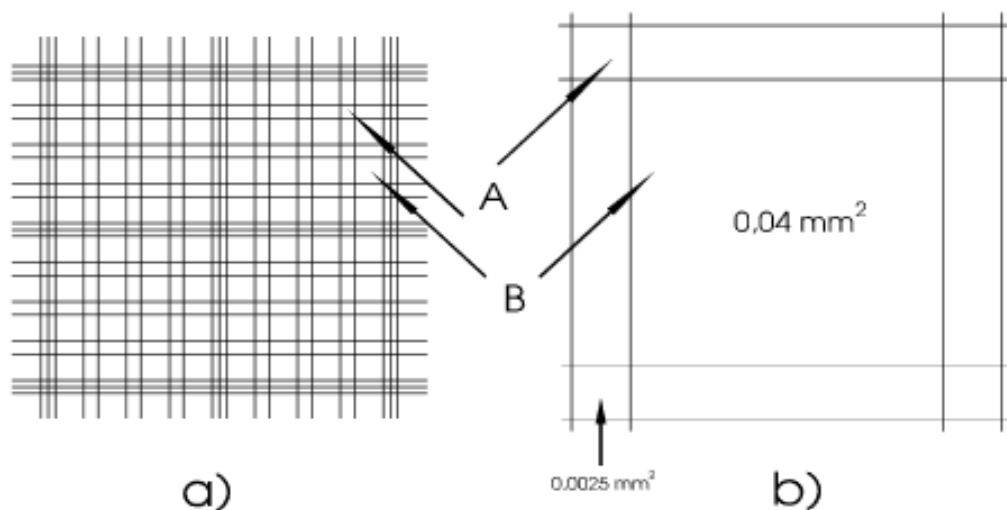
Sonda	Aplikace	Excitační/emisní spektrum [nm]
Propidium jodid	Stanovení integrity cytoplazmatické membrány a apoptózy	536/617
Ethidium bromid	Stanovení integrity cytoplazmatické membrány a funkčnosti transmembránových pump	510/590
SYTO 9	Stanovení integrity cytoplazmatické membrány	483/500
SYTO 13	Rozlišení G+ a G- bakterií	491/514
Hexidium jodid	Stanovení viability, buněčné struktury a rozlišení G+ a G- bakterií	518/600
Rhodamin 123	Stanovení membránového potenciálu	507/529
Bis-oxonol	Stanovení membránového potenciálu	488/525
CFDA	Stanovení esterázové aktivity	492/517
CFDA-SE	Stanovení intracelulárního pH a esterázové aktivity	494/518
CDCF	Stanovení intracelulárního pH	494/518
FDA	Stanovení intracelulárního pH a esterázové aktivity	494/521
CTC	Dehydrogenázová aktivita	450/630

3.2 Hodnocené parametry

3.2.1 Počet buněk

Počet buněk lze měřit buď přímo, nebo nepřímo. Stanovení počtu buněk nepřímo spočívá v měření určitých parametrů buněk, které s jejich počtem přímo souvisejí, jako například hmotnost nebo metabolická aktivita. Přímé měření se provádí pomocí kalibrovaných počítacích komůrek a světelných mikroskopů nebo automatických přístrojů, jako je průtokový cytometr. Přesná koncentrace buněk v objemové jednotce média je velice často stanovovaným parametrem, který lze pomocí FCM zjistit velmi snadno. Podmínkou však je, že se nesmí jednat o vláknité mikroorganismy, nebo o ty, které tvoří shluky, protože by je přístroj vyhodnotil jen jako jednu částici (Shapiro, 2003; Novák a Basařová, 2008).

Jednou z nejčastěji používaných počítacích komůrek je Bürkerova. Počítání buněk v komůrce je mnohdy nejpřesnější, nejrychlejší a přístrojově nejméně náročnou metodou. Tyto komůrky jsou tvořeny podložním sklíčkem s vyrytými sítěmi s přesně definovanou hloubkou a plochou. Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci, kde každý má plochu 1 mm^2 , a ty jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců o ploše $0,04 \text{ mm}^2$.

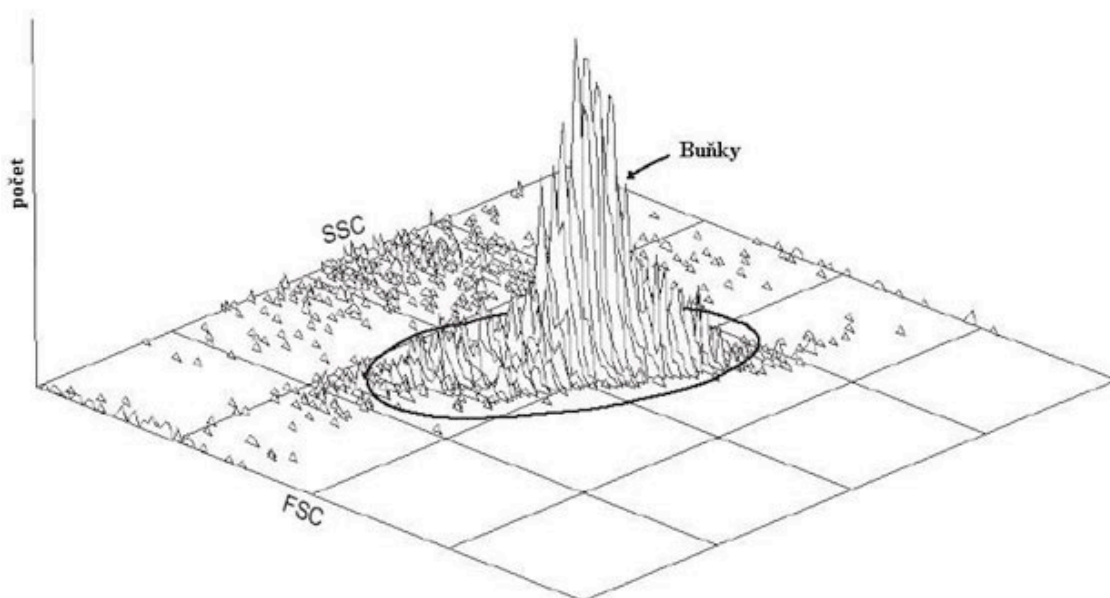


Obrázek 5: Bürkerova komůrka, a) pohled na mřížku, b) detail mřížky (Královec, 2012).

3.2.2 Třídění buněk

Některé průtokové cytometry mají funkci, že jsou schopny na základě buněčných charakteristik fyzicky oddělovat buněčné podmnožiny, tzn. třídít buňky (Caron et al., 1998; Veal et al., 2000; Papadimitriou et al., 2007).

Třídění neboli sorting buněk probíhá na principu fyzikální separace. Kapalina obsahující buňky je přeměněna na aerosol. Kapičky jsou poté ozářeny a podle lomu světla systém rozhodne o druhu buněk a pomocí elektrického proudu je odchýlí a separuje je. Data získaná během průchodu jednotlivých buněk laserovými paprsky jsou využívána třídíči buněk k jejich rozdělení podle určitých vybraných vlastností. Když má třídíč přístup ke všem datům ze všech excitačních zdrojů, rozhodne, zda daná buňka vyhovuje všem zvoleným kritériím. Pokud ano, je buňka převedena do připravené nádoby (zkumavka nebo mikrotitrační destička), pokud ne, buňka skončí v odpadu. V dnešní době je možné buňky nabít jednonásobným a dvojnásobným kladným a záporným nábojem, takže buňky lze třídít až na čtyři druhy. Dále je možné třídít i jednotlivé buňky nebo jen jejich části, například chromozomy nebo organely (Novák a Basařová, 2008; Šinkorová a Zárybnická, 2008).



Obrázek 6: Oddělení buněk *Saccharomyces cerevisiae* od nebuněčných částic v průtokovém cytometru za pomoci FSC a SSC signálů (Branská et al., 2011).

3.2.3 Viabilita buněk

Viabilitou neboli životaschopností buněk se rozumí jejich způsobilost být metabolicky aktivní a množit se při daných podmínkách (Veal et al., 2000; Díaz et al., 2010). Mezi nejčastěji používané metody ke stanovení viability mikroorganismů patří kultivace na pevných půdách a následné počítání jejich kolonií. Tato metoda je však časově velmi náročná a nepoužitelná u nekultivovatelných nebo pomalu rostoucích mikroorganismů (Branská et al., 2011).

K hodnocení viability buněk je tedy vhodnější stanovení pomocí FCM, kdy se používají fluorochromy, díky kterým lze sledovat metabolickou aktivitu, integritu buněčné membrány, intracelulární pH nebo existenci transmembránového potenciálu (Branská et al., 2011).

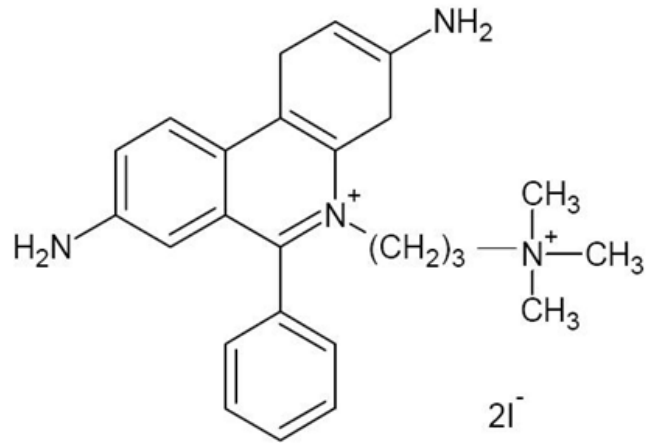
3.2.3.1 Integrita cytoplazmatické membrány

Cytoplazmatická membrána je součástí každé nejen mikrobiální buňky a zprostředkovává její kontakt s okolím. Je klíčovým cílem při poškození buněk vyvolaném změnami vnějších podmínek během kultivace díky své poloze mezi vnějším prostředím a intracelulární cytoplazmou, kde působí jako bariéra. U zdravých a plně funkčních buněk je membrána zapojena do řady životně důležitých buněčných funkcí, včetně transportu a difúze solutů, buněčného růstu a metabolismu za účelem udržení stálého intracelulárního prostředí (Bouix a Ghorbal, 2017).

Vzhledem k její poloze mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím dochází při změně vnějších podmínek, jako je teplota, pH, tlak a přísun látek, k jejímu porušení. To může způsobit například změnu propustnosti a ztrátu membránové integrity (Bouix a Ghorbal, 2017).

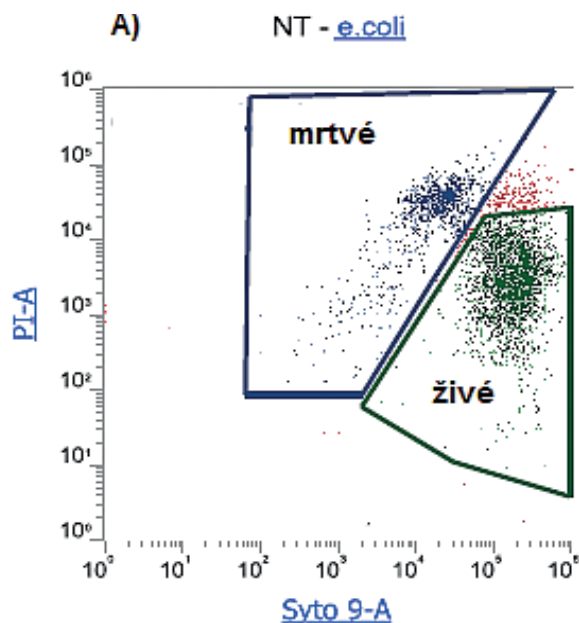
Jen málo fluorescenčních barviv je schopno projít neporušenou cytoplazmatickou membránou, a pokud se tak stane, jsou hned z buňky vyloučeny (Shapiro, 2000; Díaz et al., 2010). Právě na tomto principu je založeno stanovení membránové integrity, kdy se použije takové barvivo, které dokáže projít jen porušenou buněčnou membránou a má specifická intracelulární nebo periplazmatická vazebná místa (mezi vnější a vnitřní membránou). Buňky, které mají takto narušené membrány nebo membránové funkce, nejsou považovány za životaschopné (Branská et al., 2011; Lochmanová et al., 2017). Téměř výhradně se využívají látky vázající se v buňce na nukleové kyseliny, protože ty jsou zastoupeny ve všech buňkách v dostačujícím množství a umožňují tak všeobecné použití u převážné většiny mikroorganismů. Mezi tato barviva patří jedna z nejpoužívanějších fluorescenčních sond propidium jodid (PI, obr. 7), který se využívá v celé řadě mikrobiologických stanovení, a to jak pro detekci viability

kvasinek, tak i bakterií (Hewitt et al., 2000). Je to fenantrolinové interkalační činidlo vázající se na nukleové kyseliny, po jehož navázání dochází k zesílení intenzity a posunu fluorescence emitované v červené oblasti spektra.



Obrázek 7: Strukturální vzorec propidium jodidu (Branská et al., 2011).

Propidium jodid se často používá v kombinaci s fluorescenčními barvivy z řady SYTO. Jedná se o barviva, která prostupují i do buněk, jejichž cytoplazmatická membrána není porušena. K analýze buněčné životaschopnosti se v kombinaci s PI nejčastěji používá SYTO 9. To proniká přes všechny bakteriální membrány a barví všechny buňky, což vede k zelené fluorescenci při 530 nm, zatímco PI vniká pouze do buněk s poškozenými membránami, vytěšňuje SYTO 9 a poskytuje červenou fluorescenci (Kennedy et al., 2011).



Obrázek 8: Sledování viability bakteriální populace *E. coli* za použití značení SYTO 9 a PI (Lochmanová et al., 2017).

Za zmínku stojí také ethidium bromid, který je strukturně podobný propidium jodidu. Na rozdíl od PI má pouze jeden kladný náboj a prochází i neporušenou cytoplazmatickou membránou bakterií i kvasinek (Looser et al., 2005). Viabilní buňka je schopná ho pumpovat zpět ven do extracelulárního prostoru, což má za následek, že není značena. Toho lze využít k detekci méně závažných poškození buněčných funkcí, které nelze zachytit pomocí PI. V případě potřeby pozdější analýzy ve fixovaném vzorku lze využít ethidium monoazidu, který se kovalentně váže na DNA (Branská et al., 2011).

3.2.3.2 Membránová fluidita

Cytoplazmatická membrána je zapojena do řady životně důležitých buněčných funkcí (včetně transportu a rozpuštění solutů, transdukce energie, buněčného růstu a metabolismu) za účelem udržení stálého intracelulárního prostředí. Jak bylo uvedeno výše, poškození cytoplazmatické membrány může vést ke ztrátě integrity membrány a změnám propustnosti (Bouix a Ghorbal, 2017).

Membrána je dvojvrstva fosfolipidů, ve které jsou zabudované proteiny. Za normálních fyziologických podmínek je biologicky aktivním stavem bakteriální membrány lamelární nebo

kapalný krystalický stav. V tomto lamelárním stavu je membrána popisována jako tekutá mozaika se značnou pohybovou svobodou. Lipidové molekuly se mohou pohybovat laterálně a rotačně, zatímco v gelovém stavu se lipidové řetězce stávají stabilnějšími a pohyby se snižují (Denich et al., 2003).

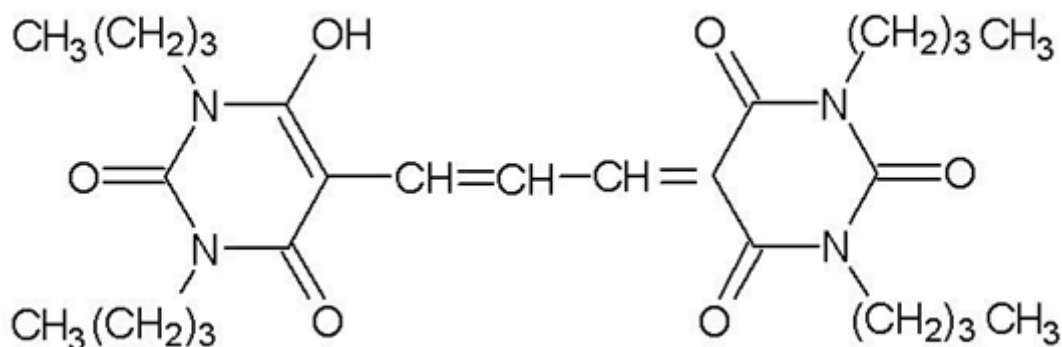
Změny okolních podmínek, jako je teplota, pH, tlak, obsah kyslíku, živin, etanolu, iontů a jiných látek, vyvolávají změny ve fyzikálně-chemickém stavu membrány, což způsobuje změny tekutosti a fázového chování, které představují dynamické vlastnosti lipidů v rámci membrány. Buněčné funkce, které se odehrávají na membránové úrovni, však vyžadují udržování správné fluidity (Mykytczuk et al., 2007).

3.2.3.3 Membránový potenciál

Membránový potenciál je jedním z nejčastěji používaných parametrů při stanovení životaschopnosti buněk. Velikost tohoto potenciálu se pohybuje od 100 do 200 mV a považuje se za měřítko zdraví mikroorganismů (Dinsdale et al., 1999). Tento potenciál je generován v důsledku různého obsahu iontů vně a uvnitř buňky a je na cytoplazmatické membráně udržovaný činností iontových pump (Shapiro, 2000). Je propojen s tvorbou ATP a v případě eliminace zdroje energie dochází během několika minut k jeho snížení. Z velké míry se na hodnotě tohoto potenciálu podílí i propustnost buněčné membrány, protože pouze buňky, které ji nemají poškozenou, jsou schopné ho udržovat ve fyziologických mezích. Pouze živé buňky jsou schopné udržovat membránový potenciál, a ačkoli membránová depolarizace znamená snížení buněčné aktivity, neznamená buněčnou smrt (Díaz et al., 2010).

Pro stanovení membránového potenciálu metodou FCM existuje mnoho fluorescenčních barviv, které lze použít jak pro prokaryotní, tak pro eukaryotní buňky. Jsou to fluorochromy lipofilní povahy, které volně procházejí cytoplazmatickou membránou. V závislosti na svém náboji se tato barviva uvnitř buňky hromadí. Kationické sondy jako například karbocyaniny nebo rhodamin 123 se hromadí v polarizovaných buňkách a v depolarizovaných se hromadí anionické sondy (Novo et al., 1999; Reis et al., 2005; Díaz et al., 2010). K nejvýznamnějším z nich se řadí flourochrom označovaný jako bis-oxonol (obr. 8). Pod tímto názvem je většinou uváděn bis-(1,3-dibutylbarbiturová kyselina) trimethin oxonol, který se také někdy udává jako DiBAC₄(3) nebo též pod zkratkou BOX, ale mohou tak být označovány i látky chemicky podobné, které mají jiné spektrální vlastnosti.

Při měnícím se potenciálu tato barviva mění své spektrální charakteristiky, a tím předávají informace do svého okolí. Koncentrace barviva uvnitř buněk je závislá na velikosti buněk, hodnotě membránového potenciálu, aktivitě membránových pump a na složení a propustnosti membrán. U gramnegativních bakterií je to velmi často omezujícím faktorem (Jepras et al., 1997; Branská et al., 2011; Lochmanová et al., 2017).



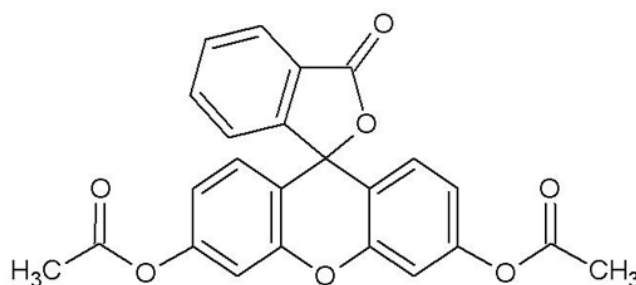
Obrázek 9: Strukturální vzorec bis-oxonolu (Branská et al., 2011).

3.2.3.4 Metabolická aktivita

Detekce metabolické aktivity naznačuje absenci buněčné smrti. Tato měření mohou být nepřesná při určování životaschopnosti buněk z důvodu dočasného zastavení nebo útlumu fyziologických procesů, například při hladovění. V tomto případě nemusí být metabolická funkce detekována nebo se může nacházet pod hranicí detekce. Jednou ze složek celkové metabolické aktivity je aktivita způsobená činností iontových pump. Přítomnost metabolické aktivity tedy indikuje měření enzymatické aktivity (Díaz et al., 2010). Syntéza enzymů vyžaduje energii, kdežto enzymatické reakce jsou obvykle nezávislé na buněčné energetice, takže detekce enzymatické aktivity jen ukazuje schopnost buněk syntetizovat enzymy v minulosti a udržet je aktivní v průběhu určitého časového období (Vives-Rego et al., 2000). Alternativně je na energetickém stavu buněk závislé pH a aktivní transport.

Jednou z možností stanovení metabolické aktivity je určení dehydrogenázové aktivity pomocí CTC (5-kyano-2,3-ditolyl tetrazolium chlorid), který je dehydrogenázami redukován na fluorescenční sraženinu CTC-formazanu, což poskytuje důkaz o aktivitě respiračního řetězce (Díaz et al., 2010).

Další možností je měření aktivity esterázy, které je jedním z nejběžnějších způsobů hodnocení enzymatické aktivity. Kvůli své neutrální povaze vstupuje nefluorescenční substrát do buňky difúzí. Jakmile je uvnitř buňky a působí na něho intracelulární enzymy (esterázy), přemění se na fluorescenční produkt, který je zadržen v buňkách s neporušenými membránami. Nehydrolyzovaný substrát a fluorescenční produkt jsou z mrtvých nebo porušených buněk rychle uvolňovány, dokonce i v přítomnosti zbytkové aktivity. Integrita membrány je tedy předpokladem pro detekci fluorescence. Nеспецифickou esterázovou aktivitu lze měřit za použití fluorescein diacetátu (FDA) nebo karboxyfluorescein diacetátu (CFDA; Días et al., 2010; Branská et al., 2011).



Obrázek 10: Strukturální vzorec fluorescein diacetátu (Branská et al., 2011).

3.2.3.5 Intracelulární pH

Intracelulární pH (pH_{in}) je důležitým parametrem vzhledem k jeho významu ve fyziologických a metabolických funkcích, jako je NAD⁺/NADH rovnováha a aktivity enzymů. Porucha pH_{in} by tedy mohla vést k narušení růstu a metabolické aktivity buněk. Při stanovení se využívá vlastnosti některých fluorochromů měnit intenzitu fluorescence na základě rozdílného pH, kdy v určitém rozmezí hodnot dochází ke změnám intenzity či k posunu jednotlivých maxim. Mezi pH-dependentní sondy patří zejména fluorescein, karboxyfluorescein a jeho deriváty, jako například CFDA-SE (karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester). Tento způsob stanovení životaschopnosti buněk lze použít jak u bakterií, tak kvasinek (Branská et al., 2011).

Pro měření pH buněk (kvasinek) stanovili Bouix a Ghorbal (2015) kalibrační křivku za použití dvou sond kvůli pokrytí širokého rozsahu pH. 5,6-karboxy-2',7'-dichlorfluorescein diacetát (CDCF) byl použit pro hodnoty pH v rozmezí od 3 do 4,5 a CFDA-SE pro hodnoty pH v rozmezí od 4 do 7 (Bouix a Ghorbal, 2015; Longin et al., 2017).

4 VYUŽITÍ FCM V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU A BIOTECHNOLOGII

Průtoková cytometrie našla uplatnění i v ekologii při studiu vodních mikroorganismů a při výzkumech půdy (Lochmanová et al., 2017). Využívá se i při kontrolách pitné vody a při úpravách odpadních vod, které se stále častěji využívají jako alternativní zdroj pitné vody. Ochrana veřejného zdraví je při čistění odpadních vod podle standardů pitné vody kritická. Rychlost a citlivost FCM při detekci bakterií umožnila její použití při úpravách pitné vody (Rockey et al., 2019).

Další využití FCM našla ve farmaceutickém průmyslu, biotechnologii a potravinářství. V současné době se FCM využívá v potravinářském průmyslu hlavně při kontrole kvality a bezpečnosti potravin a nápojů (Morgan et al., 2004). Některé z nedávných aplikací v těchto oblastech se zabývají analýzou surovin a finálních produktů. Podobně je možné vyhodnotit účinnost konzervace potravin procesy, jako je konzervace vysokou nebo nízkou teplotou. Dále je možné stanovit vliv různých stupňů zpracování na životnost mikroorganismů zapojených do různých průmyslových procesů (Laplace-Builhé et al., 1993; Uyttendaele et al., 2008; Díaz et al., 2010).

4.1 Mléčný průmysl

Výroba mléčných výrobků si žádá nepřetržitou a důkladnou analýzu mikrobiální kvality surovin i samotného výrobního procesu. Právě proto je FCM využívána stále více mlékárnami, které musí zajistit, aby mléko a mléčné výrobky splňovaly požadavky na kvalitu (Gunasekera et al., 2000; Flint et al., 2007). Jako startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin, jako jsou sýry a jogurty, se obvykle používají bakterie mléčného kvašení (LAB). LAB jsou grampozitivní bakterie, jejichž hlavní fermentační produkt je kyselina mléčná, kterou vylučují do svého okolí (Rault et al., 2007; Volkert et al., 2008; Díaz et al., 2010).

FCM je ideální nástroj při hodnocení fyziologie buněk a metabolické aktivity LAB (Riis et al., 1995; Papadimitriou et al., 2006). Dále ji lze využít pro předpovídání buněčné aktivity a sledování poškození buněk vlivem konzervačních procesů nebo prostřednictvím jiného stresového ošetření (Bunthof et al., 1999; Bunthof et al., 2001; Papadimitriou et al., 2006). Limitace týkající se identifikace mikroorganismů a potenciálních patogenů, které se mohou

nacházet v mléce, jsou odstraněny kombinací FCM s fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) na rRNA (Gunasekera et al., 2003; Díaz et al., 2010).

4.2 Výroba alkoholických nápojů

Tradiční metodou stanovení životaschopnosti kvasinek v potravinářském průmyslu je tzv. vitální test za použití např. metylenové modři nebo violeti. Pro přesnější stanovení lze použít fluorescenční metody, kdy se používá fluorescenční barvivo jako např. PI nebo FDA spolu s fluorescenční mikroskopií nebo průtokovou cytometrií (Košin et al., 2007). Rozmanitost fluorochromů a buněčných parametrů použitelných na detekci životaschopných bakterií a kvasinek spolu s FCM se stala cenným prostředkem při optimalizaci fermentace a analýze kvality v alkoholovém průmyslu. Převážná většina aplikací FCM je v tomto průmyslu spojena s výrobou piva, nyní ale nachází uplatnění i při výrobách vína a kvašených ovocných moštů (Lloyd et al., 1996; Malacrinò et al., 2001; Herrero et al., 2006). Sledování buněčného cyklu a fyziologického stavu buněk je důležité pro načasování a výběr kvasinek startovacích kultur kvůli předpovězení jejich fermentační aktivity (Kobayashi et al., 2007; Díaz et al., 2010).

4.3 Úprava odpadních vod

Odpadní vody se stále častěji využívají jako alternativní zdroj pitné vody. Ochrana veřejného zdraví při čištění odpadních vod podle standardů pitné vody je kritická. Rychlost a citlivost FCM při detekci bakterií umožnila její použití při úpravách pitné vody (Rockey et al., 2019).

4.4 Farmaceutický průmysl a lékařské aplikace

Aplikace FCM na výzkum a rutinní postupy (Alvarez-Barrientos et al., 2000) ukázaly několik výhod v diagnostice a identifikaci klinicky významných druhů, hodnocení účinků léků a antibiotik na životaschopnost buněk, stejně jako charakterizaci buněk a studium genové regulace a exprese patogenů (Walberg a Steen, 2001; Jung et al., 2008).

5 VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V KLINICKÉ MIKROBIOLOGII

Jak již bylo zmíněno, průtoková cytometrie se čím dál častěji využívá v mnoha klinických laboratořích. V dnešní době nachází uplatnění i v laboratořích klinické mikrobiologie.

Klíčovým nástrojem pro laboratorní diagnostiku mikrobiálních infekcí je izolace mikrobu a jejich identifikace, detekce zvýšených hladin protilátek proti určitému patogenu v průběhu nemoci a přímá detekce mikrobiálních složek (nukleových kyselin a proteinů) v klinických vzorcích získaných z různých tkání nebo tělních tekutin. Díky průtokové cytometrii jsou výsledky rychle dostupné, což je důležité hlavně u akutních stavů.

FCM může být v klinické mikrobiologii použita například pro studium imunitní odpovědi u pacientů, detekci specifických protilátek a monitorování klinického stavu po antimikrobiální léčbě (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

5.1 Specifická detekce mikroorganismů

V současné době mění způsob identifikace mikroorganismů využití protilátek, což usnadňuje a urychluje analýzu. Jejich specifičnost vůči antigenům a možnost použití protilátek značených fluorochromem z nich činí jeden z nejsilnějších nástrojů při identifikaci patogenů. Nevýhodou této metody je však omezená dostupnost protilátek namířených proti některým mikrobům. Výhodou použití protilátek je jednoduchost a rychlost metody, a také to, že buňky nemusí být kultivovatelné.

5.1.1 Stanovení G+ a G- bakterií

Metoda podle Grama je technikou diferenciálního barvení, díky které lze rozdělit bakterie na základě struktury buněčné stěny. Při klasickém provedení se v prvním kroku barví krystalovou violetí a poté Lugolovým roztokem. Následuje vymývání pomocí alkoholu nebo acetonu a posledním krokem je dobarvení karbolfuchsinem nebo safraninem. Bakterie s hustou, silně zesítenou vrstvou peptidoglykanu v buněčné stěně jsou označovány jako grampozitivní. Tato vrstva stabilně váže fialově zbarvený komplex krystalové violeti a jódu a brání vymytí tohoto komplexu. Buněčná stěna gramnegativních bakterií se skládá z tenké vrstvy peptidoglykanu s nižším procentem zesílení, která je pokrytá vrstvou lipopolysacharidů.

U těchto bakterií dochází k vymytí komplexu barviva vlivem alkoholu. K jejich obarvení na červeno dochází až v posledním kroku, kdy se barví karbolfuchsinem (Moyes et al., 2009).

Díky Gramovu barvení lze získat informace o dalších morfologických znacích mikroorganismů, jako například o tvaru buněk a jejich uspořádání (tyčky, koky, diplokoky atd.). Tato metoda je užitečná i pro identifikační účely, předběžnou diagnostiku vzorků pacientů a stanovení čistoty kultury.

Při stanovení grampozitivních a gramnegativních bakterií pomocí FCM se nejčastěji používá kombinace dvou fluorochromů vázajících se na nukleové kyseliny. Prvním je SYTO 13, který proniká jak do grampozitivních, tak do gramnegativních bakterií. Gramnegativní bakterie potom vyzařují zelenou fluorescenci. Druhým je hexidium jodid (HI), který proniká pouze do grampozitivních bakterií, kde ruší zelenou fluorescenci způsobenou SYTO 13 a bakterie pak vyzařují červenooranžovou fluorescenci (Mason et al., 1998; Holm a Jespersen, 2003; Lochmanová et al., 2017).

Další možností stanovení je použití fluorescenčně značeného aglutininu pšeničných klíčků (WGA) v kombinaci s HI. WGA se specificky váže na N-acetylglukosamin v peptidoglykanové vrstvě grampozitivních bakterií. Do gramnegativních bakterií pronikne pouze HI, protože vazbě WGA zabraňuje jejich vnější membrána. Mikroorganismy jsou tedy rozlišeny na základě rozdílných vlnových délek záření, které emitují (Holm a Jespersen, 2003).

5.1.2 Identifikace mikroorganismů za použití protilátek a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) spolu s FCM

Použití monoklonálních protilátek namířených proti specifickým buněčným antigenům spolu s FCM umožňuje identifikovat specifické buněčné populace ve vzorku. Protilátky jsou dostupné pro čím dál větší množství mikroorganismů, jako je například *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus* (Jung et al., 2003; Guttikonda et al., 2007; McCarthy a Culloty, 2011; Kennedy a Wilkinson, 2017).

Metoda s použitím fluorescenčních mikrosfér různých velikostí potažených protilátkami proti mikrobům detekuje vazbu těchto mikrobů na protilátky měřením snížení fluorescenční emise mikrosfér v důsledku stínícího účinku mikrobů jak na excitační, tak na emisní záření. U fluorescenčních mikrosfér různých velikostí může být ve stejném vzorku současně detekováno několik patogenů. Tuto metodu lze využít také při identifikaci parazitů a virů, nebo u infekcí způsobených jejich kombinací (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Obecně se k mikrosférám připojí buď bakteriální antigenní preparát, nebo celý mikroorganismus. Mikrosféry potažené antigenem se inkubují spolu se stanovovaným sérem a lidské protilátky ho rozpoznají. V dalším kroku se pro detekci použijí protilátky konjugované s fluorochromy proti lidským imunoglobulinům (Ig). Díky FCM je tento test rychlý, spolehlivý a dostatečně citlivý (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Další možností pro specifickou detekci mikroorganismů je použití FCM spolu s fluorescenční *in situ* hybridizací (FLOW-FISH nebo FC-FISH), která se ukázala jako rychlá a spolehlivá metoda (Rigottier-Gois et al., 2003). V mikrobiologických analýzách se FISH využívá ke značení specifických sekvencí nukleových kyselin uvnitř neporušených viabilních buněk. Díky tomu lze identifikovat různé bakteriální druhy ve vzorcích se smíšenými populacemi. Jednořetězcová fluorescenčně značená DNA sonda hybridizuje s částí cílového genu. Pro mikrobiální buňky ve vzorku mohou oligonukleotidy komplementární k těmto sekvencím fungovat jako druhově specifické sondy podle žádoucí úrovně specifčnosti. Díky fluorescenční sondě lze přímo detekovat místo hybridizace. Jako druhový marker se běžně používá ribozomální RNA (rRNA), která je ideální jako intracelulární cíl díky jejímu hojnému zastoupení (Kempf et al., 2000; Banerjee et al., 2002; Kennedy a Wilkinson, 2017).

Dále byly popsány postupy FISH využívající peptidových nukleových kyselin (PNA) jako sond místo sond nukleových kyselin při detekcích lidských patogenů (Stender et al., 2002; Kenny et al., 2008). Pokud jsou PNA sondy konjugovány s fluorescenčním barvivem, je také možné je použít spolu s FCM (Kennedy a Wilkinson, 2017).

FCM má využití i při detekci intracelulárních parazitů, jako je například *Plasmodium*. Využívá se nepřítomnosti DNA v erytrocytech. Pokud je tedy parazit uvnitř buňky, může být jeho DNA obarvena specifickými fluorochromy a detekována pomocí FCM. Multiparametrová analýza FCM se využívá při studiu dalších charakteristik, jako jsou parazitární antigeny exprimované erytrocytem, který může být detekován protilátkami konjugovanými s fluorochromy, nebo studiu životaschopnosti parazitované buňky (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

5.2 Testování citlivosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám

5.2.1 Antimikrobiální látky

Jedním z nejdůležitějších úkolů klinické mikrobiologické laboratoře je provádění testů na antimikrobiální citlivost. Cílem testování je předpovědět pravděpodobný výsledek léčby pacientovy infekce pomocí konkrétního antimikrobiálního činidla (Jorgensen a Ferraro, 1998).

Termín antimikrobiální látky vyjadřuje chemické sloučeniny, které na mikroorganismy působí toxicky a slouží k léčbě mikrobiálních onemocnění, jako konzervační látky nebo jako desinfekce.

Velké množství takových látek se nazývá antibiotika, to jsou látky pocházející z plísní a bakterií, čili mikrobiálního původu. Chemicky připravené antimikrobiální látky se nazývají chemoterapeutika. Pokud má být antimikrobiální látka použita jako léčivo, musí inhibovat růst mikroorganismů, nebo je zabíjet při dávkách, které neškodí hostiteli. Poměr mezi dávkou poškozující makroorganismus a účinnou dávkou inhibující mikroorganismus udává chemoterapeutický index. Antimikrobiální látka je jako léčivo vhodnější, čím je chemoterapeutický index vyšší, protože daná látka je pro hostitele méně jedovatá (Votava, 2010).

5.2.1.1 Typy účinku antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky lze rozdělit podle účinku na cidní a statické. Látky baktericidní mají rychlý účinek, který bývá patrný do 48 hodin od podání léčiva. Jejich působením dochází k usmrcení bakteriální buňky a tím pádem je jejich účinek nevratný. K baktericidním antibiotikům řadíme hlavně β -laktamy (cefalosporiny a peniciliny), glykopeptidy (vankomycin), polypeptidy (kolistin) a aminoglykosidy (gentamicin a streptomycin).

Látky s bakteriostatickým účinkem bakteriální buňky neusmrcují, pouze inhibují jejich množení a růst. Jejich účinek je pomalejší než u baktericidních látek a bývá zřejmý až za 3-4 dny. Do bakteriostatických antibiotik řadíme např. makrolidy, tetracykliny a chloramfenikol.

Další dělení antibiotik je na základě míry jejich účinku. Dělí se na úzkospektrá, která působí jen na malé množství druhů, dále na středně širokospektrá a na širokospektrá, která působí na velké množství mikrobiálních druhů (Votava, 2010).

5.2.1.2 Mechanismus účinku antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky inhibují řadu důležitých pochodů, které jsou důležité pro správnou funkčnost bakteriální buňky, jako například funkci buněčné membrány, syntézu buněčné stěny, nukleových kyselin a proteinů a další důležité metabolické kroky.

5.2.1.3 Mechanismus rezistence

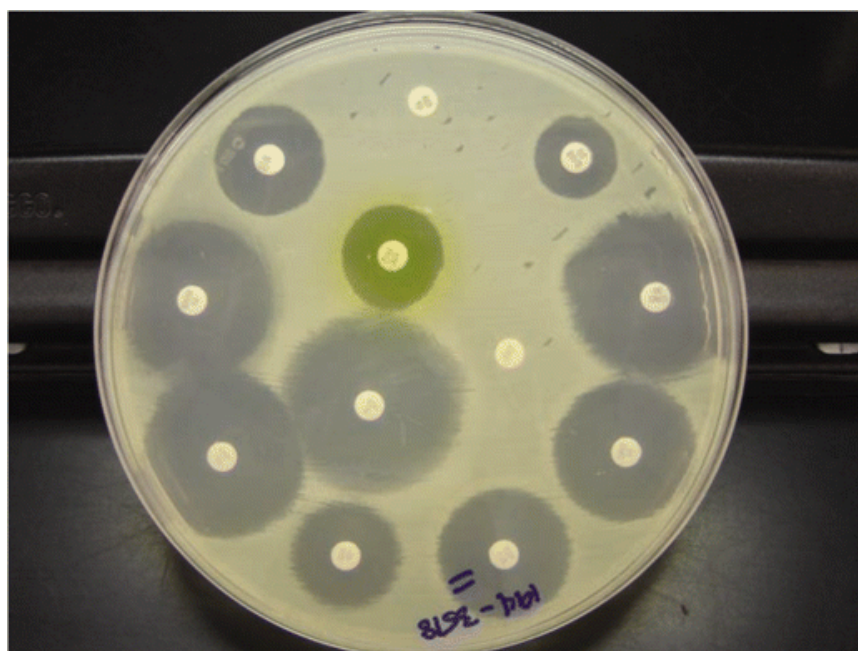
Rozlišují se čtyři cesty, kterými může mikroorganismus získat rezistenci. Nejčastěji je rezistence způsobena potlačením účinku antibiotika působením bakteriálních enzymů jako jsou β -laktamázy. Další možností je, že má mikroorganismus schopnost urychleně vyčerpávat antibiotikum ven z buňky, nebo naopak pokud se ztíží průnik antibiotika dovnitř buňky. Poslední možností je, že se změní cílová molekula, na kterou se antibiotikum váže (Votava, 2010).

5.2.2 Tradiční metody testování citlivosti na antimikrobiální látky

Standardizované metody testování citlivosti bakterií prováděné v klinických mikrobiologických laboratořích poskytují jak kvalitativní, tak kvantitativní výsledky udávané na základě velikosti zóny inhibice nebo minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). MIC je nejnižší koncentrace látky, která zastaví růst daného mikroorganismu. MBC udává nejnižší koncentraci látky, která usmrtí 99,9% z původního počtu mikroorganismů (Bauer et al., 1966; Jorgensen a Ferraro, 1998).

Jednou z nejjednodušších a nejspolehlivějších kvalitativních metod testování citlivosti je disková difúzní metoda (Bauer et al., 1966), kdy se na povrch naočkované pevné kultivační půdy umístí až 12 papírových pevných diskových filtrů napuštěných antibiotiky s určitou koncentrací a po inkubaci se měří průměry jednotlivých inhibičních zón růstu kolem každého z antibiotických disků (Votava, 2010; Schumacher et al., 2018).

Mezi kvantitativní metody patří například stanovení MIC. Stanovení se provádí v mikrotitračních destičkách, které jsou naplněné růstovým médiem a rozdílnými koncentracemi antibiotik. Po dokončení kultivace se odečítají výsledky podle toho, jestli se růstové médium zakalilo a tím pádem kmen roste, nebo médium zůstalo čiré a růst kmene byl inhibován (Votava, 2010).



Obrázek 11: Ukázka výsledku diskové difúzní metody (Jorgensen a Ferraro, 2009).

5.2.3 Testování citlivosti na antimikrobiální látky pomocí FCM

Další možností je detekování citlivosti na antibiotika monitorováním změn fyziologických a morfologických charakteristik buněk pomocí aplikace specifických fluorescenčních sond či značek a FCM. Tato technika poskytuje významné výhody v porovnání s tradičními metodami. FCM umožňuje rychlou analýzu mikrobiální populace a poskytuje informace o různorodosti individuálních bakteriálních odpovědí na antibiotika. Nejčastěji testovanými charakteristikami jsou změny v integritě buněčné membrány, membránového potenciálu a obsahu DNA indukované působením antibiotik (Mason et al., 2001).

5.2.3.1 Stanovení citlivosti na základě antibioticky indukovaných změn membránového potenciálu

Použití membránových barviv, jejichž spektrální charakteristiky závisí na membránovém potenciálu, jako indikátorů citlivosti na bakteriální antibiotika je založeno na předpokladu, že antibiotikum bude narušovat metabolickou aktivitu vnímavých buněk, bez ohledu na cílové místo, což bude mít za následek změnu membránového potenciálu.

Mezi takováto barviva patří například BOX (DiBAC₄(3)), který má zvýšenou vazebnou afinitu pro depolarizované membrány a lze jej využít pro stanovení bakteriální citlivosti na řadu antimikrobiálních látek u grampozitivních i gramnegativních bakterií (Mason et al., 2001).

5.2.3.2 Stanovení citlivosti k antibiotikům na základě porušení buněčné membrány

Změny v membránovém potenciálu nejsou pomocí BOX vždy detekovány. Jako doplňkový indikátor k němu může být použit PI, který patří mezi často používaná barviva pro stanovení integrity buněčné membrány. Pokud je integrita narušena vlivem působení antibiotik, PI pronikne do buňky, pevně se naváže na nukleové kyseliny a způsobí červenou fluorescenci (Mason et al., 2001; Kennedy et al., 2011).

5.2.3.3 Testování citlivosti na antibiotika inhibující syntézu proteinů a nukleových kyselin

Antibiotika, která inhibují syntézu proteinů nebo nukleových kyselin, jako je chloramfenikol nebo rifampicin, nemusí výrazně ovlivňovat membránový potenciál nebo membránovou integritu. Citlivost na tato antibiotika může být detekována monitorováním obsahu nukleových kyselin pomocí barviva SYBR Green I, kdy se měří rozdíly v obsahu DNA mezi buňkami kontroly a buňkami ošetřenými antibiotiky (Mason et al., 2001).

5.3 Využití průtokové cytometrie ve virologii

Pomocí průtokové cytometrie lze detekovat nejen bakterie a kvasinky, ale lze také detekovat buňky infikované virem. Virové antigeny lze identifikovat buď na povrchu, nebo uvnitř infikovaných buněk za použití protilátek, které je specificky rozpoznávají (Laffin et al., 1989; McSharry et al., 1990). Tyto specifické protilátky namířené proti danému antigenu lze využít spolu s protilátkou značenou FITC (fluorescein isothiokyanát) a následnou detekcí a kvantifikací antigenní exprese na buňkách pomocí FCM k detekci daného viru. V případě detekování intracelulárních antigenů je nutná permeabilizace buněk. Tento krok je nezbytný k tomu, aby byla protilátka schopna proniknout do buňky a rozpoznat příslušný antigen (McSharry, 1994). Také umožňuje současnou detekci několika virů ve vzorku při použití protilátek proti různým virovým antigenům konjugovaných s různými fluorochromy, nebo

specifických protilátek konjugovaných s latexovými částicemi různých velikostí (McSharry et al., 1990; McSharry, 1994).

5.3.1 HIV infekce a AIDS

Infekce virem HIV vyvolávají některé defekty imunologické odpovědi. Exprese viru může být vyhodnocena průtokovou cytometrií odhalením přítomnosti buď virové RNA, nebo specifických virových proteinů. Virová RNA je hybridizována s oligonukleotidovými sondami značenými fluorochromem. Pomocí dvoubarevného značení lze identifikovat buněčné populace exprimující virus (Cooper et al., 1988; Drouet a Lees, 1993).

ZÁVĚR

Průtoková cytometrie je metoda, která slouží k analýze různých druhů buněk v suspenzi. Dříve byla využívána hlavně pro studium eukaryotických buněk. Až další vývoj techniky a přístrojové elektroniky vedl ke zkoumání jejího použití v mikrobiologii. Hlavním úskalím jejího využití v mikrobiologii je malá velikost a značná strukturní i funkční rozmanitost mikrobiálních druhů, vysoká cena přístroje a také to, že k obsluze průtokového cytometru je zapotřebí speciálně vyškolený pracovník. Oproti tomu mezi její výhody patří rychlost a možnost stanovení několika parametrů buněk najednou. I přes řadu překážek průtoková cytometrie v nynější době nachází v mikrobiologii čím dál větší uplatnění.

Cílem této práce bylo prozkoumat a shrnout možné využití průtokové cytometrie na poli mikrobiologie. V první části práce byl stručně popsán průtokový cytometr, zejména princip fungování fluidního, optického a počítačového systému jako jeho jednotlivých částí. V další části je uvedeno několik příkladů uplatnění průtokové cytometrie v jiných biologických klinických oborech, kde se již používá k rutinní analýze, jako např. v hematologii, imunologii nebo onkologii.

Další kapitoly jsou věnované využití průtokové cytometrie v mikrobiologii. Mezi hlavní stanovení patří počet buněk a jejich životaschopnost. Dále lze pomocí průtokové cytometrie provádět např. testování citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky nebo rozlišovat grampozitivní a gramnegativní mikroorganismy. Při použití specifických monoklonálních protilátek, nebo fluorescenční *in situ* hybridizace spolu s průtokovou cytometrií lze dokonce rozlišit jednotlivé mikrobiální druhy.

Průtoková cytometrie se v dnešní době běžně využívá v potravinářském průmyslu, např. v mlékárnách nebo pivovarech. Uplatnění našla i ve farmaceutickém průmyslu, úpravě pitné vody či v ekologii, nicméně její využití v mikrobiologii stále není běžnou praxí. Na druhou stranu má tato metoda velký potenciál, takže se dá předpokládat, že se v budoucnu stane silným nástrojem v rutinní analýze v mikrobiologii.

CITOVANÁ LITERATURA

AEBISHER, D., D. BARTUSIK a J. TABARKIEWICZ. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2017, **85**, 434–443. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2016.11.048

ALLMAN, R., A. C. HANN, R. MANCHEE a D. LLOYD. Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometry. *The Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1992, **73**(5), 438–444. ISSN 0021-8847. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb05001.x

ALVAREZ-BARRIENTOS, A., J. ARROYO, R. CANTÓN, C. NOMBELA a M. SÁNCHEZ-PÉREZ. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2000, **13**(2), 167–195. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/cmr.13.2.167-195.2000

BAILEY, J. E., J. FAZEL-MAKJLESSI, D. N. MCQUITTY, Y. N. LEE, J. C. ALLRED a J. A. ORO. Characterization of bacterial growth by means of flow microfluorometry. *Science (New York, N. Y.)* [online]. 1977, **198**(4322), 1175–1176. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.412254

BALVAN, J., M. RAUDENSKÁ, M. MASARÍK a R. KIZEK. Analýza programované buněčné smrti průtokovou cytometrií. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, **3**, 60–63.

BANERJEE, A., M. YASSERI a M. MUNSON. A method for the detection and quantification of bacteria in human carious dentine using fluorescent in situ hybridisation. *Journal of Dentistry* [online]. 2002, **30**(7–8), 359–363. ISSN 0300-5712. Dostupné z: doi:10.1016/s0300-5712(02)00052-0

BAUER, A. W., W. M. KIRBY, J. C. SHERRIS a M. TURCK. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966, **45**(4), 493–496. ISSN 0002-9173.

BAUMGARTH, N. a M. ROEDERER. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2000, **243**(1–2), 77–97. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-1759(00)00229-5

BAYLISS, K. M., B. D. KUECK, S. T. JOHNSON, J. T. FUEGER, P. W. MCFADDEN, D. MIKULSKI a J. L. GOTTSCHALL. Detecting fetomaternal hemorrhage: a comparison of five methods. *Transfusion* [online]. 1991, **31**(4), 303–307. ISSN 0041-1132. Dostupné z: doi:10.1046/j.1537-2995.1991.31491213292.x

BOUIX, M. a S. GHORBAL. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring

intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **193**, 139–146. ISSN 1879-3460. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.019

BOUIX, M. a S. GHORBAL. Assessment of bacterial membrane fluidity by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2017, **143**, 50–57. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2017.10.005

BRANSKÁ, B., M. LINHOVÁ, P. PATÁKOVÁ, L. PAULOVÁ a K. MELZOCH. Fluorescence Analysis as a Tool for Determination of Viability of Microorganisms. *Chemické listy* [online]. 2011, **105**(8) [cit. 2019-05-05]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1093>

BROWN, M. a C. WITWER. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. 2000, **46**(8), 1221–1229. ISSN 0009-9147, 1530-8561.

BUNTHOF, C. J., S. VAN DEN BRAAK, P. BREEUWER, F. M. ROMBOUTS a T. ABEE. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, **65**(8), 3681–3689. ISSN 0099-2240.

BUNTHOF, C. J., S. VAN SCHALKWIJK, W. MEIJER, T. ABEE a J. HUGENHOLTZ. Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, **67**(9), 4264–4271. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.67.9.4264-4271.2001

CARON, G. N., P. STEPHENS a R. A. BADLEY. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 1998, **84**(6), 988–998. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00436.x

COOPER, D. A., B. TINDALL, E. J. WILSON, A. A. IMRIE a R. PENNY. Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 1988, **157**(5), 889–896. ISSN 0022-1899. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/157.5.889

DAVEY, H. M. a D. B. KELL. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*. 1996, **60**(4), 641–696. ISSN 0146-0749.

DAVEY, H. M. a M. K. WINSON. Using Flow Cytometry to Quantify Microbial Heterogeneity. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. 2003 [cit. 2019-05-05]. ISSN 14673037. Dostupné z: doi:10.21775/cimb.005.009

DE ROSA, R., S. GROSSO, G. LORENZI, G. BRUSCHETTA a A. CAMPORESE.

Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2018, **484**, 171–178. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2018.05.047

DELANGHE, J. R., T. T. KOURI, A. R. HUBER, K. HANNEMANN-POHL, W. G. GUDER, A. LUN, P. SINHA, G. STAMMINGER a L. BEIER. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2000, **301**(1), 1–18. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-8981(00)00342-9

DENICH, T. J., L. A. BEAUDETTE, H. LEE a J. T. TREVORS. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2003, **52**(2), 149–182. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7012(02)00155-0

DÍAZ, M., M. HERRERO, L. A. GARCÍA a C. QUIRÓS. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* [online]. Invited Review Issue 2010, **48**(3), 385–407. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2009.07.013

DINSDALE, M. G., D. LLOYD, P. MCINTYRE a B. JARVIS. Yeast vitality during cider fermentation: assessment by energy metabolism. *Yeast (Chichester, England)* [online]. 1999, **15**(4), 285–293. ISSN 0749-503X. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19990315)15:4<285::AID-YEA376>3.0.CO;2-2

DROUET, M. a O. LEES. Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology. *Biology of the Cell* [online]. 1993, **78**(1), 73–78. ISSN 0248-4900. Dostupné z: doi:10.1016/0248-4900(93)90117-W

DZIEGIEL, M. H., L. K. NIELSEN a A. BERKOWICZ. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Current Opinion in Hematology* [online]. 2006, **13**(6), 490–495. ISSN 1065-6251. Dostupné z: doi:10.1097/01.moh.0000245687.09215.c4

FLINT, S., K. WALKER, B. WATERS a R. CRAWFORD. Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(4), 909–915. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03167.x

GUNASEKERA, T. S., M. R. DORSCH, M. B. SLADE a D. A. VEAL. Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2003, **94**(5), 936–945. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01930.x

GUNASEKERA, T. S., P. V. ATTFIELD a D. A. VEAL. A Flow Cytometry Method for

Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, **66**(3), 1228–1232. ISSN 0099-2240.

GUTTIKONDA, S., X. L. TANG, B. M. YANG, G. D. ARMSTRONG a M. R. SURESH. Monospecific and bispecific antibodies against E. coli O157 for diagnostics. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2007, **327**(1–2), 1–9. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2007.06.010

HAWLEY, T. S. a R. G. HAWLEY. *Flow cytometry protocols*. 2nd ed. Totowa, N. J.: Humana Press. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N. J.), c2004, 263 s. ISBN 1-588-29-235-5.

HERRERO, M., C. QUIRÓS, L. A. GARCÍA a M. DÍAZ. Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(10), 6725–6733. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01183-06

HEWITT, C. J., G. NEBE-VON CARON, B. AXELSSON, C. M. MCFARLANE a A. W. NIENOW. Studies related to the scale-up of high-cell-density E. coli fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, **70**(4), 381–390. ISSN 0006-3592.

HOLLVILLE, E. a S. J. MARTIN. Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology* [online]. 2016, **112**, 14.38.1-14.38.24. ISSN 1934-368X. Dostupné z: doi:10.1002/0471142735.im1438s112

HOLM, C. a L. JESPERSEN. A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2003, **69**(5), 2857–2863. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.69.5.2857-2863.2003

HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Praha: Triton, 1998, 219 s. ISBN 80-85875-73-x.

HOY, T. G. Flow cytometry: clinical applications in haematology. *Baillière's Clinical Haematology* [online]. 1990, **3**(4), 977–998. ISSN 0950-3536. Dostupné z: doi:10.1016/S0950-3536(05)80143-X

HULETT, H. R., W. A. BONNER, J. BARRETT a L. A. HERZENBERG. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science (New York, N. Y.)* [online]. 1969, **166**(3906), 747–749. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.166.3906.747

JEPRAS, R. I., F. E. PAUL, S. C. PEARSON a M. J. WILKINSON. Rapid assessment of

antibiotic effects on Escherichia coli by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1997, **41**(9), 2001–2005. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.41.9.2001

JORGENSEN, J. H. a M. J. FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 1998, **26**(4), 973–980. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/513938

JORGENSEN, J. H. a M. J. FERRARO. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* [online]. 2009, **49**(11), 1749–1755. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/647952

JUNG, W. K., H. C. KOO, K. W. KIM, S. SHIN, S. H. KIM a Y. H. PARK. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2008, **74**(7), 2171–2178. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02001-07

JUNG, Y. S., J. F. FRANK a R. E. BRACKETT. Evaluation of antibodies for immunomagnetic separation combined with flow cytometry detection of Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection* [online]. 2003, **66**(7), 1283–1287. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028x-66.7.1283

KAČÍRKOVÁ, P. a V. CAMPR. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. Praha: Grada, 2007, 285 s. ISBN 978-80-247-1853-8.

KEMPF, V. A., K. TREBESIUS a I. B. AUTENRIETH. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, **38**(2), 830–838. ISSN 0095-1137.

KENNEDY, D., U. P. CRONIN a M. G. WILKINSON. Responses of Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus to simulated food processing treatments, determined using fluorescence-activated cell sorting and plate counting. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(13), 4657–4668. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00323-11

KENNEDY, D. a M. G. WILKINSON. Application of Flow Cytometry to the Detection of Pathogenic Bacteria. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. 2017, **23**, 21–38. ISSN 1467-3045. Dostupné z: doi:10.21775/cimb.023.021

KENNY, J. H., Y. ZHOU, M. E. SCHRIEFER a S. W. BEARDEN. Detection of viable Yersinia pestis by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2008, **75**(2), 293–301. ISSN 0167-7012. Dostupné

z: doi:10.1016/j.mimet.2008.06.021

KOBAYASHI, M., H. SHIMIZU a S. SHIOYA. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2007, **103**(5), 451–456. ISSN 1389-1723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.103.451

KOŠIN, P., J. ŠAVEL, I. KOLOUCHOVÁ a A. BROŽ. Yeast viability and vitality in brewery fermentation. *Kvasný Průmysl* [online]. 2007, **53**(2), 30–34. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2007002

KRÁLOVEC, K. Optické mikroskopické metody ve zdravotnictví. Počítání buněk. Učební text. *Univerzita Pardubice* [online]. 2012 [cit. 2019-06-22]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/opt.mikr.met.ve-zdra./pocitani-bunek.pdf>

LAFFIN, J., D. FOGLEMAN a J. M. LEHMAN. Correlation of DNA content, p53, T antigen, and V antigen in simian virus 40-infected human diploid cells. *Cytometry* [online]. 1989, **10**(2), 205–213. ISSN 0196-4763. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.990100212

LAGUADO, J. Applications of flow cytometry in microbiology veterinary science and agriculture. *Revista MVZ Córdoba*. 2007, **12**(2), 1077–1095. ISSN 0122-0268.

LAPLACE-BUILHÉ, C., K. HAHNE, W. HUNGER, Y. TIRILLY a J. L. DROCOURT. Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biology of the Cell* [online]. 1993, **78**(1–2), 123–128. ISSN 0248-4900. Dostupné z: doi:10.1016/0248-4900(93)90122-u

LLOYD, D., C. A. MORAN, M. T. E. SULLER, M. G. DINSDALE a A. J. HAYES. Flow Cytometric Monitoring of Rhodamine 123 and a Cyanine Dye Uptake by Yeast During Cider Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1996, **102**(4), 251–259. ISSN 2050-0416. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1996.tb00910.x

LOCHMANOVÁ, A., D. CHMELARŤ, V. BERAN a M. HÁJEK. Flow cytometry in microbiology. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Společnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Společnosti J. E. Purkyne*. 2017, **66**(4), 182–188. ISSN 1210-7913.

LONGIN, C., C. PETITGONNET, M. GUILLOUX-BENATIER, S. ROUSSEAUX a H. ALEXANDRE. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology* [online]. 2017, **62**, 221–231. ISSN 1095-9998. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2016.10.023

LOOSER, V., F. HAMMES, M. KELLER, M. BERNEY, K. KOVAR a T. EGLI. Flow-cytometric detection of changes in the physiological state of E. coli expressing a heterologous membrane protein during carbon-limited fedbatch cultivation. *Biotechnology and*

Bioengineering [online]. 2005, **92**(1), 69–78. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20575

MALACRINÒ, P., G. ZAPPAROLI, S. TORRIANI a F. DELLAGLIO. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2001, **45**(2), 127–134. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7012(01)00243-3

MARINOV, I. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2.*, přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton, 2008, 148 s. ISBN 978-80-7387-143-7.

MASON, D. J., F. C. MORTIMER a V. A. GANT. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry* [online]. 2001, Chapter **11**, Unit 11.8. ISSN 1934-9300. Dostupné z: doi:10.1002/0471142956.cy1108s08

MASON, D. J., S. SHANMUGANATHAN, F. C. MORTIMER a V. A. GANT. A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, **64**(7), 2681–2685. ISSN 0099-2240.

MASOPUST, J. a M. PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. 392 s. ISBN 978-80-204-3740-2.

MCCARTHY, M. a S. C. CULLOTY. Optimization of two immunofluorescent antibodies for the detection of *Escherichia coli* using immunofluorescent microscopy and flow cytometry. *Current Microbiology* [online]. 2011, **62**(2), 402–408. ISSN 1432-0991. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-010-9721-3

MCSHARRY, J. J. Uses of flow cytometry in virology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1994, **7**(4), 576–604. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/cmr.7.4.576

MCSHARRY, J. J., R. COSTANTINO, E. ROBBIANO, R. ECHOLS, R. STEVENS a J. M. LEHMAN. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990, **28**(4), 724–733. ISSN 0095-1137.

MELAMED, M. R. A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods in cell biology* [online]. 2001, **63**, 3.17. ISSN 0091-6797. Dostupné z: doi.org/10.1016/S0091-679X(01)63005-X

MORGAN, C. A., P. BIGENI, N. HERMAN, M. GAUCI, P. A. WHITE a G. VESEY. Production of precise microbiology standards using flow cytometry and freeze drying. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* [online]. 2004, **62**(2), 162–168. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20075

MOYES, R. B., J. REYNOLDS a D. P. BREAKWELL. Differential staining of bacteria:

gram stain. *Current Protocols in Microbiology* [online]. 2009, Appendix 3, Appendix 3C. ISSN 1934-8533. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15

MYKYTCZUK, N. C. S., J. T. TREVORS, L. G. LEDUC a G. D. FERRONI. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. 2007, 95(1–3), 60–82. ISSN 0079-6107. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.05.001

NOVÁK, J. a G. BASAŘOVÁ. Průtoková cytometrie ve výzkumu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Listy*. 2008, 5.

NOVO, D., N. G. PERLMUTTER, R. H. HUNT a H. M. SHAPIRO. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*. 1999, 35(1), 55–63. ISSN 0196-4763.

PAPADIMITRIOU, K., H. PRATSINIS, G. NEBE-VON-CARON, D. KLETSAS a E. TSAKALIDOU. Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2006, 111(3), 197–205. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.042

PAPADIMITRIOU, K., H. PRATSINIS, G. NEBE-VON-CARON, D. KLETSAS a E. TSAKALIDOU. Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, 73(2), 465–476. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01244-06

PECKA, M. a M. BLÁHA. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010, 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.

PENKA, M. a E. SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: Grada, 2011, 421 s. ISBN 978-80-247-3459-0.

RAULT, A., C. BÉAL, S. GHORBAL, J. C. OGIER a M. BOUIX. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* [online]. 2007, 55(1), 35–43. ISSN 0011-2240. Dostupné z: doi:10.1016/j.cryobiol.2007.04.005

REIS, A., T. L. DA SILVA, C. A. KENT, M. KOSSEVA, J. C. ROSEIRO a C. J. HEWITT. Monitoring population dynamics of the thermophilic *Bacillus licheniformis* CCM1 1034 in batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. *Journal of Biotechnology* [online]. 2005, 115(2), 199–210. ISSN 0168-1656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.005

RIEGER, A. M., B. E. HALL, L. T. LUONG, L. M. SCHANG a D. R. BARREDA.

Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2010, **358**(1–2), 81–92. ISSN 1872-7905. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2010.03.019

RIIS, S. B., H. M. PEDERSEN, N. K. SØRENSEN a M. JAKOBSEN. Flow cytometry and acidification power test as rapid techniques for determination of the activity of starter cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiology* [online]. 1995, **12**, 245–250. ISSN 0740-0020. Dostupné z: doi:10.1016/S0740-0020(95)80104-9

ROCKEY, N., H. N. BISCHER, T. KOHN, B. PECSON a K. R. WIGGINTON. The utility of flow cytometry for potable reuse. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2019, **57**, 42–49. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2018.12.009

ROSSELLÓ, G. A. M. a J. M. E. BOUZA. Citometría de flujo: Fundamento, instrumentación y aplicaciones en microbiología clínica. *Electron J Biomed* [online]. 2012, **3**, 45-53 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <https://biomed.uninet.edu/2012/n3/march.html?fbclid=IwAR3CuqymWdxLR-xNRcKVUvo9yagBnFykhVi1AN2ev2-QOQSdA-kFgpH5Ia8>

ROUBALOVÁ, L. Průtoková cytometrie. *FONS: bulletin pro odborníky z oblastí: klinické biochemie, laboratorní diagnostiky, výpočetní techniky, laboratorní a zdravotnické techniky*. 2012, **22**(2), 5–9.

SHAPIRO, H. M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2000, **42**(1), 3–16. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/s0167-7012(00)00167-6

SHAPIRO, H. M. *Practical Flow Cytometry*. 4. vyd. [online]. New York: Copyright John Wiley and Sons, Inc., 2003 [cit. 2020-06-20]. Dostupné z: doi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471722731>

SCHUMACHER, A., T. VRANKEN, A. MALHOTRA, J. J. C. ARTS a P. HABIBOVIC. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2018, **37**(2), 187–208. ISSN 0934-9723. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-017-3089-2

SIGMA-ALDRICH, Inc. *Product katalog* [online]. 2020 [cit. 2020-07-04]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>

STENDER, H., M. FIANDACA, J. J. HYLDIG-NIELSEN a J. COULL. PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2002, **48**(1), 1–17. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/s0167-7012(01)00340-2

STITES, D. P. a A. I. TERR. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994, 744 s. ISBN 80-85605-37-6.

ŠINKOROVÁ, Z. a L. ZÁRYBNICKÁ. Flow Cytometry As an Analytical and Selective Method. Part I. *Vojenské zdravotnické listy*. 2008, **6**.

UYTTENDAELE, M., A. RAJKOVIC, N. VAN HOUTEGHEM, N. BOON, O. THAS, J. DEBEVERE a F. DEVLIEGHERE. Multi-method approach indicates no presence of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* cells after mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, **123**(3), 262–268. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.015

VEAL, D. A., D. DEERE, B. FERRARI, J. PIPER a P. V. ATTFIELD. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2000, **243**(1–2), 191–210. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(00)00234-9

VIVES-REGO, J., P. LEBARON a G. NEBE-VON CARON. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2000, **24**(4), 429–448. ISSN 0168-6445. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-6445(00)00033-4

VOLKERT, M., E. ANANTA, C. LUSCHER a D. KNORR. Effect of air freezing, spray freezing, and pressure shift freezing on membrane integrity and viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Food Engineering* [online]. 2008, **87**(4), 532-540 [cit. 2020-06-02]. ISSN 0260-8774. Dostupné z: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/726070>

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.

WALBERG, M. a H. B. STEEN. Flow cytometric monitoring of bacterial susceptibility to antibiotics. *Methods in Cell Biology* [online]. 2001, **64**, 553–566. ISSN 0091-679X. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(01)64029-9

YANG, Chun-Chun, Shang-Jen CHANG, S. Shei-Dei YANG, Chia-D. LIN a Chiung-Hui PENG. Rapid diagnosis of uncomplicated urinary tract infection with laser flow cytometry. *Urological Science* [online]. 2016, **27**(3), 135–139. ISSN 1879-5226. Dostupné z: doi:10.1016/j.urols.2016.09.001