

Možnosti využití průtokové cytometrie ke stanovení antimikrobiálních účinků

Ivana Zicháčková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ivana ZICHÁČKOVÁ**
Osobní číslo: **T10500**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti využití průtokové cytometrie ke stanovení antimikrobiálních účinků**

Zásady pro vypracování:

- 1. Princip průtokové cytometrie.**
- 2. Využití a aplikace průtokové cytometrie.**
- 3. Stanovení antimikrobiálních účinků průtokovou cytometrií.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

[1] MARINOV, Iuri. Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton, 2008, 148 s. ISBN 978-807-3871-437.

[2] DIAZ, Mario, Monica HERRERO, Luis A. GARCIA a Covadonga QUIROS. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. 2010, roč. 48, č. 3, s. 385-407. ISSN 1369703x. DOI: 10.1016/j.bej.2009.07.013.

[3] SHUBAR, H. M., J. P. MAYER, W. HOPFENMULLER a O. LIESENFELD. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against Toxoplasma gondii and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008, roč. 61, č. 5, s. 1110-1119. ISSN 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkn047.

[4] BROGER, Tobias, Res P. ODERMATT, Pascal HUBER a Bernhard SONNLEITNER. Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring. Journal of Biotechnology. 2011, roč. 154, č. 4, s. 240-247. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.05.003.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2013

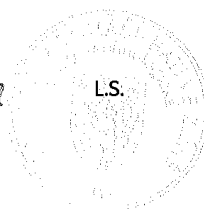
Termín odevzdání bakalářské práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně^{16.5.2013}.....

.....^{Bati}.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Průtoková cytometrie představuje novou laboratorní techniku, která je založena na principu fluorescence a rozptylu světla. Slouží k rychlé kvantifikaci a identifikaci buněk ve vzorku, k určení a analýze buněčných parametrů a v neposlední řadě i k buněčnému třídění. Průtoková cytometrie představuje perspektivní laboratorní techniku, která umožňuje ve velmi krátké době poskytnout informace o citlivosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Díky tomu našla široké uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, medicíně, ekologii, vědě a výzkumu.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, antimikrobiální účinky, mikroorganismus

ABSTRACT

Flow cytometry is a new laboratory technique which is based on the principle of fluorescence and light scattering. Used for rapid identification and quantification of cells in the sample to identify and analyze cell parameters and ultimately also to cell sorting. Flow cytometry is promising laboratory technique which allows in a very short time to provide information on the susceptibility of microorganisms to antimicrobial effect. Found an extensive application in the food and pharmaceutical industries, medicine, ecology, science and investigation.

Keywords: flow cytometry, antimicrobial activity, microorganism

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Magdě Doležalové, PhD. za čas, trpělivost, cenné rady, připomínky a materiály, které mi k tvorbě mé práce poskytla.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 POPIS TECHNIKY PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE	11
1.1 PRINCIP PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE.....	12
1.1.1 Hydraulický kapalinový systém	12
1.1.2 Světelné zdroje	13
1.1.3 Optický systém	13
1.1.4 Detektory a zpracování signálu	14
1.1.5 Sběr dat a jejich zpracování	14
1.2 ZÁKLADNÍ PARAMETRY ANALÝZY PRŮTOKOVÝM CYTOMETREM	15
1.2.1 Dopřední a boční rozptyl.....	15
1.2.2 Fluorescence.....	15
2 VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE	17
2.1 APLIKACE V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU	17
2.2 LÉKAŘSKÉ APLIKACE A FARMACEUTICKÝ PRŮMYSL	19
2.3 VYUŽITÍ V BIOLOGII A BOTANICE	19
3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY	21
3.1 MECHANISMUS PŮSOBENÍ.....	21
3.1.1 Látky poškozující buněčné struktury.....	21
3.1.2 Látky inhibující syntézu bílkovin v ribozomu	21
3.1.3 Látky inhibující syntézu nukleových kyselin	22
3.1.4 Látky inhibující metabolismus	22
3.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	22
4 STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ	24
4.1 POUŽÍVANÁ FLUORESCENČNÍ BARVIVA	25
4.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI MIKROORGANISMŮ	28
4.3 DETEKCE MIKROORGANISMŮ.....	29
4.3.1 Bakterie	29
4.3.2 Kvasinky.....	31
4.3.3 Viry.....	32
ZÁVĚR	34
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK	42

ÚVOD

První pojednání o využití průtokové cytometrie v mikrobiologii pocházejí ze 70. let 20. století, kdy byla průtoková cytometrie použita k analýze kvasinek. Tato laboratorní technika byla totiž původně vyvinuta ke studiu eukaryotických buněk vzhledem k jejich větší velikosti ve srovnání s buňkou prokaryotickou. Různorodé analýzy byly aplikovány až po roce 1988, což bylo pravděpodobně způsobeno složitostí přístrojového vybavení, které neumožňovalo běžné průmyslové používání této technologie a neexistovaly ani dostačující pracovní postupy. Časem docházelo k dokonalejšímu vývoji optických a fluorescenčních technologií vedoucí k propracovanějšímu vývoji, výzkumu a analýzám v různých oblastech. Dnes průtoková cytometrie umožňuje rychlou a přesnou detekci ke zjištění přítomnosti mikroorganismů a jejich životaschopnosti.

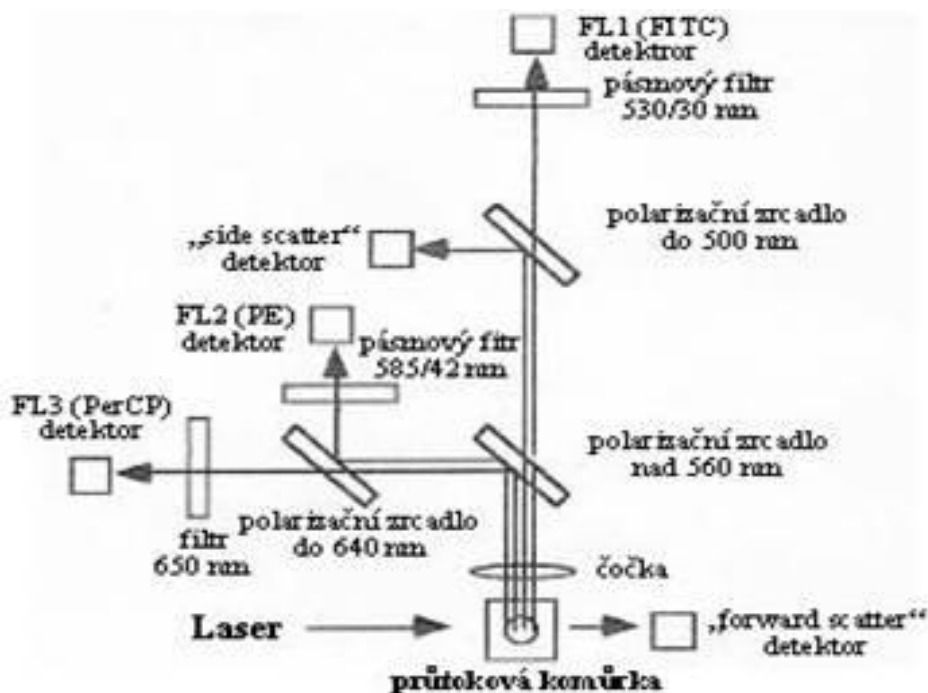
Obrovskou výhodou průtokové cytometrie je, že dokáže ve vzorcích stanovit i života schopné buňky, které v důsledku poškození nemohou růst na běžném kultivačním médiu. Je známo, že mikroorganismus, který je ve stresu a hladoví, dokáže poupravit svůj metabolismus a přežít díky nekultivovatelnému stádiu. V tomto stádiu vykazuje buňka v různé míře metabolickou aktivitu, ale na výživném neselektivním médiu není schopná vyrůst. Dříve přežití těchto nekultivovatelných mikroorganismů nepředstavovalo významný problém, ale v průběhu let bylo zjištěno, že se podílejí na různorodých procesech v oblasti lidské pozornosti, jako jsou produkty průmyslové fermentace (alkoholické nápoje, mléčné výrobky, výroba léčiv, atp.) nebo jakost a zdravotní nezávadnost potravin. V poslední době, je těmto mikroorganismům věnována velká pozornost, neboť mohou být nezanedbatelným zdrojem kontaminace a nálezů. Velká většina patogenů si v nekultivovatelném stádiu zachovává svou patogenitu a infekčnost, která se může projevit v okamžiku, kdy se mikroorganismus ocitne v příznivém prostředí pro jeho růst.

Vlastnosti jako rychlost, přesnost a velká citlivost učinily z průtokové cytometrie nezávislou techniku charakterizující buněčné kultury. Díky univerzálnosti a vysoké automatizaci spolu s vývojem fluorescenčních barviv, se za posledních třicet let stala tato technika jedním z nejmocnějších nástrojů pro studium mikrobiálních suspenzí, což umožňuje široké uplatnění v praxi i ve výzkumu. V současné době našla průtoková cytometrie široké uplatnění ve vědě a medicíně.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POPIS TECHNIKY PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Běžný průtokový cytometr tvoří několik základních jednotek: zdroj světla (laser nebo obouková lampa), optická soustava (čočky, filtry, zrcadla), hydraulický kapalinový systém, detektory signálu (měniče, fotodetektory) a počítačový systém (obr. 1) [1].



Obr. 1 – Schéma průtokového cytometru systém [2]

Průtoková cytometrie je proces umožňující určit povahu buněčné populace, která prochází skrze silný paprsek světla v úzkém proudu kapaliny. Pomocí této metody, lze stanovit optické (fyzikální) i fluorescenční (chemické) vlastnosti jednotlivých buněk nebo jejich součástí, např. jádra, jadérka, chromozomy, mikroorganismy, latexové části, zákaly aj. Intenzita vygenerovaných optických signálů (rozptylové, v případě použití fluorescenčního barviva, fluorescenční signály) je ve vzájemném vztahu s buněčnými parametry. Zásadním rysem průtokových cytometrů je jejich schopnost měřit obrovské množství částic, rychlostí 5 000 u běžných cytometrů a až 100 000 částic za vteřinu u specializovaných přístrojů. Díky tomu je možné určit různé vlastnosti buňky na buněčné (velikost, tvar, zrnitost, membránový potenciál, buněčný cyklus, apoptóza) i nitrobuněčné (obsah DNA a RNA, základní složení, obsah bílkovin, vnitrobuněčné pH, koncentrace některých iontů, velikost chromozomu, atd.) úrovni. Na tomto principu je možné rozřadit buňky nebo částice do populací

nebo i odhalit neobvyklé buňky ve vzorku. Nejmodernější přístroje dokážou měřit 10-15 parametrů na jednotlivých buňkách/částicích současně, proto se někdy používá termín multiparametrická (vícerozměrná) průtoková cytometrie. Průtokový cytometr lze s nadsázkou nazvat jako „automatický mikroskop“, který vyniká vlastnostmi jako je objektivita, přesnost, citlivost a rychlost analýzy [1,6].

Díky těmto vynikajícím schopnostem našla průtoková cytometrie četné uplatnění v klinické diagnostice, biotechnologiích a v základním a aplikovaném výzkumu, především pak v imunologii [1], molekulární biologii, [3], genetice, botanice [4], farmakologii, zoologii, mořské biologii a mikrobiologii [5].

1.1 Princip průtokové cytometrie

1.1.1 Hydraulický kapalinový systém

Hydraulický kapalinový systém, představuje klíčovou součást přístroje. Je zodpovědný za vytvoření tzv. hydrodynamického zaostřování, jehož hlavním úkolem je, vytvořit z buněčné suspenze úzký centrální průtok, který přivádí buňku po buňce v jedné řadě za sebou do ohniska světelného zdroje. Jednotlivé řazení buněk je velmi důležité z hlediska přesného měření, neboť se zabráni ucpání průchodnosti trysky, čehož se dosahuje vstříkovaním vzorku do proudícího pláště tekutiny (ve většině případů voda nebo fyziologický roztok), který se pohybuje větší rychlostí. Vyvolané zrychlení v průtokovém otvoru stimuluje buňky pohybovat se jednotlivě. Typická rychlost proudění se pohybuje v rozmezí 1 až 10 m/s, což odpovídá několika desítkám až stovkám buněk za sekundu [6].

Existují tři základní typy nastavení průtokové komůrky. V nastavení 'jet-in-air' vystupuje proud z komůrky do vnějšího prostoru, kde buňky protíná světelný paprskem. Při tomto nastavení je dosaženo poměrně velké rychlosti průtoku, neboť otvor průtokové komůrky má malý průměr, obvykle 75 μm . U nastavení 'Enclosed stream' jsou buňky měřeny při pohybu úzkou kapilárou, která má v průměru přibližně 250 μm , díky čemuž je dosaženo nižší rychlosti ale za to vyšší citlivosti. Při nastavení 'jet on open surface' jsou buňky analyzovány v tekoucím proudu na skleněném krycím sklíčku [4].

1.1.2 Světelné zdroje

V průtokové cytometrii jsou využívány dva druhy světelných zdrojů a to jsou lasery nebo obloukové lampy.

Obloukové lampy (rtuťové nebo zřídka xenonové) jsou využívány jako levný zdroj světla především v některých stolních přístrojích. Vyznačují se nízkou cenou a snadnou údržbou, což jsou hlavní výhody oproti laserovým světelným zdrojům. Naproti tomu především rtuťové lampy mají nízkou životnost (obvykle v rozmezí 200 až 400 hodin) a nízký výstupní výkon, což má za následek při fluorescenční analýze nízkou citlivost. Kromě toho může v rámci pracovního dne docházet k postupnému snižování intenzity světla. Obloukové lampy vysílají ne-monochromatické světlo, tudíž je nutné použít optické filtry pro požadovanou vlnovou délku (obvykle v UV) [4].

Laserový světelný zdroj vytváří stabilní, jasný a úzký paprsek monochromatického světla. Nevýhoda laserového světelného zdroje je jeho vysoká pořizovací cena. Výběr laseru závisí na typu buněčné analýzy a v závěru na rozsahu vlnových délek nutných pro stimulaci zvolených fluorescenčních značení. V moderních průtokových cytometrech je zdrojem světla modrý laser o vlnové délce 488 nm a červený laser o vlnové délce 635 nm. Na vzorek procházející průtokovou kyvetou je zaměřen laser a dochází k zachycení částic označené fluorochromem. Informace o velikosti buněk, jejich tvaru a intenzitě fluorescence poskytuje rozptýlené a fluorescenční světlo. Dioda dopředního rozptylu zachytí signál dopředního rozptylu a sběrná čočka fluorescence zachytí signály bočního rozptylu. Oba signály posléze spektrálně rozdělí dichroická zrcadla a filtry [1,4,6].

1.1.3 Optický systém

Optický systém tvoří několik dichroických zrcadel a filtry, které absorbují záření o určité vlnové délce a přenášejí ho pro následnou analýzu k vhodným fotonásobičům. Neupravený laserový paprsek má tvar kruhu o průměru přibližně 1-2 mm. Aby došlo k osvětlení každé buňky stejně, musí být paprsek objektivy zaměřen v odpovídajícím profilu. Výstupní světlo z osvětlených částic (shromážděné pomocí čočky s vysokou numerickou aperturou) je složeno z různých barev. Před zachycením fotodetektory, musí být tato spektrální směs rozdělena do určitých vlnových délek, což zajistí optická zrcadla, dichroická zrcadla a barevné filtry. Existují tři typy filtrů: dlouhé (propouští světlo nad zadanou vlnovou délku, tj. >520 nm), krátké (propouštějí světlo pod určitou vlnovou délku, tj. <575 nm) a pásmové (které

propouštění světlo omezených vlnových délek, které se blíží specifické hodnotě). Dichroická zrcadla (děliče svazku) jsou umístěny ve světelné dráze v úhlu 45° a mají podobnou funkci jako filtry, buďto odrážejí nebo propouštějí světlo specifických vlnových délek [1,4,6].

1.1.4 Detektory a zpracování signálu

Rozsah rozptýleného světla nebo fluorescence jsou zachyceny detektory, které měří světelný signál a převádějí jej na elektrický impuls. Detektory představují vysoce citlivé fotodiody nebo fotonásobiče. Vzhledem k tomu, kolika lasery a detektory je průtokový cytometr vybaven, je možné měřit až desítky fluorescenčních parametrů. Běžné komerčně prodávané přístroje, mají k dispozici i zesilovače signálu, které byly především dříve používány pro odhad obsahu jaderné DNA. Ve finále jsou elektronické signály digitalizovány a zpracovány do vzájemně souvisejících dat pomocí softwaru [1,4,6].

1.1.5 Sběr dat a jejich zpracování

Získaná data z rozptylu a fluorescence buněčných parametrů jsou zobrazována v grafické a číselné formě a ukládána pro další analýzu ve vestavěném počítači. Výstupem grafického zobrazení jsou histogramy jednoparametrové, kde je znázorněn počet buněk nebo částic na ose y a intenzita signálu nebo fluorescence na ose x, dvouparametrové zobrazují vzájemnou intenzitu signálů odpovídající různým parametrům v každé ose. U dvouparametrových histogramů dále rozlišujeme bodové grafy (dot plot histogram), které jsou užívány nejčastěji a zobrazují množství buněk pomocí hustoty bodů. Vrstevnicový graf (contour plot histogram), který vykazuje čáry připomínající vrstevnice a hustotní graf (density plot histogram), kdy je v každé oblasti část buněk reprezentována určitou barevnou škálou. Dvouparametrové histogramy umožňují zobrazit vzájemný vztah mezi dvěma jakýmkoliv parametry, který lze vizuálně odlišit. Během měření je možné i vybrat konkrétní buňky k analýze, které se obvykle rozlišují podle jejich fyzikálních vlastností na základě dopředního a bočního rozptylu (viz dále), což umožňuje analyzovat vysoký počet parametrů současně [6]. Samozřejmostí pro spolehlivou a přesnou analýzu je standardizace, kalibrace, kontrola a ověřování přístroje [5,7].

1.2 Základní parametry analýzy průtokovým cytometrem

Pomocí dopředního a bočního rozptylu a fluorescence je umožněno charakterizovat vnější a vnitřní buněčné parametry. Rozptylové signály jsou pro každou částici či buňku charakteristické a tudíž umožňují rozlišit různé typy buněk od buněčné drtě na základě jejich velikosti a vnitřního uspořádání. Kupříkladu lze tímto způsobem odlišit buňky kvasinek od bakterií, nebo rozdělit mikroorganismy do taxonomických skupin dle jejich rozptylového signálu [6].

1.2.1 Dopřední a boční rozptyl

Dopřední rozptyl (forward scatter channel – FCS)

Dioda dopředního rozptylu zachycuje signál v úhlu 20° od osy laserového paprsku a udává informace o velikosti buněk.

Boční rozptyl (side scatter channel – SSC)

Dioda zachycuje signál v úhlu 90° od osy laserového paprsku a poskytuje informace o buněčné složitosti, jako je např. počet organel, informace o jádru, buněčné membráně a vnitřním zrnitém materiálu [1,6].

1.2.2 Fluorescence

Fluorescence je fyzikálně chemický děj, který vzniká stimulací atomů působením jiného záření a následným návratem atomu do základního stavu kdy během tohoto děje dochází k vypouštění fotonů. Tento děj nám umožňuje na několik nanosekund po ozáření látky sledovat její luminiscenci, která po odstranění zdroje záření vymizí [8]. Fluorescence je zachycená násobičem v úhlu 90° od osy laserového paprsku, zvláště pro každý fluorochrom. Fluorescence poskytuje cenné informace o kvalitativních a kvantitativních membránových nebo cytoplazmatických receptorech značených určitým fluorochromem a intenzita závisí na typu použitého fluorochromu. Velmi běžné je také použití několika fluorochromů zároveň, což umožňuje plné využití techniky průtokové cytometrie a hlavním cílem je rozlišení buněk s různou strukturou nebo aktivitou. Pokud ovšem použijeme několik fluorochromů, které mají blízká spektrální pásma nebo se překrývají, počítačový systém provede kompenzaci fluorescenčního přesvitu (spectral-overlap), kdy ze signálu daného fotonásobiče pro daný fluorochrom odečte procento signálu od druhého detektoru [1].

Fluorochromy jsou látky (barviva), které absorbují světelnou energii o určité vlnové délce (excitace) a následně ji vyzařují v jiné vlnové délce (emise). Některé fluorochromy se na určité buněčné struktury (např. nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, atp.) vážní specificky a zvyšují jejich fluorescenci. Některé fluorochromy se hromadí v určitých buněčných strukturách nebo je možné upravit jejich vlastnosti pomocí charakteristických biochemických reakcí (např. změna pH, membránové polarizace) nebo úpravou enzymatické aktivity [1,6]. Ne všechny buněčné struktury umožňují přímé navázání fluorochromu. V tomto případě je možné použít imunofluorescenci, jejímž principem je kovalentní navázání fluorochromu na specifickou protilátku [9]. Fluorochromy musí splňovat několik podmínek, z těch základních jmenujme alespoň rozpustnost ve vodě, fotostabilitu a nízkou toxicitu [6].

2 VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

průtoková cytometrie poskytuje nepřehledné množství aplikací, které lze uplatnit v různých oblastech jak při výzkumných činnostech, tak při každodenních rutinních analýzách. Průtoková cytometrie umožňuje multiparametrickou analýzu několika buněčných rysů současně, díky čemuž se tato laboratorní technika stává propracovanou metodou s širokým použitím nacházející se ve výzkumu i praxi.

Uplatnění nachází v různých oblastech při zjišťování počtu buněk, třídění buněk, studiu buněčných struktur a antibiotické aktivity, detekci specifických genů, testování citlivosti, měření kumulace sekundárních metabolitů v buňce, rozlišení aktivních a neaktivních buněk uvnitř populací [10]. V současné době se průtoková cytometrie s úspěchem využívá především v lékařství při imunodiagnostice hematologických chorob [1], hodnocení léků, antibiotik a diagnostice patogenních mikroorganismů [11,12]. Uplatnění našla také při výrobě a distribuci potravin, kde je důležité sledovat a kontrolovat čistotu ploch, vyhodnotit účinnost konzervace potravin, posoudit antibakteriální účinky, spočítat a charakterizovat bakteriální endospory [6], stanovit toxicitu chemických látek [13]. V ekologii a botanice našla uplatnění při hodnocení aktivity semiautonomních organel a identifikaci ploidie [3].

2.1 Aplikace v potravinářském průmyslu

Vzhledem k jakosti, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti potravin je velmi důležité sledovat počet, životaschopnost a metabolickou aktivitu různorodých mikroorganismů v surovinách, potravinách i výrobním prostředí. Taktéž z ekonomického hlediska je při výrobě potravin nezbytné, sledovat a kontrolovat zdroje bakteriální kontaminace v různých stupních výrobního procesu. V posledních letech, s nástupem rozvinutější a přesnější laboratorní techniky vstupují do popředí zájmu nové a přesnější metody, jednou z nich je právě průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie byla prokázána jako velmi užitečná metoda analýzy a díky její rychlosti a přesnosti, lze předejít mnoha komplikacím při zpracování surovin na finální produkty a to i přes vysoké pořizovací náklady této techniky. Naprostou výhodou v tomto procesu je časová úspora, jelikož oproti klasické kultivaci, lze získat výsledky v podstatně kratší době, obecně do 60 min., což umožňuje okamžité vyhodnocení mikrobiální kvality potravinářských produktů. Při včasném odhalení nedostatků surovin či finálních výrobků, je možné dosáhnout značných úspor jak finančních tak časových [14,15].

Vedle kontroly mikrobiální čistoty, lze průtokovou cytometrii využít i k přímému sledování růstu bakterií, např. při průmyslové výrobě čistých fermentačních kultur. Typickým příkladem jsou čisté mlékárenské kultury, zahrnující především bacily a grampozitivní koky. Tyto organizmy se podílejí na výrobě zakysaných mléčných výrobků, jako jsou jogurty, smetany, sýry a tekuté mléčné výrobky. V prvé řadě je vyhodnocen počet života schopných bakterií, jejich metabolická aktivita, fyziologie buněk a také možné poškození buněk po tepelném ošetření. Některé populace bakterií, se po kultivaci na pevných médiích mohou projevit jako nekultivovatelné, ale i přesto jsou schopny metabolické aktivity a fermentačních procesů [6]. Nežádoucí kontaminace antibiotiky či bakteriofágy, může negativně ovlivnit probíhající procesy, což se značně projeví na konečném výrobku [16]. V současné době využívá techniku průtokové cytometrie mnoho mlékáren, jelikož sledování kvality a bezpečnosti mléka vyžaduje pečlivou analýzu mikrobiálních a somatických buněk. Sebelepší zvýšené množství mikroorganismů má zásadní vliv na jakost, zdravotní nezávadnost, trvanlivost a technologii výroby jak syrového tak zpracovaného mléka. Bezpečnost je na prvním místě, a proto jsou pečlivě sledovány počty mikroorganismů, detekovány patogeny, kontaminanty a je sledována účinnost tepelného ošetření. Mezi běžné metody patří přímá mikroskopie, bioluminiscence a barvicí postupy. Avšak metody jsou časově náročné, aniž by poskytovaly uspokojivé výsledky. I zde vyniká průtoková cytometrie řadou nesporných výhod [17].

Další studie týkající se využití průtokové cytometrie pro průmyslové procesy se týkaly především výroby piva, vína a kvašeného jablečného moštu. Hlavním cílem bylo optimalizovat fermentační procesy. Z posouzení fyziologického stavu buňky a buněčného cyklu, lze optimalizovat výběr a načasování startovacích kultur tak, aby byly ideálně nastaveny aerobní či anaerobní podmínky a došlo tak k maximální výkonnosti organismů. Jelikož je životnost kultur omezená, je možné touto cestou zabránit pomalému a nepředvídatelnému kvašení zapříčiněné v důsledku nevhodných výživových podmínek. Mezi nejnovější aplikace vztahující se k výrobě alkoholických nápojů patří detekce životaschopných kvasinek a bakterií ve víně, zjištění včasného zastavení alkoholového kvašení, životaschopnost kvasinek v jablečném moštu během kvašení, optimalizace startovacích kultur u jablečno-mléčného kvašení, charakterizace komerčního pivovarského droždí, vliv buněčného cyklu během kvašení na kvalitu piva, hodnocení koncentrace a životaschopnosti kvasinek během

kvašení vína, analýza populace rehydratovaných kvasinek, životaschopnost a vitalita kvasinek během alkoholového kvašení [6], charakterizace zákalů piva aj. [18].

2.2 Lékařské aplikace a farmaceutický průmysl

Medicína patří mezi hlavní objekt lidského zájmu. Neustále přetrvává snaha o vyvíjení nových léků, zlepšování léčebných postupů a zdokonalování vyšetřovacích metod. I v této oblasti je průtoková cytometrie slibným nástrojem, neboť usnadňuje mnohé rutinní analýzy. Mezi nejčastěji vyšetřované biologické materiály patří bioptický vzorek tkáně v nativním stavu, aspirát (vzorek získaný odsátím) kostní dřeně, periferní krev, leukocyty, mozkomíšni mok, výpotky, moč a také výměšky z orgánů a lymfatických tkání. Nejvíce je využívána polychromatická imunofluorescence leukocytů (na buňku je navázána protilátka spolu s fluorescenční molekulou, za účelem identifikace antigenů na povrchu buňky nebo ve nitrobuněčném prostoru) [19]. Avšak v současné době je průtoková cytometrie v klinické praxi dále uplatňována v imunofenotypizaci leukémií a lymfomů, při DNA analýze, při vyšetření leukocytů, pro stanovení intracelulárního vápníku, při diagnostice defektů imunity, při cytometrickém vyšetření solidních nádorů, diagnostice a monitorování autoimunních chorob a v transplantační imunologii [20]. Mimo metody založené na rozpoznávání specifických antigenů protilátkami umožňuje průtoková cytometrie i detekci apoptózy a kinetiky buněčných procesů, asociace a disociace makromolekul či detekci rozpustných látek [19].

Ve farmaceutickém průmyslu nalézá uplatnění při stanovení účinnosti léků a antibiotik na životaschopnost buněk a také při diagnostice a identifikaci klinicky významných druhů [6].

2.3 Využití v biologii a botanice

Přírodní ekosystémy se vyznačují velkou rozmanitostí druhů, a aby bylo možné pochopit procesy, které v přírodě probíhají je nutné tyto prokaryotické a eukaryotické buňky správně identifikovat a kvantifikovat. Vzhledem k tomu jsou kladeny stále větší požadavky na výkonnější a přesnější laboratorní techniku. Metody vyvinuté ke studiu prokaryotických a eukaryotických buněk vyžadují začlenění poznatků z biochemie, genetiky, mikrobiologie a molekulární biologie. I přesto, že se průtoková cytometrie již využívá pro analýzu buněk v přírodních ekosystémech, neustále se vyvíjí nové metody a postupy pro práci s tímto zařízením. To se týká zejména mechanismu buněčného třídění a použití fluorochromů. Vzhledem k tomu, že většina fluorescenčních barviv byla vyvinuta pro živočišné buňky, je nutná

kalibrace v souladu s danými mikroorganismy, neboť může docházet k chybám, které jsou nejčastěji zapříčiněny nespecifickou vazbou fluorescenčního barviva. Kvasinkám, bakteriálním a živočišným buňkám byli věnovány rozsáhlé studie a lze skupinu těchto buněk označit za poměrně hojně probádanou, jinak je tomu u prvoků a virů. Vzhledem k jejich velmi malé velikosti, nízkému obsahu nukleových kyselin a odlišné biologické struktuře jsou průtokovým cytometrem hůře rozpoznávány, ale i přes některá úskalí je nestále vyvíjena snaha ke zdokonalení jejich identifikace [5].

Na pracovišti laboratoře průtokové cytometrie Botanického ústavu AV ČR se zabývají studiem cévnatých rostlin s využitím moderních technik jako je průtoková cytometrie spolu s vícerozměrnou morfometrií, molekulární biologií, atd. Výzkum je zaměřen především na taxonomii a ekologii polyploidních skupin a odhad velikosti genomu. Mezi rostlinné částice, které byly úspěšně použity pro analýzu, patří zejména protoplasty, chromozomy, pyl a izolované organely, jako jsou jádra, mitochondrie a chloroplasty. Mezi obecné aplikace patří analýza DNA, buněčného cyklu, stanovení buněčných zlomků v různých fázích buněčného cyklu, výpočet doby buněčného cyklu, změna činnosti buněčného cyklu, schopnost regenerace, genetická stabilita rostlinných tkání a identifikace ploidie. Tyto informace poskytují důležité zprávy o biochemickém stavu buňky, které mohou být využity pro optimalizaci růstu či řízenou syntézu sekundárních metabolitů. Na základě těchto znalostí mohou být produkty rostlinných kultur využívány v bioprocesech pro komerční účely. Jedná se zejména o vonné a chuťové látky, insekticidy, výroba protilátek a jiných proteinů, výroba umělých semen nebo celých rostlin pro zahradnické a zemědělské účely a látky využívané ve farmaceutickém průmyslu [4].

V laboratoři průtokové cytometrie AV ČR se zaměřují především na studium zakládající na znalosti jaderné DNA, což zahrnuje především odhad ploidie, detekci režimu reprodukce a určení velikosti genomu. Na základě těchto znalostí dokážou identifikovat druhy se stejným počtem chromozomů, detekovat hybridy z homoploidního křížení, identifikovat domnělé rodiče, vzácné cytotypy a heteroploidní hybridy mezi velmi příbuznými taxony, dále provést průzkum struktury obyvatelstva cytotypů a určit reprodukční chování [4,3].

3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY

Společnou vlastností antimikrobiálních látek je, že se vyznačují specifickými vlastnostmi, které nepříznivě působí na mikroorganismy. Podle jejich účinku je rozdělujeme na mikrobistatické, které zastavují rozmnožování mikroorganismů nebo mikrobicidní látky, jež mikroorganismy usmrcují. Bakteriostatické/baktericidní látky působí pouze na bakterie, fungistatické/fungicidní účinkují na kvasinky a plísňe. Účinek antimikrobiálních látek je výrazně ovlivněn jejich koncentrací. Některé látky mají vliv mikrobistaticky v nízkých koncentracích a mikrobicidně ve vyšších koncentracích. Avšak většina látek v nízkých koncentracích urychluje metabolismus mikroorganismů a má tedy stimulační účinek [21].

3.1 Mechanismus působení

Antimikrobiální látky představují rozsáhlou skupinu látek s rozličnou chemickou strukturou, a tudíž je podle jejich mechanismu účinku můžeme rozdělit do následujících kategorií.

3.1.1 Látky poškozující buněčné struktury

Tyto látky nejčastěji poškozují cytoplasmatickou membránu mikroorganismů, popřípadě u bakterií a kvasinek inhibují syntézu buněčné stěny. Podle charakteru jejich zásahu je můžeme rozdělit na látky, které inhibují enzymy biosyntézy, vyvolávají změnu permeability, navazují se na lipidové přenašeče nebo na substráty. Např. betalaktamová antibiotika se naváží ve stěně mikroorganismů na specifické receptory PBP (penicillin binding proteins), inhibují reakce důležité pro funkci peptidoglykanové vrstvy a následně aktivují enzymy, které způsobí lyzi a smrt buňky [22,23,24].

3.1.2 Látky inhibující syntézu bílkovin v ribozomu

Ribozomy jsou ribonukleoproteiny, které se nacházejí ve všech známých buňkách, jejich specifickou funkcí je syntéza proteinů. Ribozomy mají poměrně velkou komplexní strukturu a dělí se na dvě podjednotky, menší (označované u prokaryot 30S; u eukaryot 40S) a větší (u prokaryot 50S; a eukaryot 60S). Antimikrobiální látky jsou schopny se na malou či velkou podjednotku navázat pomocí vazby na receptor a tím znemožnit jejich biologickou funkci [22,23].

3.1.3 Látky inhibující syntézu nukleových kyselin

Inhibice biosyntézy nukleových kyselin může probíhat na několika úrovních. Do první úrovně patří látky inhibující syntézu nukleotidů, což jsou prekurzory nukleových kyselin, popřípadě způsobující jejich vzájemné zaměnění. Druhá úroveň je samotná inhibice tvorby nukleových kyselin. A to vytvořením komplexů prostřednictvím vazby na DNA, čímž se znemožní její matricová funkce a dojde k zastavení dalších navazujících reakcí (replikace, transkripce, translace). Další možností je inaktivace polymerizačních enzymů, např. gyrázy [22,23].

3.1.4 Látky inhibující metabolismus

Biotransformační děje jsou pro život mikrobiální buňky nezbytné, proto jakýkoliv zásah představuje pro buňku zkázu. Nejčastěji jde o látky, které zasahují do citrátového cyklu, dýchacího řetězce nebo do syntézy kyseliny listové. Některé antimikrobiální látky se svojí strukturou velmi podobají primárním metabolitům buňky a mohou tedy působit jako anti-metabolity, např. aminokyselin, purinů, pyrimidinů a vitaminů [21,22].

3.2 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky představují velmi různorodou skupinu látek. Chemické látky používané v potravinářství nesmějí nepříznivě ovlivňovat organoleptické vlastnosti potravin, zdraví konzumentů a zaměstnanců a poškozovat výrobní zařízení [21].

Mezi anorganické sloučeniny patří silné kyseliny a zásady (NaOH, KOH), které mají mikrobicidní účinky. Poškozují buněčnou stěnu i plasmatickou membránu. Jedná se většinou o agresivní látky, a proto se používají velmi zřídka a to především pro desinfekci stěn a zařízení. Do této skupiny lze zařadit hašené vápno, uhličitan sodný, fosforečnan sodný či polyfosfáty. Širší uplatnění má oxid siričitý, který působí jako slabá kyselina a používá se k šíření ovocných a vinných polotovarů, k šíření sudů, sklepů atp. Soli těžkých kovů mají výborné antimikrobiální účinky, ale vzhledem k jejich jedovatosti se nesmějí v potravinářství používat nebo pouze omezeně na desinfekci zařízení. Do této skupiny se řadí organoměďnaté (např. síran měďnatý), organocínité sloučeniny a stříbro. Silná oxidační činidla patří k nejpoužívanějším prostředkům. Chlor slouží pro sterilizaci vody, chlorové vápno k desinfekci podlah a skladovacích prostor, široké využití má i peroxid vodíku a v poslední době se rozšířilo používání oxidu chloričitého. Do skupiny organických sloučenin řadíme

fenolické látky (fenol, kresol, pentachlorfenolát, atp.), které se však v potravinářství uplatňují jen velmi omezeně vzhledem k jejich pronikavému zápachu [21]. Alkoholy neúčinkují na spory bakterií, ale antimikrobiální vlastnosti vykazují k bakteriím, kvasinkám, plísním i některým virům. Účinek je samozřejmě závislý na koncentraci a času expozice, nicméně nejefektivněji působí v koncentraci 60-70% kdy denaturují buněčné bílkoviny [25]. Jako konzervační prostředky s bakteriostatickým účinkem se v potravinářství hojně využívají organické kyseliny, z nichž nejvhodnější je kyselina benzoová, p-hydroxybenzoová, salicylová, mravenčí, propionová, peroctová, perpropionová, vinná, jablečná, octová, fumarová, jantarová atp. Základem mýdel a povrchově aktivních látek jsou sodné soli vyšších mastných kyselin. Ve vyšších koncentracích poškozují plasmatickou membránu. Mezi další organické látky můžeme zařadit enzym lysozym, jenž štěpí bakteriální stěnu a je přirozeně obsažen ve vaječném bílku a některých tělních tekutinách jako jsou sliny, slzy, krevní plazma atp. V současné době se přidává do potravin jako jsou sýry, párky, vařené maso a drůbeží výrobky [26]. Do skupiny organických sloučenin řadíme i antibiotika a chemoterapeutika, jež našly široké uplatnění především v lékařství. Omezené užití těchto látek je povoleno i při konzervaci potravin. V České republice je to nisin, v zahraničí ještě chlorotetracyklin a oxytetracyklin používaný k prodloužení skladovatelnosti syrových kuřat a ryb [21], mlékárenských produktů a některých polotovarů, jako jsou lívance, pizza, produkty z vařených brambor, salátové dresinky, atp [26].

V současné době se pro stanovení citlivosti mikroorganismů in vitro používá několik metod:

- ✓ zředování v bujónu;
- ✓ zředování v agaru;
- ✓ disková difusní metoda na agaru;
- ✓ E-test (epsilonometr test);
- ✓ automatizované metody.

Automatizované metody byly původně vyvinuty pro rychlý a přesný výčet počtu mikroorganismů, ale mohou poskytnout i cenné informace o antimikrobiální citlivosti [26]. Mezi tyto sofistikované metody patří i průtoková cytometrie.

4 STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

Studium antimikrobiální citlivosti pomocí průtokové cytometrie bylo použito již na začátku roku 1980, nicméně použití této techniky nebylo tak běžné jako v dnešní době. V roce 1990 bylo dosaženo významných pokroků a počet vědeckých článků zaměřených na antimikrobiální účinky bakterií (včetně mykobakterií), hub, virů i parazitů se výrazně zvýšil. Postup analýzy byl časově náročný s použitím neefektivních barviv a drahých analyzátorů. Bakterie byly vystaveny účinkům antibiotik a následně byl studován poměr živých a mrtvých buněk, intenzita fluorescence, obsah DNA/RNA a morfologie buněk. Většina takto provedených studií umožňovala prokázat antibiotické účinky na bakteriální buňky již v průběhu 1-2 hodin po působení léčiv. Nicméně používané postupy byly příliš nepraktické k tomu, aby mohly být používány v každodenní praxi [27].

Během uplynulého desetiletí se postupy analýzy značně zlepšily a dnes tato technika přispěla k revoluční změně v mikrobiologických laboratořích. Výsledky jsou k dispozici ve velmi krátké době a citlivost mikroorganismů vůči antibakteriálním látkám je možné posoudit na základě jejich životaschopnosti, ještě před jejich identifikací, což by v budoucnu mohlo najít uplatnění při léčení infekcí [28]. Užitečné informace je možné získat při testování účinnosti nových léků v kombinaci s jejich případnou toxicitou [13]. Obrovský přínos nabízí průtoková cytometrie při detekci smíšených populací, které mohou reagovat různými způsoby na účinky antimikrobiální látky. Především v klinické mikrobiologii hraje rychlost a přesnost důležitou roli [28], neboť cílená antibiotická léčba snižuje riziko antimikrobiální rezistence, umožňuje snížení nákladů a taktéž větší efektivnost léčby. Průměrný čas potřebný k dosažení výsledků se u běžných automatizovaných metod pohybuje okolo 9 hodin, kdežto u průtokové cytometrie je možné obdržet výsledky již v době okolo 90 min (Tab. 1). Díky tomu je možné analyzovat v relativně krátkém čase větší počet vzorků [27]. Průtoková cytometrie taktéž umožňuje u bakterií a kvasinek studium genové exprese za pomoci zeleně fluoreskujících bílkovin, díky čemuž se studium značně zjednodušilo [27].

Tab. 1 – Čas potřebný ke stanovení minimální inhibiční koncentrace [27, upraveno]

Testovaná bakterie	Antimikrobiální látka	Automatizovaná metoda (h:min)	Průtoková cytometrie (h:min)
<i>E. coli</i>	amoxicillin	7:50	1:30
<i>E.coli</i>	gentamicin	9:50	1:30
<i>P. aeruginosa</i>	piperacillin	13:50	2:00
<i>P. aeruginosa</i>	gentamicin	12:00	2:00
<i>S. aureus</i>	gentamicin	8:25	2:00

4.1 Používaná fluorescenční barviva

Pro posouzení životaschopnosti nebo stupně poškození jak prokaryotické tak eukaryotické buňky se využívají četné fluorescenční barviva, neboť jsou schopny poukázat na změny ve fyziologii (membránový potenciál, velikost buňky, množství DNA) nebo metabolismu buňky účinkem antimikrobiálních látek. Působení fluorescenčních barviv spolu s technikou průtokové cytometrie je neustále zkoumáno a vyvíjeno. Přesto již nyní jsou tyto nástroje velmi účinným pomocníkem při posouzení citlivosti a účinků na mikroorganismy [29].

Ačkoliv buňky různých druhů mohou vykazovat různou propustnost, všeobecně v platnosti je, že živá nepoškozená buňka se vyznačuje selektivně propustnou buněčnou membránou, která je nepropustná pro polární (ve vodě rozpustné) látky. Pokud však dojde k porušení membrány (mechanickými, fyzikálními či chemickými vlivy) stává se propustnou a to i pro barviva, které jsou schopny proniknout porušenou buněčnou membránou a navázat se na nukleové kyseliny za vzniku fluorescence [29,30].

Mezi běžná barviva vážící se na nukleové kyseliny patří následující:

Propidium jodid (PI) je nejčastěji používané barvivo. Řadí se mezi interkalační činidla s molekulovou hmotností 668,4 g/mol. Používá se při hodnocení životaschopnosti buněk pomocí průtokové cytometrie nebo ke stanovení obsahu DNA při analýze buněčného cyklu. Barviva TO-PRO-1 (molekulová hmotnost 645 g/mol) a TO-PRO-3 se řadí mezi monomerní karboxykyanové barviva využívané při analýze průtokovou cytometrií a fluorescenčními mikroskopy. SYTOX Green s molekulovou hmotností 600 g/mol vykazuje jasně zelenou fluorescenci pro proniknutí do buněk s oslabenou membránou. Je vhodným

ukazatelem mrtvých buněk při analýze fluorescenčními mikroskopy, fluorimetry a techniku průtokové cytometrie. Jeho výhodou je, že po navázání na nukleové kyseliny je jeho fluorescence až 100 krát větší v porovnání se standardním propidium jodidem [29,30,31]. Akridinová oranž umožňuje posoudit množství NK v přítomnosti antimikrobiálních látek, neboť po navázání na DNA se barví zeleně a RNA tmavě červeně [28].

Bakteriální buňky reagují na různé antimikrobiální látky snížením nebo zvýšením membránového potenciálu. V případě buněčné smrti nebo poškození membrány dojde k jeho selhání. Tohoto jevu využívá další skupina barviv, neboť se hromadí uvnitř nepoškozené buňky a vykazují fluorescenci. V momentě kdy dojde k porušení buňky je barvivo uvolňováno a pokles fluorescence je vyhodnocen průtokovou cytometrií. Mezi tato barviva se řadí například Rodamin 123, kationtové lipofilní barvivo, používané pouze pro grampozitivní bakterie, neboť gramnegativní jej špatně přijímají. Oxonol je aniontové lipofilní barvivo, s úspěchem používaný při hodnocení citlivosti na antimikrobiální látky jak u grampozitivních tak u gram-negativních bakterií. Výhodou tohoto barviva je, že může být přidáno přímo na tekuté kultury bez jakékoliv předchozí úpravy, které by mohli způsobit odchylky a zasahovat tak do účinku antibakteriální látky. Fluorescein diacetát je nepolární látka, která snadno prochází přes plasmatickou membránu. Tato látka je po proniknutí do buňky metabolizována na derivát (fluorescein) pro který je už membrána nepropustná a dochází tedy k hromadění uvnitř buňky. Přítomnost a množství fluoresceinu je měřeno pomocí fluorescence [28,32].

Metody použití výše uvedených barviv jsou standardizované především pro bakterie. Teprve v posledním desetiletí vzrostl zájem o antimykotika a rezistence proti těmto antimikrobiálním látkám [28]. Několik studií ukázalo, že je možné průtokovou cytometrii využít k testování antimykotické citlivosti, ale i přesto navržené postupy zůstávají sporné [33].

Taktéž je důležité věnovat pozornost výběru barviva, neboť v určitých protokolech souvisí vlastnosti jejich excitace a emise s mechanismem působení antimikrobiálních látek. Několik příkladů výběru barviva, studia antimikrobiálních účinků a testování citlivosti mikroorganismů jsou uvedeny v následující tabulce [28].

Tab. 2 – Antibakteriální účinky a testování citlivosti průtokovou cytometrií [28, upraveno]

Antimikrobiální látka	Mikroorganismus	Čas výsledku (h)	Barvivo	Studovaný parametr
Ampicillin	<i>E. coli</i>	1-3	PI	morfologie, účinky na membránu
Ampicillin	<i>E. coli</i>	0,5	Oxonol	rozptyl světla
Ampicillin	<i>K. pneumoniae</i>	1	Ethidium bromide + mithramycin	obsah DNA, morfologie, rozptyl světla
Benzylpenicillin	<i>S. aureus</i>	2-4	Oxonol	účinky na membránu
Cefamandole	<i>E. coli</i>	< 0,5	Ethidium bromide	rozptyl světla, obsah DNA
Chloramfenicol	<i>E. coli</i>	< 2	Mithramycin	obsah DNA
Ciprofloxacin	<i>E. coli</i>	1 - 3	PI	rozptyl světla, morfologie, účinky na membránu
Ciprofloxacin	<i>Mycobacterium spp.</i>	6-24	Fluorescein diacetát	stav metabolismu, živé buňky
Gentamicin	<i>E. coli</i>	1 - 3	PI	morfologie
Gentamicin	<i>E. coli</i>	0,5 - 1	Ethidium bromide + mithramycin	obsah DNA
Gentamicin	<i>E. coli</i>	0,5	Oxonol	účinky na membránu
Gentamicin	<i>E. coli</i>	1	Akridinová oranž	zabarvení nukleových kyselin

4.2 Faktory ovlivňující testování citlivosti mikroorganismů

I přesto, že činitelé ovlivňující výsledky analýzy jsou prostudovány v souvislosti s bakteriemi, mohou být podobné úvahy použity i pro jiné organismy jakou jsou např. houby nebo paraziti. Je důležité poznamenat několik faktorů, které mohou ovlivnit testování a vést tak k zavádějícím závěrům:

- ✓ samotný organismus může ovlivnit testování citlivosti, neboť různé druhy bakterií, občas i různé kmeny vykazují různou schopnost přijmout membránovým potenciálem barvivo, navíc vylepšené vylučovací mechanismy vedoucí k vypuzení a snížení množství přijatého barviva se může taktéž negativně projevit při fluorescenci;
- ✓ příprava vzorku před analýzou;
- ✓ použití povrchově aktivních látek;
- ✓ koncentrace antimikrobiální látky;
- ✓ fáze bakteriálního růstu [28];
- ✓ množství a dostupnost vazebných míst;
- ✓ konformační stav nukleových kyselin;
- ✓ mechanismus účinku antimikrobiální látky;
- ✓ lepší vaznost fluorochromu na dvouřetězcové nukleové kyseliny v porovnání s jednořetězcovými nukleovými kyselinami nebo RNA;
- ✓ uvolnění nukleové kyseliny z poškozené buňky s následným poklesem počtu vazebných míst [29].

I přes možné drobné nepřesnosti je vyhodnocení technikou průtokové cytometrie v porovnání s klasickou metodou mnohem citlivější, což je zapříčiněno především tím, že u některých kultur (např. *Mycoplasma hyopneumoniae*) je vyhodnocení závislé na viditelné změně barvy média nebo vytvoření zákalu, které však v průběhu inkubační doby nebylo dostatečné nebo rostoucí bakterie jsou obtížně vidět. V porovnání s klasickou kultivací je značná i časová úspora. Při analýze pomocí průtokové cytometrie je možné obdržet u některých vzorků výsledky v době okolo 90 minut, zatímco u klasické kultivace je to několikanásobně delší doba, obvykle v rozmezí 48-72 hodin. Rychlost diagnózy představuje nespornou výhodu především u klinických vzorků, neboť právě v této oblasti hraje čas důležitou roli a

běžně dostupné metody jsou náročné, zdlouhavé a některé vyžadují vyškolený personál [12].

Co se týče vyhodnocení antimikrobiálních účinků, některé studie ukazují, že mechanismus působení některých látek, může být složitější, než je běžně vnímán. Čehož může být hojně využito ve farmakologii při vývoji nových antibakteriálních látek a léků a taktéž při stanovení minimální inhibiční koncentrace, která je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu. Tyto cenné informace nám mohou pomoci při identifikaci odolných a rezistentních subpopulací v téměř reálném čase [11,34].

4.3 Detekce mikroorganismů

4.3.1 Bakterie

Nejjednodušší a nejrychlejší způsob detekce bakterií je v současné době pomocí protilátek. Jejich specifická a možnost označení protilátek fluorochromy na konkrétní antigeny představují jeden z neúčinnějších nástrojů pro identifikaci. Metoda je jednoduchá a rychlá a to i pro buňky, které jsou nekultivovatelné v důsledku poškození [28]. Protilátky použité pro analýzu musejí být druhově specifické a cílový antigen by měl být ve velkém množství, aby protilátky byly dostatečně zářivé [35].

Jedinou nevýhodou je, že protilátky zaměřené na konkrétní mikroby jsou omezeně dostupné. Technika průtokové cytometrie ve spojení s fluorescenčními protilátkami byla s úspěchem použita k detekci mnoha bakterií (např. *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Brucella*, *Mycoplasma fermentans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacteroides fragilis*). Tyto příklady ukazují na citlivost a specifickou při použití protilátek, které umožňují i detekci jednotlivých typů buněk v různorodé populaci [28].

Další možnost přímé diagnózy je pomocí fluorescenční detekce oligonukleotidů pomocí speciálních barviv (např. DAPI – 4,6-diamino-2-fenylindolu) cíleně zaměřených na barvení nukleových kyselin. Nicméně vzhledem k složitému postupu se tato metoda pro běžné analýzy nepoužívá. Jinak tomu může být v budoucnu, neboť tato metoda umožňuje specifickou identifikaci potencionálních patogenů [28].

Další možností analýzy je sledování růstu kolonií buď v přítomnosti či nepřítomnosti antimikrobiální látky na základě vyhodnocení intenzity zabarvení. Při této metodě je využíváno žluté fluorescenční barvivo auramin. Ke studiu byly použity mikroorganismy *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium smegmatis*. Prokázání inhibice růstu bylo možné po 1–3 dnech. Touto metodou se podařilo detekovat i přítomnost rezistentních subpopulací [36].

Průtoková cytometrie se taktéž osvědčila při studiu fyziologických účinků antimikrobiálních látek na bakteriální buňky v důsledku jejich vlivu na některé metabolické funkce. Mimo to, je taktéž šikovným nástrojem pro testování citlivosti bakterií a stanovení baktericidních nebo bakteriostatických účinků. Účinek antimikrobiální látky může být zjištěn na základě měření rozptylu světla a obsahu DNA za použití fluorescenční sondy, nebo také dle změny tvaru buňky. Rozptyl světla je užitečným ukazatelem antimikrobiálních účinků, bez ohledu na jejich mechanismus účinku. Tento předpoklad byl potvrzen u dvou různých antibiotik (ceftazidim, který poškozuje plasmatickou membránu a ciprofloxacin, který inaktivuje polymerační enzym gyrázu). Při analýze byla použita fluorescenční detekce i rozptyl světla a testování bylo provedeno přímo na klinických vzorcích [28].

Stanovení minimální inhibiční koncentrace je běžně prováděno v klinických laboratořích. Stanovení minimální baktericidní koncentrace, která uvádí koncentraci, jež bakterie usmrtí, se určuje už jen zřídka, podobně taktéž postantibiotické a subinhibiční účinky. Tradiční analýzy postantibiotického efektu jsou založeny na počtu bakterií a jen několik dalších autorů zkoumalo možnost využít dalších postupů, v poslední několika letech například průtokové cytometrie. Tato technika má tu výhodu, že umožňuje studovat různorodost bakteriální populace a konkrétní metabolické děje, které v postantibiotickém období probíhají. Gottfredsson a kol. ve své práci sledovali v populaci *E. coli* velikost mikroorganismů a obsah nukleových kyselin během působení antimikrobiálních látek a taktéž v průběhu postantibiotického období. Alikvotní množství bakteriálních populací byly v pravidelných časových intervalech během a po expozici účinných látek obarveny propidium jodidem. Bylo zjištěno, že betalaktamová antibiotika a ciprofloxacin způsobil, že se v populaci vyskytovaly zvětšené buňky se zvýšeným obsahem nukleových kyselin, zatímco rifampicin vyvolal snížení velikosti buněk a nukleových kyselin. Zatímco u klasické metody je možné zjistit pouze velmi malé změny v počtu KTJ (kolonie tvořící jednotku), u průtokové cytometrie máme k dispozici informace o membránovém potenciálu a metabolické aktivitě [28].

4.3.2 Kvasinky

Pokud jde o kvasinky, ukázalo se, že průtoková cytometrie spolu se specifickými protilátkami představuje velmi spolehlivou metodu, která je pravděpodobně efektivnější než některé dostupné metody. Již v roce 1988 byla zveřejněna práce týkající se procesu stanovení sérotypu *Candida albicans* [28]. Nicméně až roku 1996 byla sérotypizace ověřena pomocí specifického antiséra průtokovou cytometrií. Podle autorů studie zaměřené na sérotypizaci *Candida albicans* pomocí průtokové cytometrie je nejpozoruhodnějším znakem metody její spolehlivost. V jejich studii průtoková cytometrie umožnila detekovat přítomnost dvou různých kmenů a to v kultuře u které se předpokládalo, že je homogenní a dále sérotypizovat čtyři kmeny jejichž sérotypy nelze určit imunofluorescencí [37]. Bylo tedy opět potvrzeno, že průtoková cytometrie poskytuje spolehlivější výsledky než běžně dostupný komerční test pro určení sérotypu pro *Candida*. Průtoková cytometrie by mohla pomoci při rozlišení kmenů *Candida*, které způsobují opakované infekční onemocnění pacientů a problémem představují i smíšené infekce (způsobené několika mikroorganismy). Na základě vyšetření protilátek by bylo možné učinit léčbu infekcí rychlejší a efektivnější [28].

Zájem o antimykotika a vznik rezistence proti těmto antimikrobiálním látkám se v posledních několika letech zdvojnásobil. Vzhledem ke zvyšujícímu se počtu lidí se sníženou imunitou se invazivní mykotické infekce často stávají hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti. Nicméně laboratorní testy na citlivost kvasinek vůči antimykotickým látkám jsou prováděny v mnohem menší míře než je tomu u antibakteriálních látek. Klasické metody pro testování citlivosti kvasinek jsou pracné a často vyžadují dlouhou inkubaci (obvykle 48–72 hod) [28].

Průtoková cytometrie je tedy možnou volbou ke studiu antimykotických účinků, neboť dokáže snadno rozlišit kvasinky ošetřené antimykotiky od těch, které byly běžně kultivovány a použity jako kontrolní vzorek. Výsledky takto provedeného testu byly k dispozici během 24 hodin. V další studii při posouzení citlivosti (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Pichia kudriavzevii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Cryptococcus neoformans*) byl použit propidium jodid spolu s bengálskou červení. Čas potřebný pro analýzu se snížil z původních 24–48 hodin na pouhých 9 hodin. Při použití různých fluorochromů se mohou objevit mírné rozdíly v detekčních časech, neboť reakční doba závisí na parametru měřené fluorochromem [28].

4.3.3 Viry

Průtoková cytometrie byla pro studium interakcí mezi buňkami a viry používána již dříve, ale hlouběji bylo toto téma prozkoumáno a popsáno až v roce 1994. Pomocí průtokové cytometrie byla studována exprese buněčných proteinů v důsledku virové infekce pro cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV), adenovirus, virus hepatitidy B (HBV) a viru lidské imunodeficiency. Pomocí průtokové cytometrie byla také sledována odchylka buněčného cyklu a replikace DNA ve virem infikovaných buňkách pro papillomavirus, CMV a lidský HIV-1. Tato technika se rovněž používá pro studium vlivu virové infekce na intracelulární úrovni a umožnila názornou ukázkou apoptózy spojené s virovou infekcí. Mimo to, byly popsány viry jako adenovirus, virus chřipky, opičí virus, virus splaněček, hovězí herpesvirus, papillomavirus a HIV-1 (po označení fluorescein isothiocyanátem) i s jejich předpokládanými buněčnými receptory [28].

Průtoková cytometrie umožňuje detekci a kvantifikaci infikovaných buněk buď přímo v klinických vzorcích, nebo po inokulaci virové kultury v buněčné kultuře. Detekce a kvantifikace virových antigenů nebo jejich nukleových kyselin je možná pomocí protilátky, která specificky rozpozná povrchové nebo vnitrobuněčné antigeny v kombinaci s přímou nebo nepřímou fluorescencí. Mezi dvě hlavní a nesporné výhody při použití této techniky pro studium virové infekce patří: schopnost analyzovat několik parametrů jedné infikované buňky ve stejnou dobu a schopnost infikované buňky kvantifikovat. Z tohoto důvodu je průtoková cytometrie mocný nástroj pro charakterizaci mechanismu virové patogeneze [28].

Přesto, že testování antivirové citlivosti *in vitro* není v klinických mikrobiologických laboratořích zcela běžné, je vývoj rychlých a přesných testů pro monitorování nových antivirových látek a testování antivirové citlivosti nezbytné. Vznik antivirové rezistence zvyšuje potřebu rychlých automatizovaných a cílených testů. Konvenční metody jsou pracné a časově náročné. Pomocí techniky průtokové cytometrie je možné kvantifikovat virové antigeny, nukleové kyseliny nebo jakékoliv virové parametry, které se vztahují k virovým infekcím. Průtoková cytometrie rovněž umožňuje rychlé vyšetření a posouzení nových antivirových látek a jejich mechanismu účinku [28].

Rychlá a snadná metoda screeningu pomocí průtokové cytometrie při analýze působení několika antivirových látek proti HSV je založena na změně vyvolané v buněčné DNA. Při

analýze je měřen obsah DNA pomocí propidium jodidu, čím nižší je antivirová účinnost tím větší je množství DNA a tím i intenzivnější fluorescence propidium jodidu [28].

Při hodnocení antivirových látek in vitro byl s úspěchem použit i vir CMV, který při infekci poškozuje cytoplasmatickou membránu a dochází k uvolnění cytoplasmatické cholinesterázy, která je měřena pomocí fluoresceoin diacetátu. Rozdíl ve fluorescenci umožňuje rozlišit mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami a vyhodnotit tak účinnost látky [28].

Průtoková cytometrie umožňuje i kvantifikovat inhibici exprese virového antigenu v lidských buňkách infikovaných virem HIV-1. Antivirová aktivita proti tomuto viru byla průtokovou cytometrií sledována u několika látek a získané údaje byly srovnatelné s výsledky získanými tradiční metodou [28].

ZÁVĚR

Vzhledem ke zvyšujícímu se uplatnění průtokové cytometrie v praxi se tato metoda stává pro uživatele stále dostupnější. I přes poměrně vysokou pořizovací cenu, náklady na pořízení a provoz postupně klesají. V posledních několika letech došlo ke zdokonalení softwarových i laserových technologií a i metodické postupy se neustále vylepšují. Široké praktické využití vyplývá z jednoduchosti, spolehlivosti a rychlosti metody. Nespornou výhodou je univerzálnost metody, neboť stejný přístroj může být použit pro přímou diagnostiku, testování antimikrobiální citlivosti i k identifikaci mikroorganismů. Dnešní průtokové cytometry umožňují analýzu několika vnitřních i vnějších buněčných parametrů současně, čímž se stává vhodnou technikou pro studium heterogenních populací.

Antimikrobiální látky mohou mít rozdílné přímé i nepřímé účinky na jednotlivé mikroorganismy. Pro dokonalejší pochopení mechanismu působení těchto látek je důležité sledovat změny v morfologii i metabolismu buňky, což průtoková cytometrie umožňuje. Zpracování vzorků obvykle trvá podstatně kratší dobu než u klasických metod a proto představuje účinný nástroj pro hodnocení mikrobiální citlivosti a taktéž může pomoci při objevování nových antimikrobiálních látek. Široký potenciál nabízí především v lékařství, neboť při včasné detekci průvodce onemocnění bude pohotově zahájena úspěšná léčba a sníží se riziko vzniku rezistentních subpopulací.

Důležité je poznamenat, že k dosažení korektních výsledků je nutná pravidelná kalibrace, údržba i správné nastavení přístroje. Pozornost je nutné věnovat i vhodnému výběru barviva a koncentraci vzorku. A i přesto, že nevhodnější metodiky jsou nepřetržitě optimalizovány, vývoj moderních, kompaktních a cenově dostupných průtokových cytometrů zaměřených na jednotlivé obory neustále pokračuje.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MARINOV, Iuri. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2., přeprac. a rozš. vyd. ISBN 978-80-7387-143-7.
- [2] Průtoková cytometrie. *Datový standard MZ ČR* [online]. 2006 [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJDJU_soubory/image003.jpg
- [3] YANPAISAN, Wandee. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. *Biotechnology Advances*. 1999, č. 17, s. 3-27.
- [4] Laboratory of Flow Cytometry. *Laboratory of Flow Cytometry* [online]. 2006 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <http://www.ibot.cas.cz/fcm/>
- [5] VIVES-REGO, J., P. LEBARON a G. NEBE-VON CARON. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, vol. 24, issue 4, s. 429-448. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00549.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00549.x>
- [6] DIAZ, Mario, Monica HERRERO, Luis A. GARCIA a Covadonga QUIROS. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2010, roč. 48, č. 3, s. 385-407. ISSN 1369703x. DOI: 10.1016/j.bej.2009.07.013.
- [7] HOFFMAN, Robert A. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. DOI: 10.1002/0471142956.cy0103s32. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy0103s32>
- [8] Luminiscence. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-02-08]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Luminiscence>
- [9] Imunofluorescence. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Imunofluorescence>

- [10] Microbiology nad Flow Cytometry. *Purdue University Cytometry Laboratories* [online]. 2013 [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/micrflow/index.htm>
- [11] ASSUNÇÃO, P., R.S. ROSALES, C. DE LA FE, H.M. DAVEY. Application of flow cytometry for the determination of minimal inhibitory concentration of several antibacterial agents on *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, roč. 102, č. 4, s. 1132-1137. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03170.x. Dostupné z: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.2006.03170.x>
- [12] FARIA-RAMOS, I., S. COSTA-DE-OLIVEIRA, J. BARBOSA, A. CARDOSO, J. SANTOS-ANTUNES, A. G. RODRIGUES a C. PINA-VAZ. Detection of *Legionella pneumophila* on clinical samples and susceptibility assessment by flow cytometry. *European Journal of Clinical Microbiology*. roč. 31, č. 12, s. 3351-3357. ISSN 0934-9723. DOI: 10.1007/s10096-012-1702-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1702-y>
- [13] SHUBAR, H. M., J. P. MAYER, W. HOPFENMULLER a O. LIESENFELD. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, roč. 61, č. 5, s. 1110-1119. ISSN 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkn047
- [14] BROGER, Tobias, Res P. ODERMATT, Pascal HUBER a Bernhard SONNLEITNER. Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring. *Journal of Biotechnology*. 2011, roč. 154, č. 4, s. 240-247. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.05.003
- [15] JUZWA, Wojciech. Flow cytometric analysis of microbial contamination in food industry technological lines - initial study. *Acta Scientiarum Polonorum*. 2012, č. 11, s. 111-119.
- [16] LAPLACE-BUILHÉ, C. Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Bio Cell*. 1993, č. 78, s. 123-128
- [17] GUNASEKERA, T. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *Inter-*

- national Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 85, issue 3, s. 269-279. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00546-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502005469>
- [18] DOSTÁLEK, Pavel. Využití průtokové fluorescenční cytometrie pro charakterizaci zákal piva. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha ve spolupř. se Sahm, s. r. o, 2003, roč. 49, č. 4. ISSN 0023-5830.
- [19] ŠINKOROVÁ, Zuzana. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. ČÁST. *VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY*. 2008, č. 3.
- [20] Nemocnice s poliklinikou Havířov. *Ke stažení* [online]. 2008 [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://www.nsphav.cz/pro-pacienty-a-navstevniky/oddeleni/oddeleni-klinicke-hematologie1/ke-stazeni.html?hledat=pr%C5%AFtokov%C3%A1%20cytometrie>
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [22] *Chémia a biológia antibiotík*. Vyd. 1. Bratislava: VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 1981, 483 s.
- [23] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 379 s. ISBN 978-802-4713-564.
- [24] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, xxiv, 672 s. ISBN 978-807-2623-730.
- [25] PAULSON, Daryl S. *Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker, c2003, x, 452 p. ISBN 08-247-0788-5.
- [26] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 978-082-4740-375.
- [27] BROEREN, M. A. C., Y. MAAS, E. RETERA a N. L. A. ARENTS. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013, vol. 19, issue 3, s. 286-291. DOI:

- 10.1111/j.1469-0691.2012.03800.x. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-0691.2012.03800.x>
- [28]ÁLVAREZ-BARRIENTOS, Alberto. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, č. 13, s. 167-195. DOI: 10.1128/CMR.13.2.167-195.2000.
- [29]MORTIMER, F. C., Flow Cytometric Monitoring of Antibiotic-Induced Injury in *Escherichia coli* Using Cell-Impermeant Fluorescent Probes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington: American Society for Microbiology, 2000, č. 44, s. 676-681.
- [30]NOVO, D. J., Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Antibiotic Effects on Membrane Potential, Membrane Permeability, and Bacterial Counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, č. 44, s. 827-834.
- [31]Nucleic Acid Cell Stains. *Life Technologies Corporation* [online]. 2013 [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com>
- [32]XU, J., F. ZHOU, B.-P. JI, R.-S. PEI a N. XU. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, vol. 47, issue 3, s. 174-179. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
- [33]SCHELL, Ronald F., Dean T. NARDELLI, David J. DECOSTER, Scott M. KIRK a Steven M. CALLISTER. *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility Testing by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001, 11.7. DOI: 10.1002/0471142956.cy1107s27. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy1107s27>
- [34]XU, J., F. ZHOU, B.-P. JI, R.-S. PEI a N. XU. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, roč. 47, č. 3, s. 174-179. ISSN 02668254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>

- [35] KIM, Mi-Jeong. Improved Antibiotic Susceptibility Test of *Orientia tsutsugamushi* by Flow Cytometry Using Monoclonal Antibody. *Journal of Korean Medical Science*. 2007, č. 22, s. 1-6.
- [36] COLLEEN, Ryan. Rapid Assay for Mycobacterial Growth and Antibiotic Susceptibility Using Gel Microdrop Encapsulation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, roč. 7, č. 33, s. 1720-1726.
- [37] MERCURE, Stéphane. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996, roč. 34, č. 9, s. 2106-2112.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA deoxyribonukleová kyselina

RNA ribonukleová kyselina

CMV cytomegalovirus

HSV herpessimplex virus

HBV virus hepatitidy B

HIV virus lidské imunodeficiency

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 – Schéma průtokového cytometru systém [2]</i>	11
---	----

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 – Čas potřebný ke stanovení minimální inhibiční koncentrace [27, upraveno]</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2 – Antibakteriální účinky a testování citlivosti průtokovou cytometrií [28, upraveno]</i>	<i>27</i>