

Svoluji k zapůjčení své rigorózní práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Hana Kotková

Posouzení vhodnosti TD testu pro stanovení perzistence či tolerance u
klinických izolátů *Staphylococcus aureus*

Evaluation of TD test for analysis of persistence or tolerance in clinical isolates
of *Staphylococcus aureus*

Rigorózní práce

Školitel: **RNDr. Irena Lichá, CSc.**

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 30.6.2020

.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především paní RNDr. Ireně Liché, CSc za předané rady a dovednosti při provádění pokusů, ale také za ochotu a spolupráci při sepisování této práce. Děkuji rovněž své rodině za podporu.

OBSAH

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam zkratek

1	ÚVOD.....	1
1.1	Perzistence	1
1.1.1	Navození perzistentního stavu	1
1.1.2	Resuscitace perzisterů a výběr mezi životními strategiemi	3
1.2	Klinický význam a metody studia perzistence	4
2	SHRNUTÍ A DISKUSE VÝSLEDKŮ.....	6
3	ZÁVĚR	11
4	LITERÁRNÍ ZDROJE.....	12
5	PUBLIKACE.....	15

ABSTRAKT

Perzistence představuje schopnost bakterií přežít působení antibiotik, i když bakterie nekódují geny rezistence. Jedná se o velice komplexní proces, který je pravděpodobně důsledkem omezení fyziologických dějů u dané subpopulace bakterií. Cílem této práce bylo ověřit vhodnost nově vyvinutého testu „Tolerance Disk test“ (TD testu, Gefen et al. 2017) k detekci perzistentní nebo tolerantní subpopulace bakteriálních buněk u klinických izolátů *Staphylococcus aureus*. TD test jsme provedli u tohoto druhu bakterie, která je významným podmíněně patogenním organismem člověka, a jeho výsledky jsme porovnali s výsledky křivek hynutí. Zjistili jsme, že i v tomto případě lze semikvantitativně sledovat schopnost perzistovat a tento test tedy považujeme za vhodný pro zavedení do klinické praxe. Kromě toho navrhuje, že by TD test mohl umožnit rozlišení perzistentní a tolerantní subpopulace.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, perzistence, antibiotika, tolerance

ABSTRACT

Persistence is the ability of bacteria to survive the impact of antibiotics even when the bacteria do not encode resistance genes. This is a very complex process, which is probably consequence of a reduction physiological process in subpopulation of bacteria. The aim of this study was to verify the suitability of the newly developed “Tolerance Disk Test” (TD test, Gefen et al. 2017) for detection of persistent or tolerant subpopulations of bacterial cells in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. We performed TD test for this kind of bacteria, which is a significant opportunistic pathogenic organism in humans, and compared its results with the killing curves. We have found that the ability to persist can be monitored semi-quantitatively also in this case and we consider this test suitable for introduction into clinical practice. In addition, we suggest that TD test could distinguish between persistent and tolerant subpopulations.

Key words: *Staphylococcus aureus*, persistence, antibiotics, tolerance

SEZNAM ZKRATEK

Agr systém	System účastníci se regulace exprese genů virulence (Accessory gene regulator)
ATB	Antibiotika
BHI agar	Brain Heart Infusion agar
SigB	Alternativní sigma faktor B
TA systém	Toxin-antitoxin systém
TD test	Tolerance-disk test

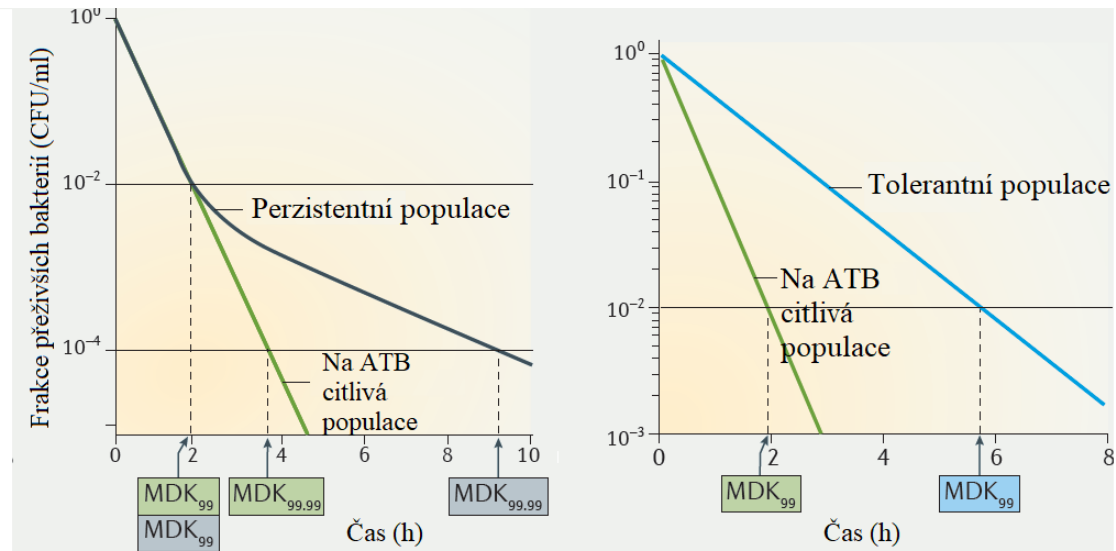
1 ÚVOD

1.1 Perzistence

Pojem perzistence označuje schopnost bakterií přežít působení antibiotik, přičemž tato schopnost není kódována v genetické informaci bakterie a nemůže být tudíž děděna z buňky na buňku. Perzisteri se dostávají do fyziologického stavu, který jim umožní přežít působení antibiotik, aniž by tato schopnost mohla být přenášena v rámci populace. Většina vědců se shoduje na tom, že jde o stav dormance, kdy bakterie tlumí některé fyziologické procesy, na které antibiotika cílí (Keren et al. 2004; Kwan et al. 2013). Existuje však i názor, že stav perzistence je proces aktivní, protože bakterie aktivně pumpuje antibiotika ven z buňky a tím se brání jejich účinku (Pu et al. 2016). Pojem perzistence může být chápán ještě v užším smyslu a to takovém, že bakterie přežívá antibiotickou léčbu skryta v hostitelské buňce, která ji chrání přímému vystavení antibiotiku (Fisher et al. 2017). Někdy jsou v literárních pramenech pojmy perzistence ne zcela přesně používány, což svědčí o tom, že i přesto, že je tento fenomén dlouho znám, poznání není dostatečné a vědecká komunita je v mnoha otázkách nejednotná.

1.1.1 Navození perzistentního stavu

Pokud je bakteriální populace vystavena antibiotikům, k nimž je citlivá, dojde na populační úrovni k rychlému úbytku počtu buněk. Subpopulaci buněk, která tento nepříznivý zásah léčby přežije, označujeme jako perzistery a průběh vzniku perzisterů charakterizuje tzv. bifázická křivka hynutí (Balaban et al. 2004). Dle jejího průběhu lze kvantifikovat kolik perzisterů se v dané populaci tvoří. Tolerantní bakterie se od perzisterů liší minimální dobou zabití 99 % buněk z celkového počtu původní populace (MDK_{99}), jak je ukázáno na obrázku číslo 1. U tolerantních bakterií je tato doba delší než u perzisterů (Brauner et al. 2016).



Obrázek č. 1: Průběhy křivek hynutí charakteristické pro perzistery, tolerantní bakterie a populaci bakterií na ATB citlivou (podle Brauner et al. 2016)

Ve starších pramenech literatury byla perzistence chápána jako děj stochastický, který nastává bez ohledu na vnitřní a vnější podmínky kvůli variabilitě v genové expresi (Balaban et al. 2004, Maisonneuve et al. 2013). V současnosti je přijímán spíše názor, že perzistence je navozena souhrou stochastických i deterministických (tzn. nenáhodných) faktorů (Michiels et al. 2016). Mezi tyto nenáhodné faktory patří především působení stresů, po jejichž působení se frakce perzisterů zvyšuje. Vyšší schopnost perzistovat byla prokázána po hladovění a po vystavení oxidativnímu, tepelnému a osmotickému stresu (Murakami et al. 2005; Wu et al. 2012; Amato et al. 2013; Kubistova et al. 2017; Brown, 2019).

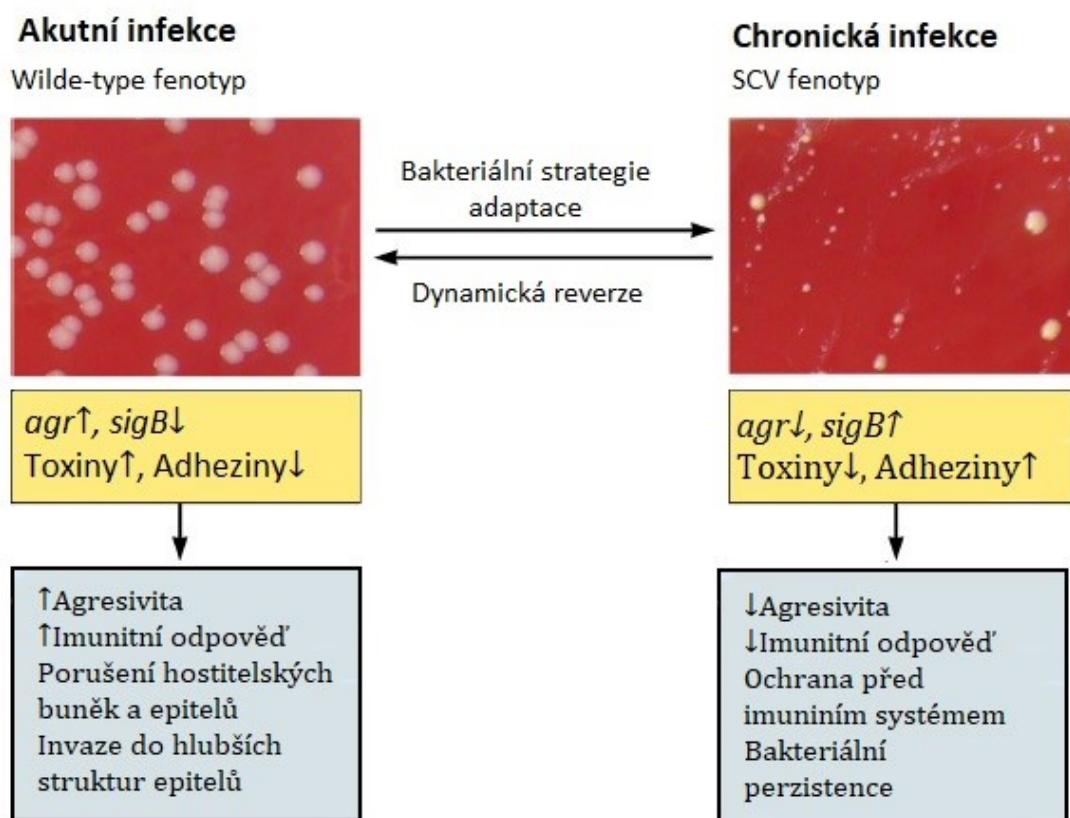
V současné době bylo popsáno několik možných mechanismů navození perzistence, a je tedy zřejmé, že ani mechanismus navození tohoto stavu není jediný a rovněž že závisí na konkrétním druhu bakterie. Nejznámějším mechanismem navození perzistence u *E. coli* je zastavení proteosyntézy prostřednictvím toxin-antitoxin systémů (TA). Například toxin HipA fosforyluje glutamyl tRNA syntetázu, která ve fosforylované podobě nemůže vázat glutamát, čímž se hromadí nenabitá tRNA^{Glu} a akumuluje se (p)ppGpp (Germain et al. 2013). To má za následek pozastavení proteosyntézy a navození stavu dormance. Dalším příkladem je toxin HokB, na jehož transkript se váže GTPáza Obg (vázající (p)ppGpp), což vede ke stabilizaci tohoto transkriptu. Jeho převaha nad antitoxinem poté umožňuje vstup do stavu perzistence (Verstraeten et al. 2015). Delece všech známých TA systémů u *S. aureus* (MazEF, RelBE a Axe/Txe) však míru schopnosti perzistovat neovlivnila (Conlon et al. 2016). Proto se spekulovalo, zda se tento mechanismus uplatňuje i u grampozitivních bakterií. V současnosti se uvažuje o zcela novém TA systému TMCS, který má vliv na vznik perzisterů u *S. aureus* (Habib et al. 2020).

Na navození perzistentního stavu se mohou podílet rovněž regulátory, které se účastní regulace transkripce, translace nebo základních metabolických drah (např. Krebsova cyklu) (Hansen et al. 2008, Wang et al. 2018, Zalis et al. 2019), ačkoliv přesný mechanismus nebyl popsán. Zajímavý mechanismus pochází i z práce Pu a jeho kolegů, kde byla u perzisterů *E. coli* pozorována zvýšená exprese genu pro efluxní pumpu TolC, která buňku aktivně zbavuje antibiotika přenosem přes buněčnou membránu do extracelulárního prostředí (Pu et al. 2016). Tyto dílčí výsledky poukazují na nelehkou, a ještě hodně dlouhou cestu k pochopení dějů pro navození perzistence.

1.1.2 Resuscitace perzisterů a výběr mezi životními strategiemi

Pro klinickou praxi není důležité jen mechanismus, jakým perzisteri vznikají, ale i to, jakým způsobem je lze resuscitovat, tzn. navrátit do neperzistentního fyziologického stavu. To by mohlo mít význam nejen v prognóze průběhu onemocnění, ale především v účinnější a rychlejší léčbě. Na molekulární úrovni může resuscitace nastat obnovením proteosyntézy prostřednictvím obnovení rovnovážného stavu traskriptů pro daný TA, případně odstraněním funkční skupiny z aminoacyl-tRNA, která blokuje její vazbu do A-místa ribozomu (Overgaard et al. 2008; Cheverton et al. 2016).

V současnosti se uvažuje, že perzistence je jedna z mnoha životních strategií, kterou si bakterie volí dle prostředí, ve kterém se vyskytuje, pokud má pro danou strategii vhodnou genetickou výbavu. Například pro bakterii *S. aureus* bylo dokázáno, že bakterie dovede reverzibilně přepínat mezi stavy chronické a akutní infekce (viz obrázek č. 2). Bakterie *S. aureus* aktivující regulační systém virulenčních genů (Agr systém) mohou vytvářet virulenční faktory, což následně vede k akutní infekci (Abdelnour et al. 1993, Tan et al. 2018). Ty bakterie, které mají tento systém buď mutovaný nebo reprimovaný, se nachází ve stavu perzistence, neprodukují virulenční faktory a charakteristická je pro ně exprese alternativního sigma faktoru SigB (Moisan et al. 2006, Tuchscher et al. 2017). Tento projev onemocnění se potom označuje jako chronická infekce. Jakým způsobem bakterie *S. aureus* mezi těmito dvěma strategiemi přepíná a co přepínání indukuje, dosud není zcela jasné.



Obrázek č. 2: „Přepínání“ mezi různými bakteriálními strategiemi u *S. aureus*. Indukce exprese *agr* genů má za následek aktivaci transkripce toxinů, což zvyšuje agresivitu infekce a dochází k invazi do epitelů. Naopak umlčení transkripce *agr* a aktivace transkripce *sigB* vede do stavu bakteriální perzistence a tedy chronické infekci (převzato a upraveno podle Kahl et al. 2016).

1.2 Klinický význam a metody studia perzistence

Perzisteri mohou být příčinou vzniku chronických infekcí, kdy je většinou nelze antibiotiky zcela eradikovat. Prvním důvodem je jejich dormantní stav, kdy jsou obtížně rozpoznatelné imunitním systémem. Druhým důvodem je to, že často přetrvávají v biofilmech nebo přímo v hostitelských buňkách, ve kterém jsou chráněni před hostitelským imunitním systémem (Tuchscher et al. 2010). Například plíce cystických fibrotiků obsahují vysoce viskózní hlen a toto prostředí je proto velmi vhodné pro osídlení bakteriemi *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*. Z důvodu velkého selekčního tlaku (vliv antibiotik) a oslabené imunity těchto pacientů jsou izoláty bakterií z plic cystických fibrotiků vhodnými modely pro studium perzistence (shrnuto v review Hauser et al. 2011).

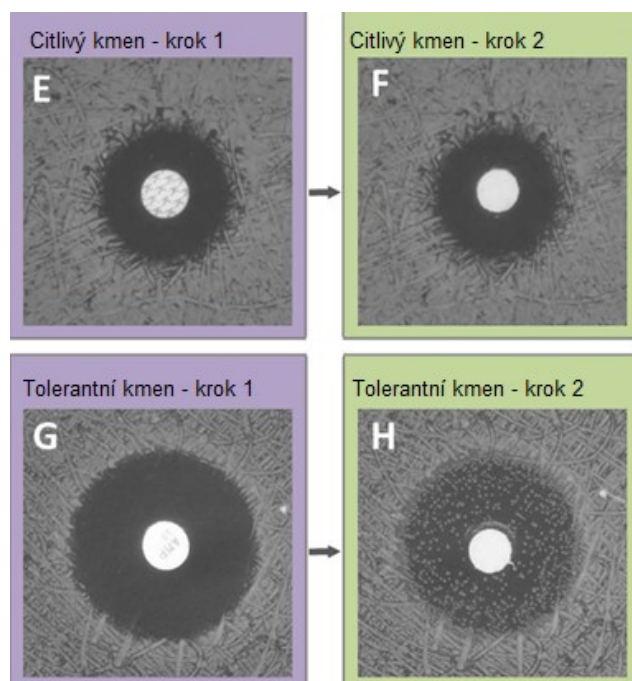
V literatuře je možné najít hned několik snah o dosažení úplné eradikace perzisterů, která spočívá především v jejich resuscitaci přidáním glukózy, fruktózy nebo mannózy k vybranému antibiotiku (Allison et al. 2011; Prax et al. 2016). Další možností je vyvinout antibiotikum, které by bylo rovněž účinné na perzistery (Schmidt et al. 2014).

Spíše možností budoucnosti je cílit na bakteriální regulátory a regulační systémy, které jsou pro vznik perzistence důležité (regulátor SigB nebo Agr systém u *S. aureus*).

Nejrozšířenější metodou testování perzistence pro vědecké účely je stanovení křivky hynutí. Z množství perzisterů přežívajících působení antibiotika lze porovnávat schopnost perzistovat navzájem mezi jednotlivými kmeny a izoláty bakterií. Detekce perzisterů se ale v klinické praxi dosud neprovádí, protože stanovení křivek hynutí je v klinické praxi neproveditelné.

Snaha zavést rychlý test na schopnost perzistovat se poprvé objevila v publikaci Nathalie Balaban a jejích kolegů z roku 2017 a tento test byl pojmenován TD test z anglického Tolerance Disk test (Gefen et al. 2017). Navazuje na klasický difúzní test rezistence a spočívá v resuscitaci perzisterů v inhibiční zóně po nahrazení antibiotického disku diskem s glukózou (viz obrázek č. 3). Ve zmíněné publikaci byl tento nový test provedený u klinických izolátů i laboratorních kmenů gramnegativní bakterie *E. coli*.

V naší práci jsme tento test vyzkoušeli s referenčním kmenem *S. aureus* ATCC 25923 a s klinickými izoláty *S. aureus*. Výsledky z tohoto testu jsme porovnali s výsledky křivek hynutí. Tímto jsme chtěli ověřit, zda TD test má obecné použití a zda se dá perzistence TD testem sledovat i u tohoto podmíněně patogenního organismu.



Obrázek č. 3: Ukázka provedení TD testu. TD test u citlivého (E, F) a perzistentního/tolerantního kmene (G, H). Antibiotický disk umístěný na kultuře rozetřené na misce (E, G) se následně vymění za disk s glukózou; (F, H). V inhibiční zóně lze po kultivaci 24 – 48 h pozorovat resuscitované perzistery (převzato a upraveno podle Gefen et al. 2017).

2 SHRNU TÍ A DIZKUZE VÝSLEDKŮ

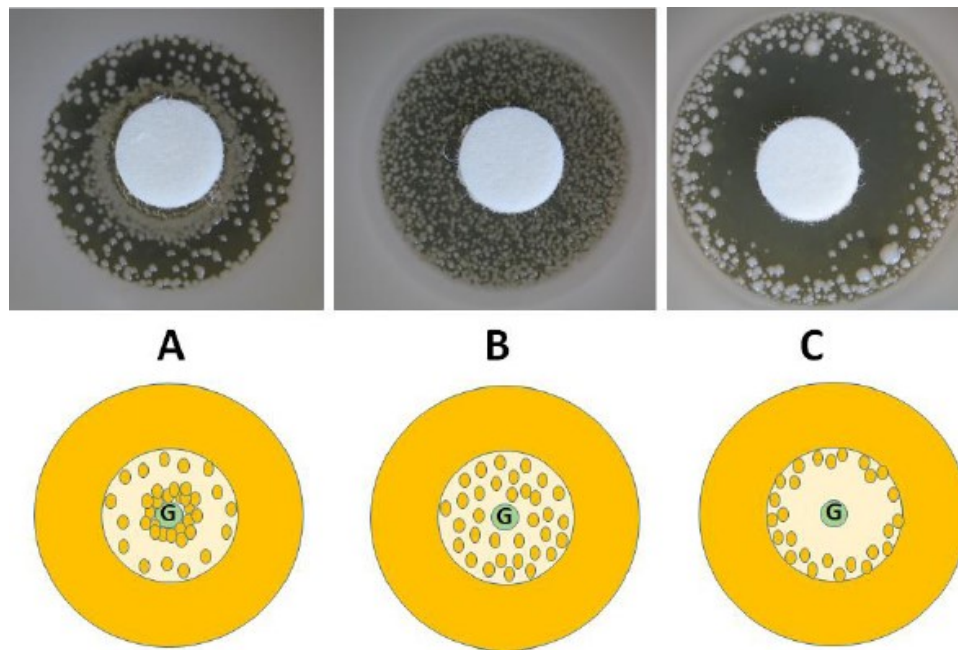
V naší práci jsme se pokusili ověřit, zda TD test vyvinutý skupinou vědců pod vedením N. Balaban a publikovaný v jejich článku v roce 2017 (Gefen et al. 2017), je vhodný i pro testování perzistence/tolerance u podmíněně patogenní grampozitivní bakterie *S. aureus*. Tuto schopnost jsme testovali u referenčního kmene *S. aureus* ATCC 25923 a na klinických izolátech. Ověření jsme provedli na základě provedení křivek hynutí (podle Kubištová 2015), kdy jsme sledovali jejich korelaci s výsledky TD testu. Z této korelace nám vyplynula možnost rozlišení na perzistery a tolerantní bakterie. Perzistence a tolerance je v mnoha publikacích zaměňována, ačkoliv v současnosti existují snahy tyto dva termíny odlišit (Brauner et al. 2016).

Z fakultní nemocnice Motol jsme získali soubor 12 klonálních chronologických dvojic izolátů *S. aureus* pocházejících od pacientů s cystickou fibrózou. Z nich jsme k otestování pomocí TD testu na základě množství mutací a citlivosti k antibiotikům vybrali 6 izolátů, tedy 3 chronologické dvojice, odebrané vždy s dvouletým odstupem. Záměrem bylo vyzkoušet, zda by tento test mohl vypovídat o schopnosti perzistovat i u *S. aureus* a pokud ano, pokusit se porovnat, zda v průběhu dvouletého období došlo u klonální dvojice ke změně této schopnosti (tím se zabývá diplomová práce Kotková 2019). Jako referenční kmen jsme použili *S. aureus* ATCC® 25923™.

Experiment probíhal tak, že jsme rozetřeli definovanou bakteriální suspenzi na BHI agar a poté jsme na něj vložili příslušný antibiotický disk. Pro otestování jsme použili antibiotika, kterými se léčí infekce u cystických fibrotiků: gentamicin, ciprofloxacín, vankomycin a oxacilin. Jednalo se o antibiotika s odlišným mechanismem účinku. Po 24 hodinové kultivaci jsme antibiotický disk vyměnili za disk s glukózou, po kterém, na základě původní publikace skupiny N. Balaban, by mělo dojít k resuscitaci perzisterů v inhibiční zóně. Po následující 48 h kultivaci jsme odečetli výsledky. TD test jsme se pokusili provést i na jiných médiích: Muller-Hinton agar, čokoládový agar, Columbia krevní agar, avšak na žádném z nich jsme oproti BHI nepozorovali perzistery.

Zda skutečně získané výsledky vypovídají o schopnosti perzistovat, jsme u příslušných izolátů ověřili kvantitativním stanovením pomocí křivek hynutí po 1 až 5 hodinách působení studovaných antibiotik v koncentraci 100x MIC. Každé stanovení bylo provedeno v triplicátu. Koncentrace antibiotik použitých při provádění křivek hynutí se lišily od koncentrací použitých při TD testu, což mohlo zkreslit následné vyhodnocení. Způsob vyhodnocení TD testu jsme převzali z výchozí publikace (Gefen et al. 2017), kde pro slabého perzistera platí, že v inhibiční zóně roste v počtu 1 – 10 kolonií, u středního v několika desítkách koloniích, v případě silného perzistera se počet kolonií

pohybuje v řádu set. Pozorovali jsme však, že perzisteři někdy nerostou rovnoměrně v celé ploše inhibiční zóny (viz obrázek č. 4 B), ale mohou růst jen po jejím okraji nebo okolo glukózového disku (jak je ukázáno na obrázku č. 4 A a C). Domníváme se, že tyto bakterie (viz obrázek č. 4C) lze považovat za tolerantní, neboť při porovnání výsledků z křivek hynutí u nich nedošlo k náhlému poklesu populace, který je charakteristický pro perzistenci, ale k postupnému úbytku, který je charakteristický pro toleranci (viz obrázek č. 1, Brauner et al. 2016)

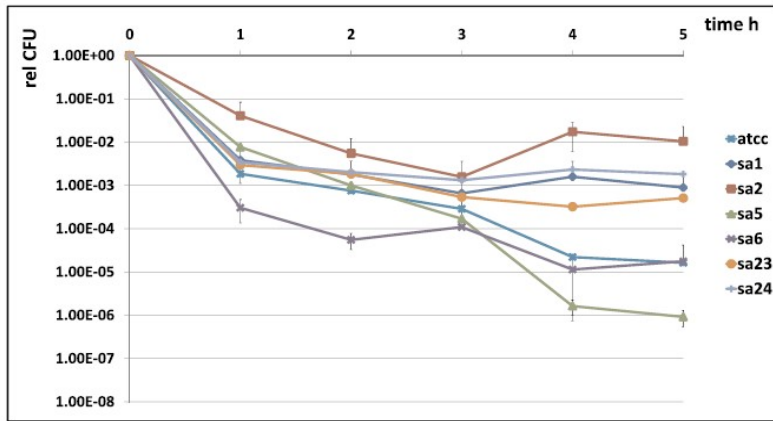


Obrázek č. 4: Možné rozmístění perzistentních/tolerantních bakterií uvnitř inhibiční zóny: A) okolo antibiotického disku B) po celé ploše zóny C) okolo inhibiční zóny

Výsledky TD testů přibližně korelovaly s výsledky křivek hynutí jednotlivých izolátů (viz obrázek č. 5). Nejvíce perzisterů jsme pozorovali pro antibiotikum oxacilin, prakticky každý z izolátů se nám jevil k oxacilinu více či méně perzistentní. Po působení vankomycinu byly kolonie bakterií velmi špatně detekovatelné, což však může být tím, že vankomycin je poměrně velká molekula a obtížně difunduje v médiu. Kolonie proto rostou pomaleji. Při provedení TD testu je proto důležité zvážit výběr a koncentraci testovaného antibiotika, neboť pro všechna nemusí být tento test vypovídající. Dosud není jasné, zda a jakým způsobem má koncentrace ATB vliv na schopnost perzistovat (Balaban et al. 2019).

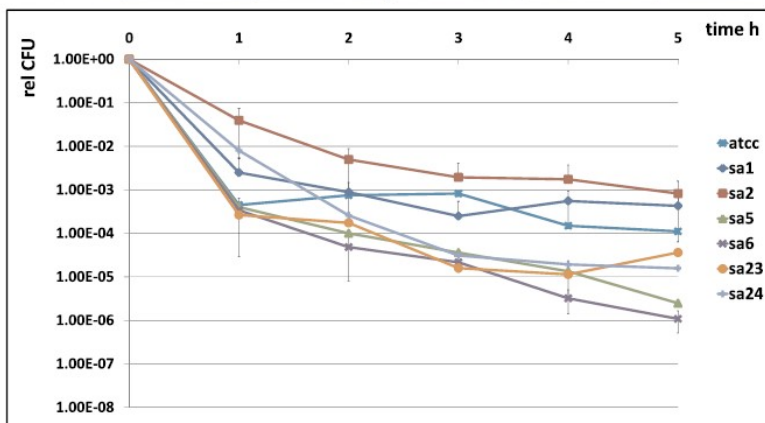
1

	ATCC25923	Sa1	Sa2	Sa5	Sa6	Sa23	Sa24
OXA							
Gluc							

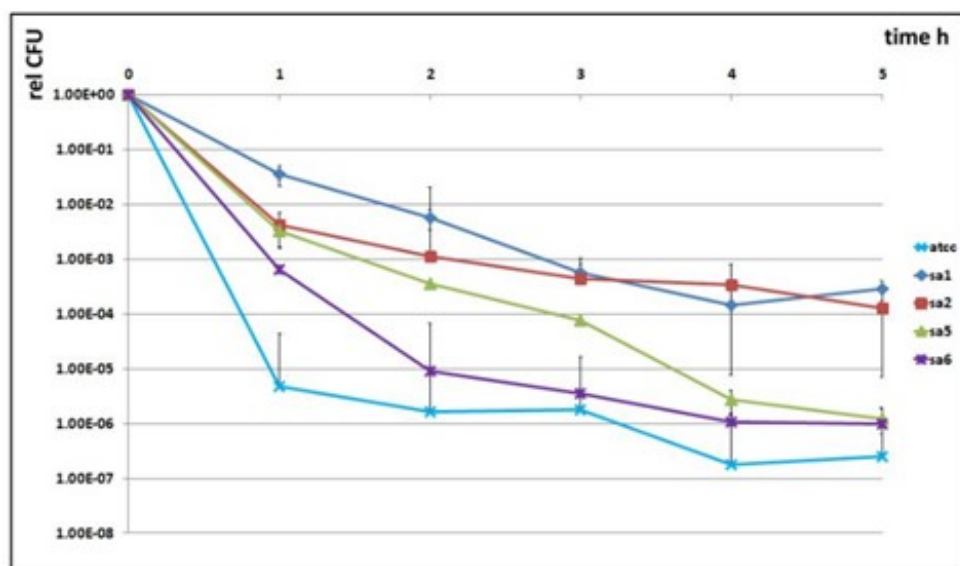
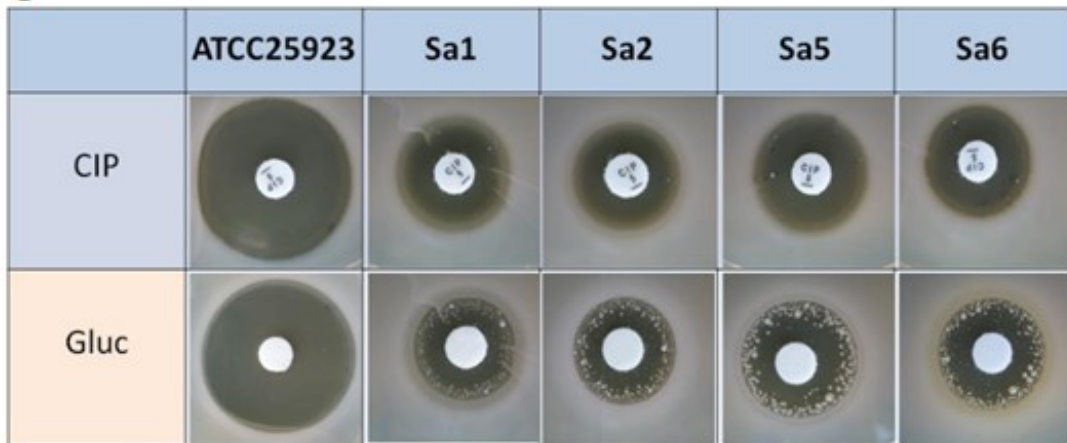


2

	ATCC25923	Sa1	Sa2	Sa5	Sa6	Sa23	Sa24
VAN							
Gluc							



3



Obrázek č. 5: Porovnání výsledků TD testů s výsledky křivek hynutí po působení oxacilinu (1), vankomycinu (2), ciprofloxacinu (3) u klinických izolátů sa1, sa2, sa5, sa6, příp. sa23 a sa24 a referenčního kmene ATCC 25923. Obrázky TD testů (horní řádek) zachycují vytvořené inhibiční zóny po 24 h kultivaci s antibiotikem (OXA, 1 µg; VAN, 5 µg; CIP, 1 µg) před výměnou ATB disku za disk s glukózou, spodní řádek ukazuje inhibiční zóny po 48 h kultivace s glukózovým diskem (gluc). Chybové úsečky křivek hynutí značí standardní odchylku ze tří biologických replikátů.

Jak je vidět na obrázku č. 5 křivky hynutí byly v rámci klonální dvojice izolátů podobné, v rámci dvojice však odlišné. U některých izolátů (např. sa5 pro ciprofloxacin) se průběh křivky hynutí blížil průběhu charakteristickému pro toleranci, což by podle nás mohlo souviset s nerovnoměrnému rozložení perzisterů v inhibiční zóně při TD testu. Každé antibiotikum vytvářelo různé množství perzisterů, které pravděpodobně souviselo s vlastností izolátu perzistery na dané antibiotikum tvořit. Z toho vyvozujeme, že TD test je vhodný na semikvantitativní testování perzistence nebo tolerance na jednotlivá antibiotika u klinických izolátů *S. aureus*, případně na rozlišení těchto dvou různých

životních strategií. Je vhodnou a velmi rychlou metodou, která by se mohla využít v klinické praxi pro stanovení vhodné antibiotické léčby zejména chronických infekcí. V současnosti se žádné takové stanovení neprovádí a z časové a finanční náročnosti nelze v klinické praxi využít křivek hynutí. Proto je rozvoj rychlých a jednoduchých metod na stanovení schopnosti bakterií perzistovat zcela zásadní.

3 ZÁVĚR

Tato práce ověřila, že TD test založený na publikaci skupiny N. Balaban (Gefen et al. 2017), je vhodný k otestování schopnosti perzistovat i u klinických izolátů *S. aureus*. Podle našeho názoru může navíc tento jednoduchý test rozlišit stav perzistence od tolerance.

4 LITERÁRNÍ ZDROJE

1. **Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C., & Tarkowski, A., (1993)** The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infection and Immunity*, **61**, 3879–85
2. **Allison, K. R., Brynildsen, M. P. & Collins, J. J., (2011)** Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, **473**, 216–220
3. **Amato, S., Orman, M., & Brynildsen, M., (2013)** Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*, *Molecular Cell*, **50**, 475–487
4. **Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S., (2004)** Bacterial persistence as a phenotypic switch; Supplemental Materials. *Science*, **305**, 1622–1625
5. **Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, Dehio C, Fortune S, Ghigo JM, Hardt WD, Harms A, Heinemann M, Hung DT, Jenal U, Levin BR, Michiels J, Storz G, Tan MW, Tenson T, Van Melderen L, Zinkernagel A. (2019)** Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Review Microbiology*, July; **17**, 441-448
6. **Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q., (2016)** Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 320–330
7. **Brown, D. R., (2019)** Nitrogen Starvation Induces Persister Cell Formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **201**, e00622-18
8. **Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., Lewis, K. et al., (2016)** Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, **1**, 1–7
9. **Fisher, R. A., Gollan, B. & Helaine, S., (2017)** Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 453–464
10. **Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q., (2017)** TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay, *Scientific Reports*. **7**, 1–9
11. **Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N. & Gerdes, K., (2013)** Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular Cell*, **52**, 248–254
12. **Habib G., Zhu J., Sun B., (2020)** A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, **310**, 1-13
13. **Hansen, S., Lewis, K. & Vulić, M., (2008)** Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**, 2718–2726
14. **Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M. & McColley, S. A., (2011)** Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **24**, 29–70
15. **Cheverton, A. M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C. T., Mylona, A., Hare, S. A., & Helaine, S., (2016)** A Salmonella toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA. *Molecular Cell*, **63**, 86–96

16. **Kahl, B. C., Becker, K., & Löffler, B., (2016)** Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **29**, 401-427
17. **Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K., (2004)** Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **186**, 8172–8180
18. **Kubištová, L., (2015)** Studium fenoménu perzistence u *Staphylococcus aureus*, diplomová práce, Univezita Karlova v Praze, Praha
19. **Kubistova, L., Dvoracek, L., Tkadlec, J., Melter, O. & Licha, I., (2017)** Environmental Stress Affects the Formation of *Staphylococcus aureus* Persisters Tolerant to Antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, **24**, 547–555
20. **Kotková, H., (2019)** Změny ve schopnosti perzistovat u chronologických izolátů *Staphylococcus aureus*, diplomová práce, Univezita Karlova v Praze, Praha
21. **Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J. & Wood, T. K., (2013)** Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 1468–1473
22. **Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. & Gerdes, K., (2013)** (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, **154**, 1140–1150
23. **Michiels, J. E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N. & Michiels, J., (2016)** Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates*, **29**, 76–89
24. **Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C. L., Langlois-Bégin, P., Michaud, S., & Malouin, F., (2006)** Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *Journal of Bacteriology*, **188**, 64–76
25. **Murakami, K., Ono, T., Viducic, D., Kayama, S., Mori, M., Hirota, K., Nemoto, K., & Miyake, Y., (2005)** Role for *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, **242**, 161–167
26. **Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G. & Gerdes, K., (2008)** Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Molecular Microbiology*, **69**, 841–857
27. **Prax, M., Mechler, L., Weidenmaier, C. & Bertram, R., (2016)** Glucose augments killing efficiency of daptomycin challenged *Staphylococcus aureus* persisters. *PLoS One*, **11**, 1–15
28. **Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Chen, H., Baker, M. A. B., Ge, H., Bai, F. et al. (2016)** Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Molecular cell*, **62**, 284–294
29. **Schmidt, N. W., Deshayes, S., Hawker, S., Blacker, A., Kasko, A. M., & Wong, G. C., (2014)** Engineering persister-specific antibiotics with synergistic antimicrobial functions. *ACS Nano*, **8**, 8786–8793
30. **Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S., (2018)** Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. *Frontiers of Microbiology*, **9**, 1–11

31. **Tuscherr, L. Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, & Löffler B., (2010)** *Staphylococcus aureus* small colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *The Journal of Infectious Diseases*, **202**, 1031–1040
32. **Tuscherr, L., Geraci, J. & Löffler, B. (2017)** *Staphylococcus aureus* regulator sigma b is important to develop chronic infections in hematogenous murine osteomyelitis model. *Pathogens*, **6**, 1–6
33. **Verstraeten, N., Knapen, W. J., Kint, C. I., Liebens, V., Van den Bergh B., Dewachter, L., Michiels, J .E., Fu, Q., David, C. C., Fierro, A. C. et al. (2015)** Opg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Molecular Cell*, **59**, 9–21
34. **Wang, Y., Bojer, M., George, S., Wang, Z., Jensen, P., Wolz, Ch. & Ingmer, H., (2018)** Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Scientific Reports*, **8**, 1–13
35. **Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., & Lewis, K., (2012)** Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**, 4922–4926
36. **Zalis, E. A., Nuxoll, A. S., Manuse, S., Clair, G., Radlinski, L. C., Conlon, B. P., Adkins, J., Lewis, K. (2019).** Stochastic variation in expression of the tricarboxylic acid cycle produces persister cells. *mBio*, **10**, 1–10

5 PUBLIKACE

Kotková Hana, Cabrnchová Marie, Lichá Irena, Tkadlec Jan, Fila Libor, Bartošová Jana, Melter Oto (2019) Evaluation of TD test for analysis of persistence or tolerance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Microbiological Methods*, **167**, 105705, 1–6

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105705>