

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Imunochromatografické metody pro rychlý průkaz antigenů nebo specifických  
protilátek

Petr Boudný

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr Boudný**  
Osobní číslo: **C13294**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Imunochromatografické metody pro rychlý průkaz antigenů  
nebo specifických protilátek**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Prostudujte recentní literaturu popisující princip imunochromatografických metod s důrazem na materiály, možnosti uspořádání jednotlivých částí senzoru, značení specifických protilátek jako součást detekčního systému.
2. Charakterizujte možnosti metody konkrétně pro průkaz případně kvantifikaci antigenů různé struktury, molekulové hmotnosti, chemické povahy; dále specifických protilátek pro průkaz infekce. Vysvětlete přednosti a upozorněte na nedostatky dané techniky. Uveďte i oblasti, kde všude lze tuto techniku využít a kde se v současné době hojně používá.
3. Vypracujte literární rešerši na dané téma v délce 30 - 40 normovaných stran včetně obrázků a schémat. Při vyhledávání literárních údajů využijte všech dostupných databází NCBI, PubMed, Scopus, WOS atd. podle pokynů školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

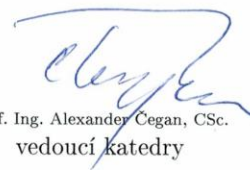
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 7. 2018

Petr Boudný

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat především mé vedoucí práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, pomoc, ochotu, trpělivost a odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval, své rodině a všem blízkým, kteří mě podporovali během studií.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá imunochromatografickými stripovými metodami. Zaměřuje se na příklady jejich využití v různých oborech jako je například medicína, potravinářství, životní prostředí. Popisuje jejich výhody a nevýhody a také možnost využití imunochromatografických testů mimo laboratoř. Imunochromatografické testy slouží k rychlé detekci analytů v biologických vzorcích a potravinách.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kapalinová chromatografie, imunochromatografické testy, protilátky, antigeny

**TITLE**

Immuno chromatographic methods for the rapid detection of antigens or specific antibodies

**ANNOTATION**

This bachelor thesis is focused to immuno chromatographic methods. This text describes in a detail the practical examples of tests applied in various science fields such as a medicine, food, environment. The bachelor thesis emphasizes advantages and disadvantages of immuno chromatographic tests as well as using of them outside the laboratory. Immuno chromatographic tests become more and more popular for the rapid detection of analytes in biological samples and food

**KEYWORDS**

Liquid chromatography, immuno chromatographic tests, antibodies, antigens

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 0 ÚVOD.....   | 1  |
| 1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....                                    | 2  |
| 1.1. Princip kapalinové chromatografie .....                        | 2  |
| 1.2. Způsoby uspořádání kapalinové chromatografie .....             | 2  |
| 1.2.1 Tenkovrstvá a papírová kapalinová chromatografie.....         | 3  |
| 1.2.2 Kolonová kapalinová chromatografie.....                       | 3  |
| 1.2.3 Kapalinová chromatografie ve vsádkovém uspořádání .....       | 4  |
| 1.2.4 Kapalinová rozdělovací chromatografie .....                   | 4  |
| 1.2.5 Kapalinová adsorpční chromatografie .....                     | 5  |
| 1.2.6 Iontově výměnná chromatografie .....                          | 5  |
| 1.2.7 Gelová permeační chromatografie.....                          | 6  |
| 1.2.8 Afinitní chromatografie .....                                 | 6  |
| 1.2.8.1 Historie afinitní chromatografie .....                      | 6  |
| 1.2.8.2 Princip afinitní chromatografie.....                        | 6  |
| 1.2.8.3 Nosiče využívané v kapalinové chromatografii .....          | 7  |
| 1.2.8.4 Příklady ligandů používaných v afinitní chromatografii..... | 7  |
| 1.2.8.5 Imunoafinitní chromatografie.....                           | 8  |
| 2 Metody založené na reakci antigenu s protilátkou .....            | 9  |
| 2.1 Antigen.....  | 9  |
| 2.2 Protilátka .....  | 9  |
| 2.2.1 Protilátky třídy IgG.....                                     | 9  |
| 2.2.2 Polyklonální protilátky .....                                 | 10 |
| 2.2.3 Monoklonální protilátky .....                                 | 10 |
| 2.3 Indikátory imunochemických metod.....                           | 11 |
| 2.3.1 Enzymy .....  | 11 |
| 2.3.2 Zlaté nanočástice.....  | 11 |
| 2.3.3 Nanočástice uhlíku.....                                       | 12 |
| 2.3.4 Latexové nanočástice .....                                    | 12 |
| 2.3.5 Liposomy .....  | 12 |
| 2.3.6 Nanočástice selenu.....                                       | 13 |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.3.7   | Silikátové nanočástice s chelátem europia.....  | 13 |
| 3       | IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ STRIPOVÉ METODY .....   | 14 |
| 3.1     | Základní součásti stripového testu .....  | 14 |
| 3.1.1   | Membrána .....  | 15 |
| 3.1.2   | Indikátory.....   | 16 |
| 3.1.3   | Reagencie.....  | 16 |
| 3.1.4   | Plastové ochranné pouzdro pro uložení stripových proužků .....  | 17 |
| 3.2     | Uspořádání testů a jejich dělení .....  | 18 |
| 3.2.1   | Využití imunochromatografických testů v praxi .....   | 18 |
| 3.2.2   | Dělení imunochromatografických testů uspořádání .....   | 18 |
| 3.2.3   | Třídění imunochromatografických testů dle stanovovaného analytu .....   | 20 |
| 3.2.3.1 | Princip testu pro stanovení nízkomolekulárních látek.....   | 20 |
| 3.2.3.2 | Princip testu pro stanovení vysokomolekulárních látek.....  | 21 |
| 3.2.3.3 | Princip testu pro stanovení specifických protilátek.....  | 21 |
| 4       | PŘÍKLADY VYUŽITÍ IMUNOCHROMATOGRAFICKÝCH STRIPOVÝCH METOD .....   | 23 |
| 4.1     | Potravinové testy.....  | 23 |
| 4.1.1   | Stanovení leptospermum v manuka medu .....  | 23 |
| 4.1.2   | Stanovení chloramfenikolu v kuřecím mase pomocí fluorescenční imunochromatografie .....   | 24 |
| 4.1.3   | Stanovení $\beta_2$ - antagonistů .....   | 25 |
| 4.1.4   | Multiplexové stanovení více antibiotik v mléce .....  | 27 |
| 4.2     | Příklady klinických testů.....  | 28 |
| 4.2.1   | Imunochromatografický test pro stanovení $\alpha$ -fetoproteinu .....   | 28 |
| 4.2.2   | Imunochromatografický semikvantitativní test pro detekci C-reaktivního proteinu při rozlišování bakteriální a virové infekce..... | 29 |
| 4.3     | Příklady toxikologických testů.....   | 31 |
| 4.3.1   | Stanovení toxinu produkovaného řasou <i>Alexandrium minutum</i> pomocí paramagnetického proužku.....                              | 31 |
| 4.3.2   | Stanovení marihuany, kokainu, opiátů, metamfetaminu a amfetaminu pomocí multi screeningového testu .....                          | 31 |
| 4.3.3   | Stanovení mykotoxinů v potravinách .....  | 32 |
| 4.3.4   | Stanovení brevetoxinu v rybách pomocí imunochromatografického testu značeného koloidním zlatem .....                              | 33 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.4   | Příklady imunochromatografických testů používaných ve veterinární medicíně .....                    | 34 |
| 4.4.1 | Stanovení <i>Toxoplasma gondii</i> u psů a koček pomocí zlatých nanočástic .....                    | 34 |
| 4.5   | Příklady imunochromatografických testů používaných v mikrobiologii.....                             | 36 |
| 4.5.1 | Stanovení antigenů <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....  | 36 |
| 4.5.2 | Stanovení <i>Salmonella Typhimurium</i> ve vzorku rajčat .....                                      | 36 |
| 5     | Výzkum a vývoj v oboru imunochromatografických testů .....  | 38 |
| 5.1   | Pro stanovení aflatoxinu M1 v mléce pomocí fluorescence mikrosfér.....                              | 38 |
| 5.2   | Stanovení <i>Talaromyces (Penicillium) marneffei</i> v moči pomocí specifických<br>protilátek ..... | 39 |
| 5.3   | Pro stanovení viru západonilské horečky.....  | 40 |
| 5.3.1 | Pro stanovení bioaktivního <i>Ganoderma triterpenoids</i> .....                                     | 41 |
| 6     | ZÁVĚR.....  | 44 |
| 7     | ZDROJE .....  | 45 |

## Seznam obrázků

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1 Schématické uspořádání kolonové chromatografie.....   | 4  |
| Obrázek 2 Schéma iontově výměnné chromatografie.....  | 5  |
| Obrázek 3 Schéma gelové permeační chromatografie.....   | 6  |
| Obrázek 4 Princip imunoafinitní chromatografie v kolonovém uspořádání.....                                  | 8  |
| Obrázek 5 Struktura imunoglobulinu IgG .....  | 10 |
| Obrázek 6 Schéma imunochromatografického testu .....  | 15 |
| Obrázek 7 Výroba specifického aptameru.....   | 17 |
| Obrázek 8 Ukázka plastového pouzdra .....   | 17 |
| Obrázek 9 Příklad speciální úpravy před použitím testu .....  | 18 |
| Obrázek 10 Příklady uspořádání testu .....  | 19 |
| Obrázek 11 Příklad paralelně uspořádaného boxu .....  | 19 |
| Obrázek 12 První a druhý typ kompetitivního uspořádání pro nízkomolekulární látky .....                     | 20 |
| Obrázek 13 Sendvičové uspořádání testu .....  | 21 |
| Obrázek 14 Reakce stanovované protilátky v testovací linii .....  | 22 |
| Obrázek 15 Květina balvín .....   | 23 |
| Obrázek 16 Struktura testovacího proužku.....   | 24 |
| Obrázek 17 Kalibrační řada ukazující závislost fluorescence na koncentraci CAP .....                        | 25 |
| Obrázek 18 Struktura testovacího proužku.....   | 26 |
| Obrázek 19 Struktura testovacího proužku a ukázka možného výsledku .....                                    | 28 |
| Obrázek 20 Struktura testu pro stanovení AFP .....  | 29 |
| Obrázek 21 Schématické znázornění stripového testu pro stanovení C-reaktivního proteinu .....               | 30 |
| Obrázek 22 Ukázka výsledku testu a zbarvení závislé na koncentraci.....                                     | 30 |
| Obrázek 23 Příklady výsledků multi screeningového testu na drogy.....                                       | 32 |
| Obrázek 24 Struktura testovacího proužku pro stanovení mykotoxinů.....                                      | 33 |
| Obrázek 25 Vyhodnocení výsledků pro stanovení brevetoxinu .....   | 34 |
| Obrázek 26 Struktura testovacího proužku pro stanovení <i>Toxoplasma gondii</i> .....                       | 35 |
| Obrázek 27 Klesající zbarvení v závislosti na koncentraci <i>T. gondii</i> v ředěných vzorcích vzorku ..... | 35 |
| Obrázek 28 Struktura testu pro stanovení <i>Salmonella Typhimurium</i> .....                                | 37 |
| Obrázek 29 Princip stanovení aflatoxinu M1 v mléce.....   | 39 |
| Obrázek 30 Způsoby odečítání testu při stanovení aflatoxinu M1 v mléce.....                                 | 39 |
| Obrázek 31 Ukázka specifity testu pro stanovení <i>T. marneffei</i> .....                                   | 40 |
| Obrázek 32 Lesklokorka lesklá.....  | 41 |
| Obrázek 33 Struktura kyseliny A z lesklokorek .....   | 42 |
| Obrázek 34 Struktura testovacího proužku.....   | 42 |

## Seznam zkratek

|       |  |
|-------|--|
| AFP   | $\alpha$ -Fetoprotein                  |
| BSA   | hovězí sérový albumin                  |
| CAP   | chloramfenikol                         |
| CRP   | C-reaktivní reklama                    |
| DON   | deoxynivalenol                         |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay      |
| HPLC  | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| Ig    | Imunoglobulin                          |
| QNs   | chinolony                              |
| RNA   | ribonukleová kyselina                  |
| RAC   | ractopamin                             |
| SAL   | salbutamol                             |
| SAs   | sulfoamidy                             |
| SPA   | stafylokokový protein A                |
| TCs   | tetracykliny                           |
| ZEA   | zearalenon                             |

## 0 ÚVOD

Imunochromatografické metody v plošném uspořádání jsou založeny na reakci antigenu se specifickou protilátkou. Vycházejí z principu separační metody kapalinové chromatografie. Svou oblibu si tyto imunochromatografické metody získaly hlavně díky své jednoduchosti a rychlé detekci stanovované látky. Navíc mohou být provedeny i bez nenáročného přístrojového vybavení, i v terénu mimo laboratoř. Výsledky testů lze hodnotit vizuálně. Tyto testy umožňují jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Nevyžadují téměř žádné pracovní zkušenosti, proto se využívají jako tzv. „screeningové testy“, které jsou volně k prodeji a vyšetření může provádět i laik nebo jako tzv. „point of care“ testy, které se provádějí u lůžka pacienta. Jedná se o analýzy kapilární krve, moči, slin, kdy během krátké doby získáme informace o přítomnosti analytů a v některých případech i orientační hodnoty metabolitů. Velkou výhodou těchto testů je potřeba malého objemu vzorku. Na principu těchto metod fungují i tzv. „quick“ testy sloužící k rychlé detekci například léčiv, drog nebo různých metabolitů v lidském těle.

V dnešní době mají tyto metody řadu využití v mnoha oborech. V medicíně například můžeme imunochromatografickými metodami prokazovat  $\alpha$ -fetoprotein v krvi (Yang a kol., 2011). V oboru mikrobiologie se imunochromatografické metody používají například pro stanovení *Toxoplasma gondii* (Jiang a kol., 2015) u psů a koček v krvi nebo antigenů *Mycobacterium tuberculosis* v krvi (Bekmurzayeva a kol., 2013). Další široké uplatnění nalézají tyto metody v potravinářství, kdy se dají využít například pro určení pravosti manuka medu, detekováním glykosidu zvaného leptospermum (Kato a kol., 2016). Dále pak k detekci chloramfenikolu v kuřecím mase (Bai a kol., 2015), antibiotik v mléce (Wang a kol., 2016) nebo mykotoxinů v potravinách (Song a kol., 2014). V rámci životního prostředí se používají například k detekci řasy *Alexandrium minutum*, která způsobuje toxický vodní květ (Gas a kol., 2016).

# 1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

## 1.1. Princip kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie je fyzikálně – chemická separační technika, při které se dělí složky směsi mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, a to stacionární (nepohyblivou) a mobilní fázi (pohyblivou). Během procesu dochází k opakovanému transportu složek ze stacionární fáze do mobilní fáze. Při separaci se ustanovuje dynamická rovnováha, kdy se mezi náplní kolony (stacionární fáze) a kapalinou, která protéká kolonou (mobilní fáze), udržuje konstantní poměr látkového množství každé separované látky v obou fázích. Distribuci složek směsi mezi mobilní a stacionární fází popisuje distribuční (rozdělovací) konstanta (rovnice 1). Separované látky se liší svou afinitou k oběma fázím. Na rozdíl od plynové chromatografie, o separaci složek ve vzorku nerozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale i jaká je použita mobilní fáze. Pokud je stacionární fází tuhá fáze, jedná se o adsorpční kapalinovou chromatografii, naopak je-li stacionární fází kapalina, jedná se o rozdělovací kapalinovou chromatografii.

**Rovnice 1** Výpočet distribuční konstanty

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} * \frac{V_m}{V_s}$$

Kde,  $[A]_s$  a  $[A]_m$  jsou rovnovážné koncentrace složky A v mobilní a stacionární fází,  $(n_A)_s$  a  $(n_A)_m$  jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fází,  $V_m$  a  $V_s$  jsou objemy stacionární a mobilní fáze.

## 1.2. Způsoby uspořádání kapalinové chromatografie

A) Kapalinovou chromatografii můžeme rozlišit podle uspořádání a způsobu provedení separačních kroků na:

- a) tenkovrstvou a papírovou,
- b) kolonovou,
- c) vsádkovou.

### 1.2.1 Tenkovrstvá a papírová kapalinová chromatografie

U planárních technik kapalinové chromatografie je stacionární fáze umístěna v ploše. Je buď složena z chromatografického papíru, nebo z tenké vrstvy gelu na vhodné podložce ze skla, hliníku nebo polyesteru. Látky se separují na základě různé pohyblivosti v systému dvou fází, jelikož se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů nebo ve svých rozměrech. Základním separačním mechanismem je rozdělovací rovnováha mezi vodou nebo jiným rozpouštědlem (stacionární fáze), zakotveným na nosiči např. chromatografickém papíře v případě papírové chromatografie, a použitou mobilní fází.

U obou metod se vzorek se nanáší pomocí kapiláry nebo mikropipety na start na jednom z konců plochy. Start by se měl nacházet alespoň 1 cm nad hladinou mobilní fáze. Chromatografický papír se spodním okrajem (blíže k startu) vnoří do mobilní fáze, která začne vzlínat papírem nebo tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil a pohybuje přes start, kde byl nanesen vzorek. Nebo se využívá sestupné provedení, kdy je chromatografický papír zavěšen ve vaničce s mobilní fází, která putuje směrem dolů. Složky vzorku jsou unášeny tím rychleji, čím méně adsorbují na stacionární fázi a čím lépe jsou rozpustné v mobilní fází. Proto se vzorek rozdělí na zóny obsahující jednotlivé látky.

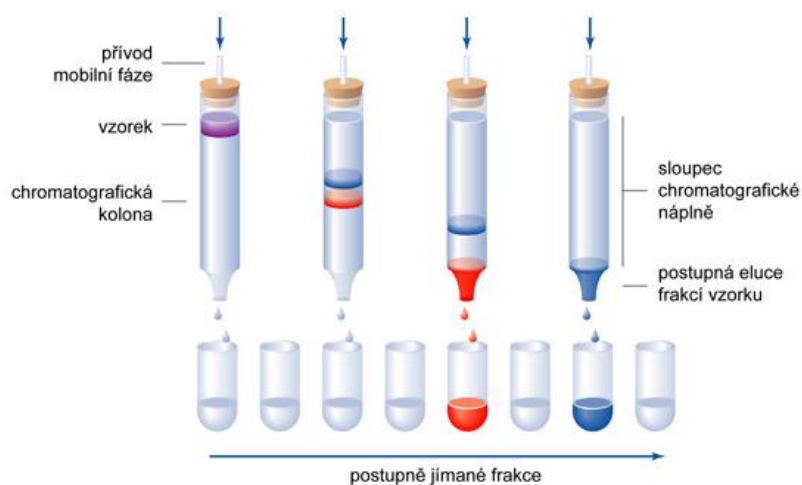
Detekce se provádí vizuálně, pokud jsou separované látky barevné nebo se využívá fluorescenční detekce pod UV zářením. Pohyblivost látky se vyjadřuje hodnotou  $R_F$  (retardační faktor), která se určuje jako poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna stanovované látky ke vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla od startu.

### 1.2.2 Kolonová kapalinová chromatografie

Kolona je část chromatografu, v jejíž vnitřní části je umístěna stacionární fáze. Jedná se o rovné trubice z odolného materiálu. Rozměry kolony a velikost částic adsorbentu závisí na typu použití. Preparativní kolona měří řádově 250 – 1000 mm (vnitřní průměr 10 - 50 mm), velikost částic je 10 – 100  $\mu\text{m}$ . U iontově výměnné chromatografie se využívá kolona o délce 150 – 1000 mm (vnitřní průměr 6 – 10 mm), velikost částic se pohybuje v rozmezí 15 – 100  $\mu\text{m}$ . U analytických kolon se setkáme s délkou v rozmezí 50 – 300 mm (vnitřní průměr 2 – 4,6 mm) a velikost částic 3 – 5  $\mu\text{m}$ . Mikrokolony jsou dlouhé 50 – 1000 mm (vnitřní průměr 0,5 – 2 mm), velikost částic se pohybuje v rozmezí 3 – 10  $\mu\text{m}$ .

Na začátek kolony, kterou protéká mobilní fáze, se vnese malý objem vzorku. Složky vzorku jsou unášeny mobilní fází kolonou, přičemž interagují se stacionární fází a opět přecházejí do mobilní fáze. Látky obsažené ve vzorku poté postupně opouštějí kolonu v různých retenčních časech. Mobilní fáze pomocí čerpadel (do tlaků 30 – 50 MPa) protéká

kolonou. Pro tvorbu gradientu mobilní fáze se využívá nízkotlaké nebo vysokotlaké uspořádání.



Obrázek 1 Schématické uspořádání kolonové chromatografie  
(převzato od Kodíček, 2004)

### 1.2.3 Kapalinová chromatografie ve vsádkovém uspořádání

Vsádková chromatografie je separační metoda, která je založena na principu adsorpce. Nejprve se připraví náplň do kolony. Na stacionární fázi, tvořenou adsorpčními částicemi, se naadsorbují vzorek. Vhodná mobilní fáze postupně vymývá jednotlivé látky, které jsou obsažené ve vzorku.

#### B) Rozdělení kapalinové chromatografie dle náplně a principu separace

Kapalinovou chromatografii můžeme dělit podle použité stacionární fáze na:

- a) kapalinovou rozdělovací chromatografii,
- b) kapalinovou adsorpční chromatografii,
- c) iontově výměnnou chromatografii,
- d) gelovou permeační chromatografii,
- e) afinitní chromatografii.

### 1.2.4 Kapalinová rozdělovací chromatografie

U rozdělovací kapalinové chromatografie je stacionární fáze (kapalina) zakotvena na pevném nosiči. K separaci dochází na základě rozdělovací rovnováhy. Podmínkou této separace je vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze.

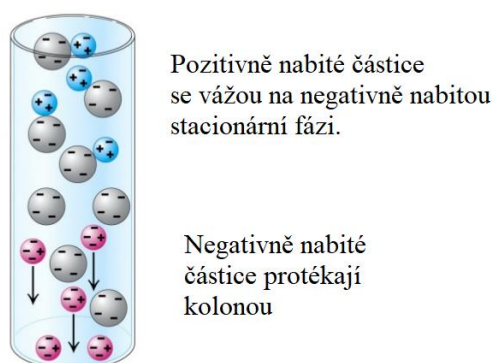


### 1.2.5 Kapalinová adsorpční chromatografie

Při kapalinové adsorpční chromatografii dochází k interakcím složek vzorku v mobilní fázi s adsorbentem (stacionární fáze). Složky obsažené ve vzorku se pohybují kolonou různou rychlostí podle jejich adsorpční distribuční konstanty. Molekuly samotné mobilní fáze nejprve obsadí celý povrch adsorbentu, k jeho povrchu jsou drženy silou, která odpovídá adsorpční energii. Jestliže se v mobilní fázi objeví analyt s větší adsorpční energií, vytěsni molekuly mobilní fáze z adsorbentu. Pokud by byla adsorpční energie analytu nižší, prošel by bez retence. Vzorek se tedy pohybuje tím rychleji, čím je méně adsorbován. Pro tuto metodu jsou nejčastěji používány silně polární adsorbenty, které jsou plně porézní. Nejrozšířenějším adsorbentem je silikagel, méně často se pak využívá oxid hlinitý a Florisil (Pinto a kol., 2000).

### 1.2.6 Iontově výměnná chromatografie

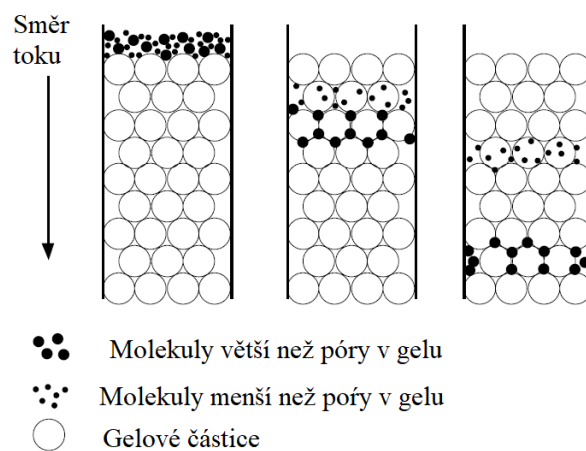
Iontově výměnná chromatografie je metoda, při které slouží jako stacionární fáze iontový nosič. Tím je nejčastěji makromolekulární matrice (polystyren, dextran nebo celulóza) nesoucí vhodné funkční skupiny zásadité nebo kyselé povahy. Funkční skupiny jsou pevně vázaným iontem, na kterém je iontovou vazbou připojený protiiont s opačným nábojem. Při této metodě se uplatňují elektrostatické síly mezi ionty opačného náboje podle Coulombova zákona (obrázek 2). Ionty z okolního roztoku difundují do iontového nosiče, vytěsňují a vyměňují se za ekvivalentní množství jiných iontů vázaných na iontovém nosiči, v určitém okamžiku dochází tedy k ustanovení rovnováhy. Separace je ovlivněna typem nosiče, pH mobilní fáze, iontovou silou mobilní fáze a také typem protiiontů nacházejících se v mobilní fázi.



Obrázek 2 Schéma iontově výměnné chromatografie chromatografie (upraveno dle Berg a kol., 2007)

## 1.2.7 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je typ kapalinové chromatografie, při které se molekuly vzorku separují podle své velikosti a tvaru. Stacionární fází je kapalina, zakotvená v pórech gelové částice (obrázek 3). Gelové částice má kulovitý tvar s definovanými rozměry pórů. Gelové částice jsou nejčastěji na bázi polysacharidů nebo polyakrylamidu. Mobilní fáze, obsahující vzorek, protéká kolem těchto gelových částic. Molekuly vzorku, jejichž průměr je menší než průměr pórů, difundují do gelových částic, z toho vyplývá, že jsou zadržovány v náplni kolony déle než větší molekuly.



Obrázek 3 Schéma gelové permeační chromatografie  
(upraveno dle DRGP institute, 2018)

## 1.2.8 Afinity chromatografie

### 1.2.8.1 Historie afinity chromatografie

Princip metody afinity chromatografie byla poprvé popsána roku 1910 Emilem Starckensteinem, který použil nerozpustný škrob k izolaci  $\alpha$ -amylasy.

V roce 1967 Porath a kol. vynalezli způsob ukotvení ligandů na vhodný nosič. Použili metodu kovalentní vazby peptidových a proteinových protilátek na agarózu aktivovanou bromkyanem. V roce 1968 Cuatrecasas a kol. metodu dále rozpracovali a pojmenovali ji afinity chromatografie.

### 1.2.8.2 Princip afinity chromatografie

Afinity chromatografie je vhodná metoda pro separaci nebo analýzu specifických látek ve vzorku nebo pro studium biologické interakce. Afinity chromatografie je typ kapalinové chromatografie, která využívá selektivní a reverzibilní vazby, které jsou přítomny

v mnoha biologických systémech. Jedná se o tvorbu biospecifického páru, jako je například vazba protilátka-antigen nebo enzym-substrát. U afinitní chromatografie je kolona naplněná stacionární fází, obsahující ligand. Poté se do kolony vnáší roztok vzorku s látkami, které chceme separovat. Po promytí zůstává separovaná látka v koloně, neboť vytváří komplex biomolekula-ligand, zatímco ostatní kontaminující složky vzorku, které nemají afinitu k ligandu, projdou kolonou bez zadržení a jsou vymyty. Vzniklý komplex je reverzibilní a použitím vhodného tlumivého roztoku nebo rozpustného protiligandu je možné vázané biomolekuly z komplexu uvolnit.

Separace látek spočívá ve tvorbě nekovalentních vazeb mezi ligandem a separovanou látkou na základě biospecifických interakcí, jako jsou vodíkové můstky, iontové vazby, hydrofobní interakce, dipol-dipol interakce, Londonovy disperzní síly, Coulombické interakce.

Tvorba biospecifických párů je velice citlivá na podmínky prostředí jako jsou pH, teplota, iontová síla, koncentrace kofaktorů a jiných důležitých látek potřebných pro průběh reakce. Afinitní chromatografie může být používána samostatně nebo v kombinaci s ostatními technikami. Díky nespočtu výhod se stala afinitní chromatografie populární metodou, která se využívá v oblastech izolace proteinů, enzymů a protilátek (Pfaunmiller a kol., 2013).

### **1.2.8.3 Nosiče využívané v kapalinové chromatografii**

Nosič vhodný pro separaci látek by měl být chemicky i mechanicky stabilní a v daném prostředí nerozpustný, pro izolaci biomolekul dostatečně hydrofilní, s porézní nebo neporézní strukturou. Materiál musí umožnit přístup analytu, izolované látky pro interakci (vazbu) s ligandem. Nosiče dále můžeme dělit na jednosložkové a složené. Jednosložkové nosiče dále dělíme na anorganické, organické a syntetické. Mezi nejčastěji používané organické nosiče patří celulóza (Tokomi a kol., 2014), dextran (Vician a kol., 1976) a agaróza (Walkup a kol., 2014). Mezi anorganické patří různé křemičité (Fengna a Jianmin, 2006) nosiče. Mezi syntetické patří polyakrylamid (Atasever a kol., 2013) a podobné. Složené jsou tvořeny často z polysacharidu a polyakrylu amidů (Valls a kol., 2016).

### **1.2.8.4 Příklady ligandů používaných v afinitní chromatografii**

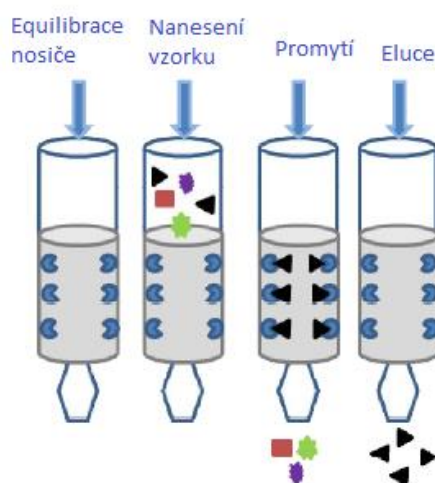
Ligand je látka, se kterou stanovovaná látka vytváří komplex. Mezi hlavní vlastnosti správného ligandu musí být specifická a reverzibilní vazba na izolovanou látku a musí být přítomné chemicky modifikovatelné skupiny pro vazbu na nosič. Ligandy dále můžeme dělit na přirozené či syntetické, mohou mít úzkou specifitu nebo mohou vázat nekovalentními

interakcemi celou skupinu látek. Mezi nejčastěji používané typy ligandů patří proteiny, nukleové kyseliny, lektiny či enzymy se substrátem, inhibitorem nebo kofaktorem (Amersham biosciences, 2002).

Ligand je předem aktivován pomocí specifické látky, která určí jeho specifitu. Mezi nejčastěji používané patří kyanobromid, karbodiimid (Cammarata a kol., 2015), triazin (Prokhorov a kol., 2011), hydrát hydrazinu (Cheng a kol., 2007), epoxid (Giacometti a kol., 2013) nebo pomocí oxidace jodistanem či karbonylací vzniklé sloučeniny.

### 1.2.8.5 Imunoafinitní chromatografie

Imunoafinitní chromatografie je speciální druh afinitní chromatografie. Je založená na principu reakce protilátky s antigenem (Hennion a kol., 2003) Na interakci antigenu s protilátkou se podílí několik rozdílných typů nekovalentních vazeb. Jedná se o van der Waalsovy síly, hydrofobní reakce, vodíkové můstky a iontové interakce (Fitzgerald a kol., 2011). Při stanovení antigenu se na stacionární fázi váže specifická protilátka, naopak v případě stanovení protilátek je na stacionární fázi navázán specifický antigen. Směs látek, ve které se nachází hledaný antigen nebo protilátka, je nanášena do stacionární fáze. Hledaný antigen se díky vazbě antigen - protilátka zachytí na specifickou protilátku (obrázek 4), zbylé antigeny se vymytím odstraní. Hledaný antigen, který zůstal uchycený pomocí kovalentní vazby na specifické protilátce, je vymyt pomocí elučního pufru. Specificky sorbovaná látka se také může vymývat změnou podmínek, například přidávkem roztoku o odlišném pH, iontové síle, s vyšším obsahem volného ligandu nebo analogem sorbované látky. Po rozvolnění vazby pomocí určitého činidla, získáme hledaný antigen (Chase., 1984).



Obrázek 4 Princip imunoafinitní chromatografie v kolonovém uspořádání (převzato od Juřena, 2013).

## 2 Metody založené na reakci antigenu s protilátkou

Obecně jsou imunochemické reakce založeny na reakci antigenu s vazebnými místy specifické protilátky. Při této reakci vzniká tzv. imunokomplex, který můžeme vizualizovat buď pomocí následné reakce, jako je aglutinace, precipitace a monitorovat pomocí turbidimetrie či nefelometrie nebo lze využít tzv. indikátorů poskytujících výsledek pomocí barevné změny, kdy je indikátorem enzym (EIA), luminiscenčního záření, kdy je indikátorem lumifor (LIA), detekce radioaktivity, kdy je indikátorem radioizotop (RIA). V dalších částech této práce se budu věnovat popisu metod využívající k detekci protilátku značenou indikátory.

### 2.1 Antigen

Antigen je makromolekula přirozeného původu nebo uměle vytvořená. Po chemické stránce jsou to různé polymery, např. proteiny, polypeptidy, polysacharidy nebo nukleoproteiny. Antigeny mají dvě základní vlastnosti. Zaprvé mají schopnost navodit specifickou imunitní odpověď, a to buněčného či protilátkového typu, zadruhé reagují specificky s produkty této odpovědi. Tyto dvě vlastnosti má komplexní antigen tzv. imunogen, který se skládá z makromolekulárního nosiče a antigenních determinant neboli epitopů vybraného antigenu. Antigenní determinanta je specifická pro každý antigen, charakterizuje jeho specifitu a jeho schopnost reagovat s určitým vazebným místem protilátky nebo antigenním receptorem na lymfocytech. Nízkomolekulární látky nejsou schopné navodit tvorbu protilátek, ale specificky reagují s produkty imunitní odpovědi a nazýváme je hapteny.

### 2.2 Protilátka

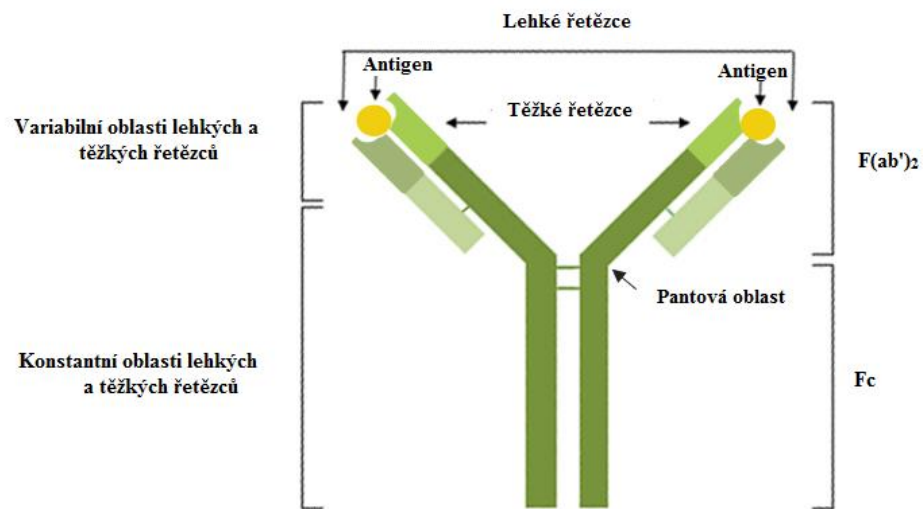
Protilátky jsou produkovány plazmatickými buňkami, které se diferencují z B-lymfocytů po stimulaci antigenem. Protilátky jsou skupina heterogenních glykoproteinů živočišného původu. Nazývají se imunoglobuliny (Ig). Molekula imunoglobulinu se skládá minimálně ze dvou identických těžkých a dvou identických lehkých polypeptidových řetězců vzájemně propojenými disulfidickými vazbami. Lehké řetězce určují typ imunoglobulinové molekuly a jsou dvojího typu  $\kappa$  a  $\lambda$ . Naopak těžké řetězce se vyskytují v pěti různých izotopech  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  a  $\delta$ , které určují třídu imunoglobulinů – IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.

#### 2.2.1 Protilátky třídy IgG

IgG je nejhojněji zastoupeným imunoglobulinem v séru (až 80%) a intersticiální tekutině. Je to monomer, obsahuje 2 identické těžké řetězce  $\gamma$ , které u člověka existují ve

čtyřech subtypech  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ . Tyto podtřídy se nazývají IgG 1 – IgG4, liší se malými detaily ve struktuře konstantních domén a počtem disulfidických můstků v pantové oblasti. Funkčně se jednotlivé subtypy odlišují schopností vázat C1 protein (aktivovat komplement).

V imunochromatografii se IgG využívají díky své jednoduchosti, snadné přípravě. Jednoduše na sebe váží nanočástice, které fungují jako značky. Struktura imunoglobulinu IgG znázorňuje obrázek 5.



Obrázek 5 Struktura imunoglobulinu IgG  
(převzato z Labguide, 2018)

### 2.2.2 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky se připravují pomocí imunizace zvířat (nejčastěji králíci, kozy, ovce) antigenem. Sérum imunizovaného zvířete, ve kterém jsou protilátky proti antigenu použitému k imunizaci, se označuje jako antisérum. Pokud bylo zvíře imunizováno pomocí jednoho antigenu, vytvářejí se monospecifické protilátky (antisérum). Každý epitop v molekule antigenu stimuluje na tvorbu protilátek aktivací klonů B-lymfocytů, dle specifity BcR receptorů. Specifita polyklonálních protilátek závisí na imunizačním protokolu, ve které fázi jsou protilátky ze zvířete získávány.

### 2.2.3 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou vyrobeny z jednoho klonu plazmatických buněk odvozených od B-lymfocytů a jsou připravené v laboratorních podmínkách pomocí hybridomové technologie. Podstatou této technologie je buněčná fúze nádorových buněk

s lymfocyty sleziny již imunizovaných myší. Monoklonální protilátky působí proti jednomu epitopu určitého antigenu a jsou to takové identické kopie molekul imunoglobulinů, které mají stejné specifické vazebné místo a stejnou primární strukturu.

## 2.3 Indikátory imunochemických metod

Indikátory neboli značky jsou látky, které jsou navázány na jednu komponentu reakce, může to být značená protilátka nebo značený antigen. Slouží ke kvalitativnímu stanovení nebo také u některých testů se využívá pro kvantitativní stanovení. Mezi prvními používanými indikátory byly substance značené radionuklidem. Později byly ke značení využívány i neradioaktivní indikátory. Nejpoužívanější jsou především enzymy, látky s fluorescenční nebo luminiscenční povahou, enzymy, které pomáhají vzniku látek způsobující luminiscenci.

Další možností pro viditelnost výsledků se mohou využít barevné značky ve formě nanočástic o velikosti řádu desítek nm. Nejrozšířenější je značení koloidním zlatem (Kato a kol., 2016; Gao a kol., 2014). Kromě nanočástic zlata se používají nanočástice uhlíku, v menším počtu pak latexové nanočástice (Wang a kol., 2017), dále liposomy s fluorescenční nebo bioluminiscenční značkou (Posthuma-Trumpie a kol., 2009; Bai a kol., 2015), nanočástice selenu (Lou a kol., 1993) nebo silikátové nanočástice s chelátem europia (Ngom a kol., 2010) a jiné.

### 2.3.1 Enzymy

Nejpoužívanějšími enzymy v roli indikátorů jsou peroxidáza a alkalická fosfatáza, méně často se používá glukozaoxidáza,  $\beta$ -D-galaktosidáza a malátdehydrogenáza. Jako chromogenní substráty pro fotometrii se používají například 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), *ortho*-fenylendiamin, *ortho*-toluidin, *ortho*-dianisidin. Detekce enzymatických imunoanalýz nejčastěji probíhá fotometricky, méně často se pak používá luminometrická detekce (Chromý a Bittová., 2011).

### 2.3.2 Zlaté nanočástice

Koloidní zlaté částice se používají více jak stovky let k barvení hedvábí a skla, ve středověké medicíně sloužily pro diagnózu syfilis a v moderní době se také využívají například v nelineární optice. Předností zlata je jeho stabilita, je nejstabilnější ze všech známých koloidů. V posledních několika letech se nanočástice zlata začaly uplatňovat

v imunochémii jako značení proteinových molekul například protilátek, části buněk nebo mikroorganismů nebo nukleových kyselin. Využívá se hydrofobní interakce mezi molekulou proteinu či nukleové kyseliny a nanočástic zлата (Seydack, 2005). Nejvíce úspěšné se ukázaly částice o velikosti mezi 10-40 nm (Švorčík a kol., 2011). Nejpoužívanější průměr nanočástic používaných v imunochémických testech je 40 nm. Zlaté nanočástice mají i další přednosti. Na rozdíl od mnoha organických barviv nepodléhají rozkladným procesům účinkem světla, jejich aplikace je snadná, jsou dlouhodobě stabilní při skladování v suchu a při 4°C, nejsou toxické a jsou komerčně dostupné (Posthuma-Trumpie a kol., 2009).

### **2.3.3 Nanočástice uhlíku**

Nanočástice uhlíku mají vyšší barevnou intenzitu než zlaté nanočástice. Jsou stabilní a jde je vyrobit v potřebné velikosti (Blažková a kol., 2010). Dnes se tyto nanočástice připravují nejčastěji z přírodního uhlíku v prostředí peroxidu vodíku pomocí ultrazvuku (Li a kol., 2011).

### **2.3.4 Latexové nanočástice**

Latexové nanočástice jsou v dnešní době často používané díky své nízké ceně a dobré konjugaci. Mohou být vyrobeny tak, aby obsahovaly různé druhy barev, fluorescenční barviva, nebo také paramagnetická média. Další velkou výhodou je možnost vyrobit latexové částice s několika vlastnostmi, např. obsahují fluoreskující částice, které jsou navíc také obarveny (Wong a kol., 2009).

### **2.3.5 Liposomy**

Liposomy jsou díky své velikosti a hydrofobnímu a hydrofilnímu charakteru se používají zejména při poskytování léků. Vlastnosti liposomu se značně liší podle složení lipidů, velikosti, povrchovým nábojem a způsobem přípravy. Jsou velmi stabilní a jejich velký vnitřní objem zajišťuje interakci s protilátkami, hormony, peptidy a nukleové kyseliny. Díky těmto vlastnostem se liposomy mohou používat v terénu nebo v tzv. „point of care“ testech. Jejich nevýhodou je slabost vůči detergentům a změně pH. Liposomy jsou schopné v sobě zapouzdřit miliony molekul barviva, díky tomu mohou produkovat velmi intenzivní signál. V dnešní době se také využívá fluorescenční značení, které má patnáctkrát lepší signál než vizuální detekce (Bahadır a kol., 2016).



### **2.3.6 Nanočástice selenu**

Nanočástice selenu jsou vyráběny z kyseliny selenové a kyseliny askorbové. Jejich výhodou je krátká doba přípravy, průhlednost a přirozeně výrazná oranžová barva (Wang a kol., 2014).

### **2.3.7 Silikátové nanočástice s chelátem europia**

Silikátové nanočástice s chelátem europia se dobře váží na protilátky. Díky tomu se mohou vyvíjet jednodušší testy pro „screening“, ale i kvantitativní a citlivější testy (Xia a kol., 2008).

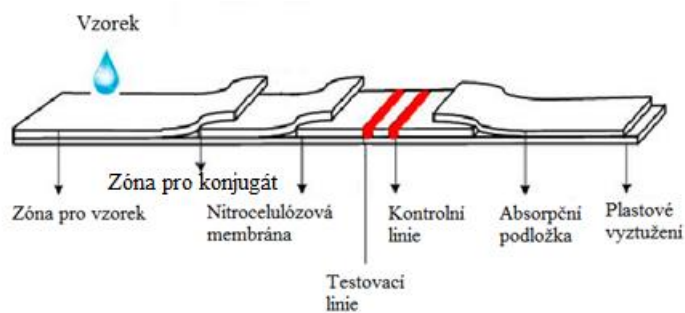
### 3 IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ STRIPOVÉ METODY

Imunochromatografické testy jsou založeny na nekovalentních interakcích protilátek a stanovovaného analytu. Historie imunochromatografických technik spadá již do dvacátých let minulého století. V dnešní době se využívají hlavně k detekci nízkomolekulárních nebo vysokomolekulárních látek, bakteriálních buněk (Góselová a kol., 2014).

Tyto metody jsou velice oblíbené, jelikož mají řadu výhod, poskytují jednoduchou, rychlou a levnou detekci v jednom kroku, využívá se malý objem vzorku, dají se využít mimo laboratoř, vzorek se aplikuje přímo. Ale jako každá metoda mají i imunochromatografické metody své nevýhody, vyžadují kapalnou vzorek, umožňují pouze semikvantitativní a kvalitativní detekci, v některých případech je nutná předběžná úprava vzorku, která může být časově náročná. Doba analýzy závisí na povaze samotného vzorku, na jeho viskozitě a povrchovém napětí. Základem testu je stripový proužek o další funkční části, které zajišťují správnou aplikaci vzorku a provedení celého testu včetně odečtení výsledků (Góselová a kol., 2014; Sajid a kol., 2015).

#### 3.1 Základní součásti stripového testu

Schéma imunochromatografického testu je znázorněné na Obrázek 66. Základní testovací proužek obsahuje membránu a tři podložky, které jsou vyrobeny z porézních materiálů. Na začátku testu se nachází tzv. zóna pro vzorek, která slouží k nanesení kapalného vzorku. Dalšími nezbytnými součástmi jsou zóna pro konjugát, membrána a adsorpční podložka. Membrána je jedna z nejdůležitějších částí testovacího proužku, na které je umístěna testovací a kontrolní linie, které obsahují imobilizované molekuly antigenu nebo specifické protilátky, případně aptamery reagující s kapalinou unášeným imunokomplexem analytu s konjugátem. Na konci testu se poté nachází adsorpční podložka, díky které dochází k urychlení toku analytu membránou (Góselová a kol., 2014; Posthuma-Trumpie a kol., 2009; Sajid a kol., 2015). Tyto části imunochromatografického testu budou blíže popsány v následující podkapitole 3.1.1.



Obrázek 6 Schéma imunochemického testu  
(upraveno dle Zhang a kol., 2018)

### 3.1.1 Membrána

Membrána je jedna z nejdůležitějších částí stripového testu. Velice často je vyráběna z nitrocelulózy (Paulini a kol., 2017; Shen a kol., 2010; Zhang a kol., 2018), ale využívají se i jiné polymerní materiály, jako je například polyethylen (Fernández-Sánchez a kol., 2005) či nylon (Lakner a kol., 1998; Jauset-Rubio a kol., 2016). Membrána je nejčastěji umístěna na plastovém vyztužení, jelikož výše zmíněné materiály jsou velmi křehké a tenké (Posthuma-Trumpie a kol., 2009). Pro výběr materiálu je důležitá jeho schopnost dobře vázat reagentie (protilátky, aptamery) a podstatná je i velikost jeho pórů, nejlépe 0,05 až 12 μm (Koets a kol., 2006). Materiál membrány rozhoduje o citlivosti daného imunochemického testu. Platí, že čím větší jsou membránové póry, tím dochází k většímu rozšiřování testovací linie a snižuje se tak citlivost detekce (Göselová a kol., 2014; Sajid a kol., 2015). Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1, na membráně jsou umístěny další části, jimiž jsou zóna pro vzorek, zóna pro konjugát a absorpční podložka, které jsou popsány v následujících odstavcích.

Jako první část je označována zóna pro aplikaci vzorku. Nejčastěji je vyrobena z celulózy nebo skleněného vlákna. Funkcí této vrstvy je pomalé, nepřetržité přenášení vzorku homogenním způsobem do zóny pro konjugát. Tato část bývá v některých případech navržena tak, aby v ní docházelo i k předúpravě vzorku. Zóna pro aplikaci vzorku bývá nasycena látkami pro úpravu pH, solemi, proteiny i surfaktanty, které ovlivňují rychlost vzlínání analytu membránou, nebo tato zóna funguje díky pórům jako filtr, jenž odstraňuje hrubé částice ze vzorku (Göselová a kol., 2014; Sajid a kol., 2015; Wong a kol., 2005).

Zóna pro konjugát je nejčastěji tvořena ze skleněného vlákna, polyesteru nebo celulózy a obsahuje nasorbovaný, což je specifická protilátka (aptamer) značená indikátorem, např. latexovou částicí. Konjugát by měl být chemicky stabilní a měl by se uvolnit z místa

fixace až při reakci s kapalným vzorkem. Jakákoliv změna v uvolňování konjugátu může negativně ovlivnit výsledek testu (Sajid a kol., 2015, Wong a kol., 2005).

Absorpční podložka nasává kapalinu nanášeného vzorku a pomáhá udržovat průtok kapaliny přes membránu. Navíc zabraňuje zpětnému toku vzorku (Sajid a kol., 2015). Nejčastěji se používají celulóзовé filtry nebo adsorpční papíry (Kato a kol., 2016).

### **3.1.2 Indikátory**

Jakýkoli materiál, který se používá jako indikátor, tj. molekula generující signál by měl být detekovatelný při velmi nízkých koncentracích a měl by zachovat své vlastnosti i po konjugaci. Konjugací je myšlena vazba mezi molekulou indikátoru a molekulou specifické protilátky. Snadná konjugace a stabilita po delší stabilní období jsou žádoucími rysy dobrého indikátoru. Po dokončení testu některé značky sami generují přímý signál (barva z koloidního zlata), zatímco jiné vyžadují další kroky k vytvoření signálu (fluorescenční značky), (Sajid a kol., 2015).

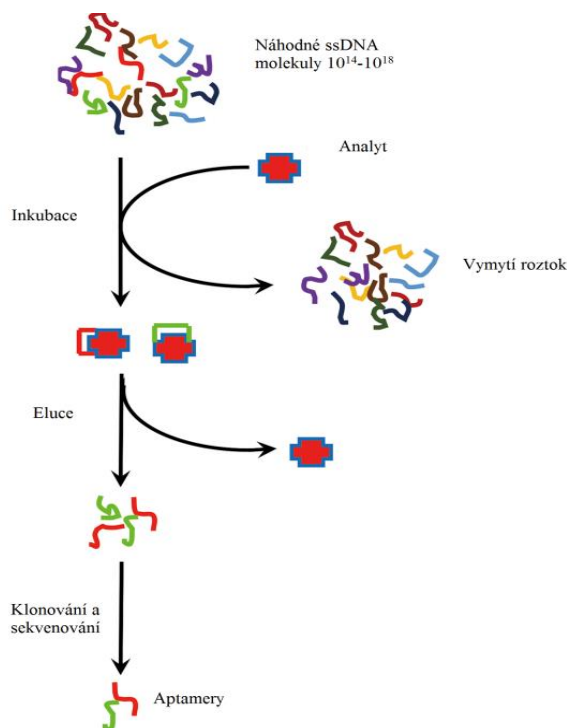
Seznam materiálů, které se používají jako indikátory v imunochromatografických stripových metodách je velice rozsáhlý. V testech se používají nejčastěji nanočástice zlata (Gao a kol., 2014), barevné latexové perličky (Wang a kol., 2016), uhlíkové nanočástice (Blažková a kol., 2010), nanočástice selenu (Huang a kol., 2016), kvantové tečky (Qi a kol., 2016) a fosfor (Hampl., 2001).

### **3.1.3 Reagencie**

Nejvýznamnější reagencie v imunochromatografických metodách jsou protilátky. Protilátky se používají biorekognitivní molekuly na testovacích a kontrolních liniích, váží se na cílový analyt pomocí imunochemických interakcí. Protilátky jsou v dnešní době k dispozici proti všem běžným klinickým analytům, ale také mohou být syntetizovány proti specifickým cílovým analytům. Protilátka, která váže specifický analyt, je známá jako primární protilátka. Tyto protilátky se obecně připravují se imunizací myši nebo potkanů pomocí specifických antigenů (Sajid a kol., 2015). Přednostně se pro imunochromatografické testy používají monoklonální protilátky připravené hybridomovou technologií (viz. kap. 2.2.3)

Další používanou reagentií jsou aptamery. Aptamery jsou uměle nasyntetizované nukleové kyseliny. Mají silnou vazbu a selektivně reagují s cílovými analyty. Jsou upřednostňovány před protilátkami díky mnoha vlastnostem, které zahrnují snadný výrobní proces (Obrázek 77), jednoduché strukturní modifikace, bezkonkurenční stabilitu,

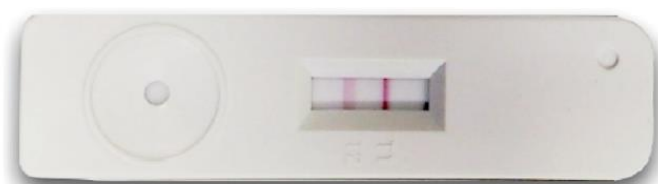
reprodukovatelnost a všestrannou aplikaci (Chen a kol., 2015). Aptamery stejně jako protilátky mohou být použity sendvičovém (pro stanovení thrombinu (Xu a kol., 2009)) i v kompetitivním uspořádání (aflatoxinu B<sub>1</sub> (Shim a kol., 2014)).



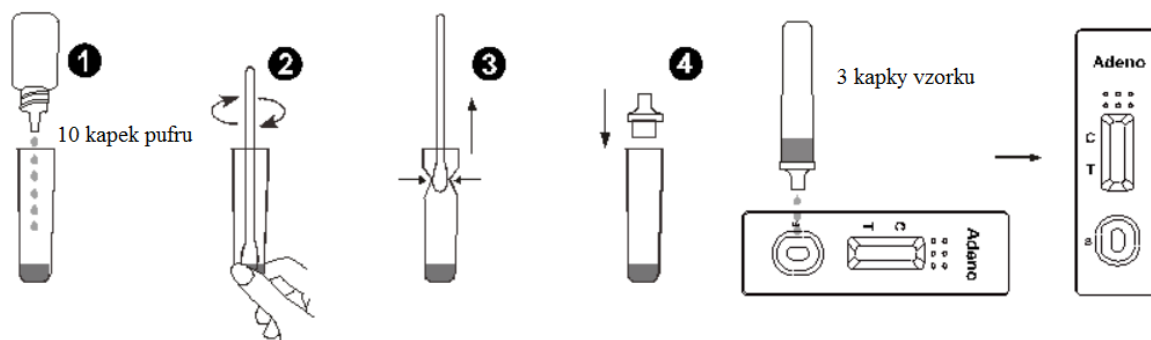
Obrázek 7 Výroba specifického aptameru  
(upraveno dle Chen a kol., 2015)

### 3.1.4 Plastové ochranné pouzdro pro uložení stripových proužků

Celý systém může být, zejména pro komerční účely, uložen v plastovém krytu (Obrázek 88), který má otvory pouze pro aplikaci vzorku a vizuální kontrolu testovací a kontrolní linie. Tento obal má za úkol, aby membrána a reagující složky testu zůstaly nepoškozené a chráněny. Na rozdíl od stripových testů, které se nejčastěji ponořují do vzorku (Sakamoto a kol., 2016; Wang a kol., 2016) je v tomto případě vzorek nakape pipetou, nebo pomocí speciálního kapátka (Obrázek 99).



Obrázek 8 Ukázka plastového pouzdra  
(převzato od Kato a kol., 2016)



Obrázek 9 Příklad speciální úpravy před použitím testu  
(upraveno dle Hangzhou, 2018)

## 3.2 Uspořádání testů a jejich dělení

### 3.2.1 Využití imunochromatografických testů v praxi

Imunochromatografické testy jsi díky své jednoduchosti a rychlosti získaly na oblíbenosti v mnoha oborech. Imunochromatografické testy jsou široce využívány v laboratořích pro detekci konkrétních tzv. nízko i vysokomolekulárních antigenů (Boisen a kol., 2015) nebo specifických protilátek (Nielsen a kol., 2008).

Různé druhy biologických vzorků mohou být testovány pomocí imunochromatografických testů, včetně slin (Carrio a kol., 2015), potu (De Giovanni a kol., 2013), plné krve a moči (Moreno a kol., 2015). Dále se testy využívají na vyšetření chorob u zvířat (Kim a kol., 2015), patogenů (Shukla a kol., 2014), toxinů (Shyu a kol., 2002) anebo pro kontrolu kvality potravin (Ching a kol., 2015).

### 3.2.2 Dělení imunochromatografických testů uspořádání

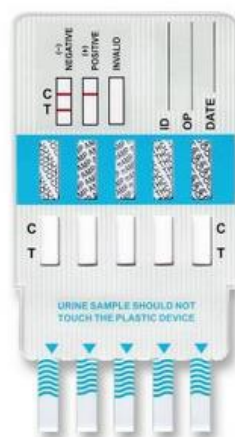
Imunochromatografické metody můžeme dělit do třech hlavních skupin dle uspořádání testu. První skupinou jsou samostatné tzv. „stripy“ (Obrázek 1010a) neboli proužky, které se nejčastěji používají v laboratořích, kde je kapalný vzorek po úpravě nanášen kapátkem. Další skupinou jsou kazetové (Obrázek 1010b) testy, které jsou určeny do prostředí hlavně mimo laboratoř, kdy je definovaný objem vzorku přímo aplikován na okénko určené k nanášení vzorku. A poslední skupinou jsou „midstream“ (Obrázek 1010c) testy, kde se strip částečně vložený do plastového pouzdra vkládá přímo do proudu moči.



Obrázek 10 Příklady uspořádání testu

a) stripový test b) midstream test c) kazetový test (Převzato z Clongene,2018)

Dále lze dělit testy podle počtu analytů, které lze v rámci jedné analýzy stanovit současně. Testy, které stanovují více analytů, mají uloženo v zóně pro konjugát více druhů protilátek, jejich výhodou je stejná spotřeba vzorku jako u normálního testu. Například stanovení třech různých antibiotik v mléce (Wang a kol., 2016) nebo třech různým toxinům v potravinách (Song a kol., 2014), Další možností je detekce více analytů v paralelně uspořádaných proužcích v jednom uzavřeném boxu viz obrázek 11. Aplikaci většího objemu vzorku získáme informaci o přítomnosti více analytů současně během jednoho měření.



Obrázek 11 Příklad paralelně uspořádaného boxu  
(převzato z Homehealthtesting,2018)

### 3.2.3 Třídění imunochromatografických testů dle stanovovaného analytu

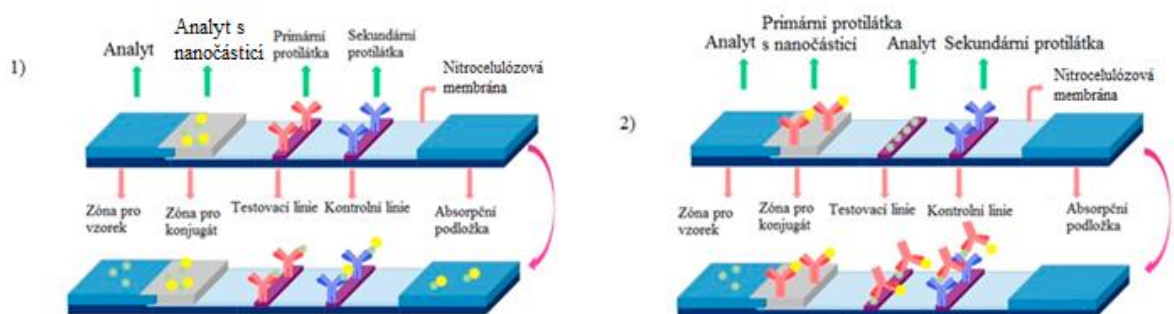
#### 3.2.3.1 Princip testu pro stanovení nízkomolekulárních látek

Pro stanovení látek, které mají nižší molekulovou hmotnost, se používá kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu. Do skupiny nízkomolekulárních látek se řadí např. léčiva, drogy nebo hormony. Na svém povrchu obsahují pouze jednu antigenní determinantu, tzv. epitop, schopný se vázat na vazebné místo protilátky, z tohoto důvodu není možné tzv. sendvičové uspořádání testu. Kompetitivní uspořádání testu se poté dělí na přímé a nepřímé (Obrázek 1212).

U prvního typu kompetitivního testu pro stanovení nízkomolekulárních látek je označený standardní antigen, který je obsažen v zóně pro konjugát. Tento označený antigen soupeří s analytem obsaženým ve vzorku o vazebná místa na primárních protilátkách, které jsou upevněné v testovací linii. Na kontrolní linii jsou poté ukotvené sekundární protilátky, které reagují pouze se značeným antigenem.

U druhého typu kompetitivního uspořádání testu pro stanovení nízkomolekulární látky je značená primární protilátka, která se nachází v zóně pro konjugát. Testovací linie obsahuje standardní značený antigen, který soupeří s antigenem ze vzorku o vazebné místo na protilátce. Z toho důvodu, pokud vzorek obsahuje stanovovaný antigen, vzniklý komplex stanovovaný antigen-značená protilátka se v testovací linii není schopen navázat. Kontrolní linie obsahuje imobilizované sekundární protilátky, které jsou schopny vázat primární značené protilátky.

Pokud je výsledek testu pozitivní, objeví se barevný proužek pouze na kontrolní linii, zatímco je-li výsledek testu negativní, objeví se zbarvení i na linii testovací (Bahadir a kol., 2016).

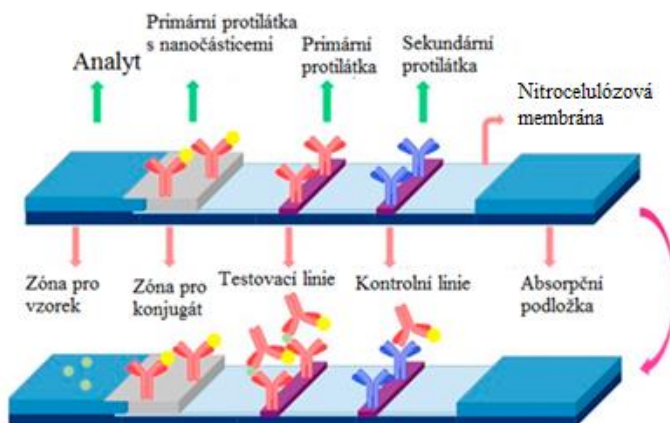


Obrázek 12 První a druhý typ kompetitivního uspořádání pro nízkomolekulární látky  
(upraveno dle Bahadir a kol., 2016)



### 3.2.3.2 Princip testu pro stanovení vysokomolekulárních látek

Pro stanovení vysokomolekulárních látek, které mají na rozdíl od nízkomolekulárních látek více antigenních míst, se používá sendvičové uspořádání imunochromatografických testů (Obrázek 133). Označená primární protilátka, tzv. konjugát je umístěna v zóně pro konjugát. Analyt ze vzorku reaguje s konjugátem (označená primární protilátka s indikátorem, např. latexová částice a poté reaguje vzniklý imunokomplex se specifickou protilátkou zakotvenou v testovací zóně, kde se nahromadí latexové nanočástice a vytváří okem viditelný proužek. Přebytek imunokomplexů analytu s konjugátem dosáhne postupným vsakováním kapaliny až do kontrolní zóny, pomocí absorpční podložky, kde se imunokomplexy zachytí pomocí specifických anti-IgG protilátek, vznikne okem viditelný proužek potvrzující správné provedení testu (Bahadir a kol., 2016).

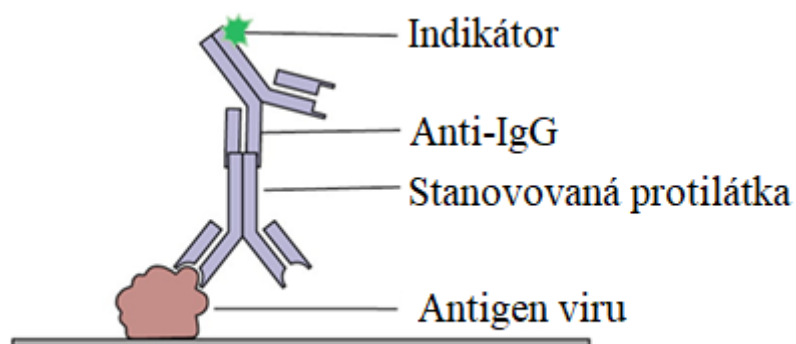


Obrázek 13 Sendvičové uspořádání testu  
(upraveno dle Bahadir a kol., 2016)

### 3.2.3.3 Princip testu pro stanovení specifických protilátek

Protílátky stejně jako vysokomolekulární látky mají více vazebných míst, proto na jejich stanovení můžeme využít sendvičové uspořádání testu. Kdy je v podložce pro konjugát umístěna značená primární protilátka proti protilátce ve vzorku, na testovací linii je upevněna buď primární protilátka nebo antigen (obrázek 14) a na testovací linii je upevněna sekundární protilátka proti primární protilátce. Pokud je stanovovaná protilátka ve vzorku váže se na ní značená primární protilátka a pak se váže v testovací linii na primární protilátku nebo antigen a tím vytváří zbarvení. Značená primární protilátka se dále váže na sekundární protilátku

v kontrolní linii a tím vytváří zbarvení. Pokud je vzorek negativní objeví se zbarvení pouze na kontrolní linii (Bahadir a kol., 2016).



Obrázek 14 Reakce stanovované protilátky v testovací linii  
(upraveno dle Fiksová, 2013)

## 4 PŘÍKLADY VYUŽITÍ IMUNOCHROMATOGRAFICKÝCH STRIPOVÝCH METOD

V dnešní době se imunochromatografické stripové metody využívají hlavně díky své rychlosti a nízké ceně. V této kapitole jsem popsal několik příkladů.

### 4.1 Potravinové testy

#### 4.1.1 Stanovení leptospermum v manuka medu

Med manuka je vytvářen z nektaru květiny balmín (obrázek 15), která roste na Novém Zélandu a v Austrálii. Tento med má antibakteriální účinky i proti patogenům, které jsou rezistentní vůči antibiotikům. Hlavní bakteriocidní složky v medu jsou methylglyoxal. Bylo zjištěno, že methylglyoxal, který je unikátní složkou manuka medu, je vzniká z dihydroxyacetonu při skladování za mírných podmínek. Obecně aldehydy, včetně methylglyoxalu, jsou známy díky své vysoké reaktivitě, která vypovídá o tom, že antibakteriální aktivita není během přepravy a skladování konstantní. Protože methylglyoxal je levně dostupný, může být přidáván i později do vzorku, a tím uměle lze navýšit antibakteriální aktivitu, proto je potřeba tento aldehyd identifikovat (Kato a kol., 2016).

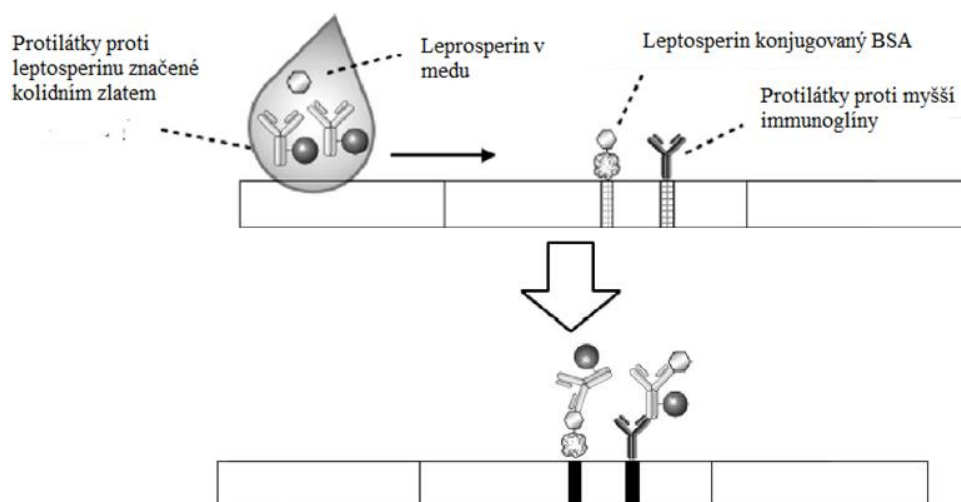
Nové studie popsaly nový glykosid v manuka medu známý jako leptosperin. Tento glykosid byl nalezen ve všech druzích balmínu. Je velice stabilní a dříve byl stanovován metodou HPLC (Kato a kol., 2016).



Obrázek 15 Květina balmín  
(dostupné z Dobbies, 2018)

Tato studie popisuje imunochromatografický test v kompetitivním uspořádání, který slouží k detekci leptosperinu. Testovací proužek byl připraven podle Obrázek 16. Leptosperin se smísí se specifickou protilátkou značenou koloidním zlatem za vzniku imunokomplexu, který dále putuje podél destičky do testovací linie, kde byl zakotven konjugovaný leptosperin konjugovaný s BSA (hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine), přebytečné imunokomplexy vzlínají dále do kontrolní linie, kde je zachytí protilátka namířená proti protilátce značené koloidním zlatem. Po odečtení výsledků a pomocí standardu se určila koncentrace leptosperinu ve vzorku (Kato a kol., 2016).

Ve srovnání s HPLC a ELISA metodou je tato imunochromatografická metoda výhodnější z hlediska časové náročnosti, ceny a technického provedení, ale na druhou stranu je limitována počtem vzorků. Tato metoda je vhodná pro měření leptosperinu v terénu, mimo laboratoř (Kato a kol., 2016).



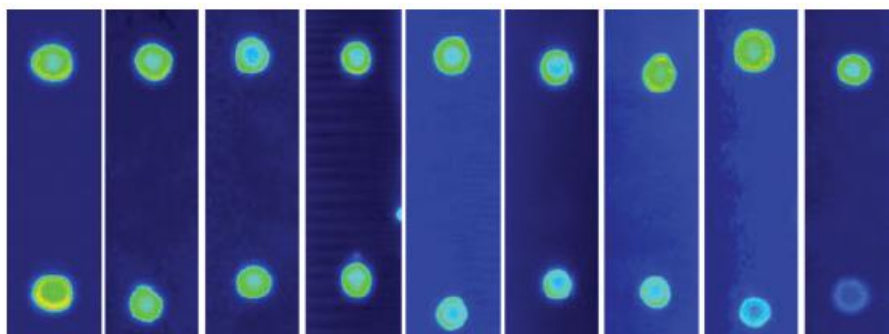
Obrázek 16 Struktura testovacího proužku  
(upraveno dle Kato a kol., 2016)

#### 4.1.2 Stanovení chloramfenikolu v kuřecím mase pomocí fluorescenční imunochromatografie

Veterinářská antibiotika se často používají u zvířat pro podporu růstu a jako prevence proti onemocnění. Avšak vylučování antibiotik do prostředí a výskyt reziduí antibiotik v potravinách vyvolává otázky ohledně jejich bezpečnosti, protože jejich konzumace může u lidí způsobit zvýšenou odolnost vůči působení antibiotikům nebo mohou vyvolat nežádoucí účinky u lidí. Chloramfenikol (CAP) je antibiotikum, které navázáním na prokaryotické ribosomální peptidické vazby může inhibovat translaci mRNA do pořadí aminokyselin

v bílkovině. Ačkoliv je toto antibiotikum účinným antimikrobiálním lékem, jeho zbytky (rezidua) v potravě způsobují u lidí několik vedlejších účinků, jako je například aplastická anémie, leukémie nebo syndrom šedých dětí (Bai a kol., 2015).

Pro stanovení chloramfenikolu je potřeba citlivá a přesná detekce pomocí metod jako je plynová chromatografie, kapalinová chromatografie nebo plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Tyto testy jsou časově náročné, vyžadují speciální vybavení a pro obsluhu dobře vyškolený personál. Imunologické testy byly vždy používány pro detekci CAP, včetně ELISA metody a imunochromatografických testů využívající koloidní zlato pro značení. ELISA metoda je nákladná a má dlouhou časovou prodlevu. Imunochromatografie poskytuje pouze semikvantitativní výsledky. V dnešní době se používá imunochromatografie s fluorescenční detekcí, viz Obrázek 177. Tento test je založen principu chromatografie a pomocí skeneru s mikročipem se měří fluorescence. Výhodou této metody je, že se nemusí provádět žádné promývací kroky a je proto vhodná pro analýzu reziduí antibiotik ve vzorcích. Díky detekci pomocí čtečky je zaznamenána i malá změna fluorescence (Bai a kol., 2015).

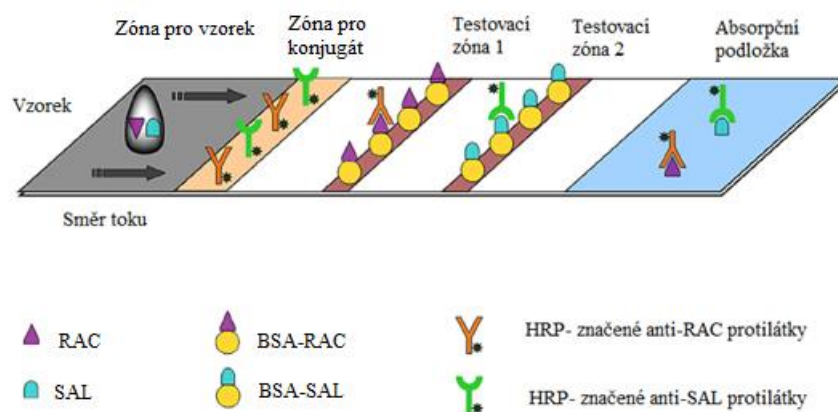


Obrázek 17 Kalibrační řada ukazující závislost fluorescence na koncentraci CAP  
(převzato z Bai a kol., 2015)

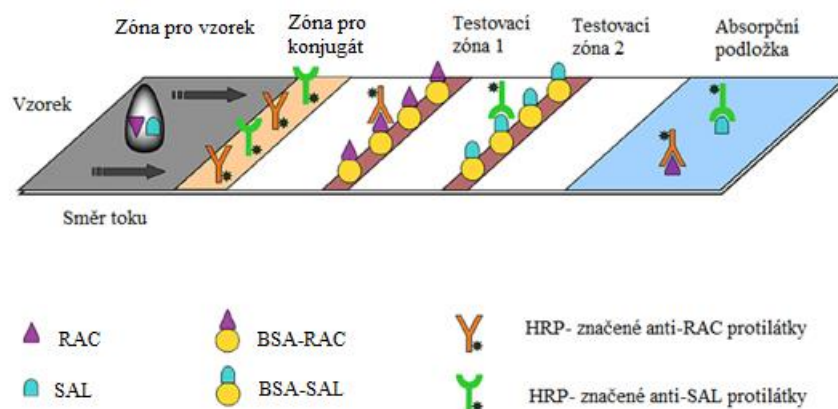
#### 4.1.3 Stanovení $\beta_2$ - antagonistů

$\beta_2$ -antagonisté patřící mezi  $\beta$ -blokátory se podávají zvířatům pro snížení ukládání tuků, zvýšení tuků, zvýšení syntézy proteinů, díky tomu se u zvířat vytváří libové maso. Bylo prokázáno, že dlouhodobé podávání nebo vysoká dávka  $\beta_2$ - antagonistů je nebezpečná pro lidské zdraví. Podle

Podle výzkumu (Gao a kol., 2014) byl připraven testovací proužek (



Obrázek 188) na nitrocelulózové membráně. Test byl založen na kompetitivním uspořádání testu. Vzorek obsahoval tyto dva  $\beta_2$ - antagonisty – ractopamin (RAC) a salbutamol (SAL). Během pohybu podél proužku reagovaly s protilátkami značenými křenuvou peroxidázou namířených proti RAC a proti SAL protilátkám. Vzniklé imunokomplexy postupovaly dále až na testovací linii 1. V této zóně 1 se zachytil přebytek nenavázaných RAC na HRP-značených anti-RAC mAb s RAC-BSA (BSA hovězí sérový albumin). Poté tekutina vzlínala k testovací linii 2, kde reagovaly nenavázané SAL na HRP-značených anti-SAL mAb s SAL-BSA. Po těchto kompetitivních imunitních reakcích byl testovací proužek připraven chemiluminiscenční detekci. Koncentrace RAC a SAL byla měřena pomocí intenzity záření v testovacích liniích 1 a 2 (Gao a kol., 2014).



Obrázek 18 Struktura testovacího proužku  
(upraveno dle z Gao a kol., 2014)

Tento imunochromatografický test byl navržen pro rychlé stanovení RAC a SAL během 20 minut. Ve srovnání s testy, které využívají principu koloidního zlata, vykazuje tato

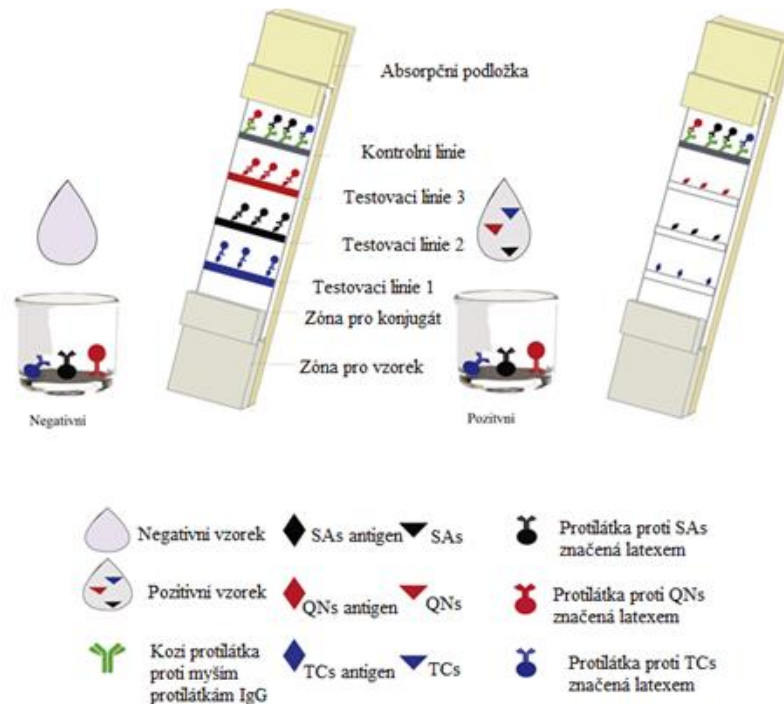
metoda vyšší citlivost v důsledku uplatnění chemiluminiscenční detekce. Tento test má výhodu stanovení dvou látek současně, proto se zkracuje doba analýzy a snižují se náklady (Gao a kol., 2014).

#### **4.1.4 Multiplexové stanovení více antibiotik v mléce**

Rezidua antibiotik se vyskytují v živočišných produktech nesprávným používáním antibiotik při léčbě chorob nebo jako růstový přípravek při nadměrném použití u zvířat. Tyto antibiotika mohou mít vliv ekosystém a mohou ohrozit veřejné zdraví. Sulfoamidy (SAs), chinolony (QNs) a tetracykliny (TCs) jsou široce používané při chovu zvířat, kvůli jejich širokospektrálním antibakteriálním vlastnostem. Při použití bez dodržování pokynů se tato antibiotika mohou hromadit v potravinách živočišného původu. Přítomnost těchto reziduí v mléce může mít nežádoucí účinky u lidí, včetně alergických reakcí a intoxikace. Největším problémem je však to, že toto mléko obsahuje patogeny odolné právě proti těmto antibiotikům (Wang a kol., 2016).

Testovací proužek (Obrázek 199) byl vytvořen z nitrocelulózové membrány, a na tři místa byly nanášeny protilátky proti sulfonamidům, chinonům a tetracyklinům. Na kontrolní linii byly nanášeny kozí protilátky proti myším protilátkám IgG. Pomocí tohoto testu můžeme stanovit tři druhy antibiotik naráz (obrázek 19), navíc je test velice ekonomický a velice citlivý (Wang a kol., 2016).





| AI       | SAs      | QNs      | TCs      | SAs, QNs | SAs, TCs | QNs, TCs | AI       |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Negative | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive |
|          |          |          |          |          |          |          |          |
| C line   |          |          |          |          |          |          |          |
| QNs line |          |          |          |          |          |          |          |
| SAs line |          |          |          |          |          |          |          |
| TCs line |          |          |          |          |          |          |          |

Obrázek 19 Struktura testovacího proužku a ukázka možného výsledku

SAs, sulfoamidyl ; QNs, chinolony; TCs, tetracykliny C linie, kontrolní linie;(upraveno dle Wang a kol., 2016)

## 4.2 Příklady klinických testů

### 4.2.1 Imunochromatografický test pro stanovení $\alpha$ -fetoproteinu

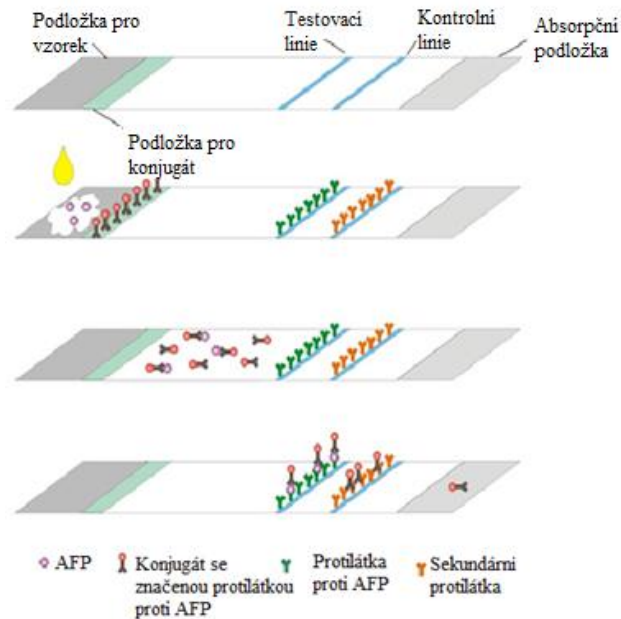
$\alpha$ -Fetoprotein (AFP), je důležitý pro diagnostiku primárního karcinomu jater, proto je potřeba kvalitní a přesné stanovení i stopového množství této látky v organismu (Yang a kol., 2011).

Kvantové tečky jsou v dnešní době považovány za slibné fluorescenční sondy vzhledem k jejich jedinečným vlastnostem (např. široká adsorpce, úzké a symetrické fotoluminiscenční spektra, silná luminiscence a fotostabilita), (Yang a kol., 2011).

Test pro stanovení  $\alpha$ -fetoproteinu je založen na sendvičovém uspořádání. Je tvořen nitrocelulózovou membránou a obsahuje myší monoklonální protilátky, na kterých



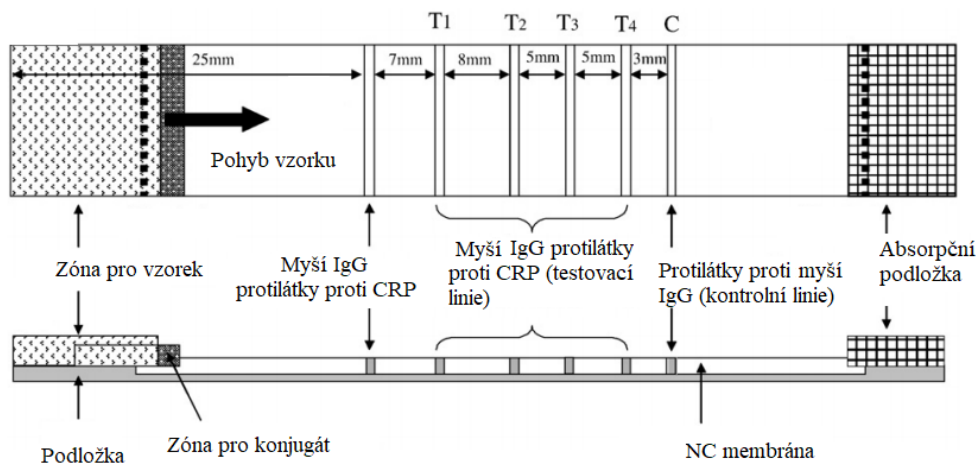
jsou navázány protilátky proti AFP (obrázek 20). Ke kvantitativní analýze byl použit skener. Hodnota intenzity záření je úměrná koncentraci AFP ve vzorku (Yang a kol., 2011).



Obrázek 20 Struktura testu pro stanovení AFP  
(upraveno dle Yang a kol., 2011)

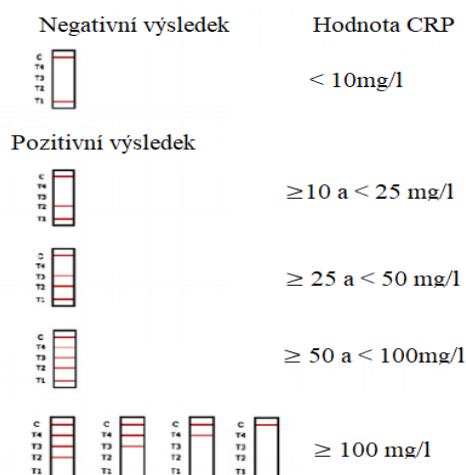
#### 4.2.2 Imunochromatografický semikvantitativní test pro detekci C-reaktivního proteinu při rozlišování bakteriální a virové infekce

C-reaktivní protein (CRP) je plazmatický protein akutní fáze známý několik desetiletí jak nespecifický, ale citlivý zánětlivý marker. U zdravých lidí se vyskytuje ve velmi nízké koncentraci pod 2 mg/l, ale během zánětlivého procesu bakteriální infekce se CRP výrazně zvyšuje. Naopak u virových infekcí se hodnota CRP zvedne jen o pár mg/l. Díky tomu je možné určit, zdali se jedná o virovou či bakteriální infekci (Leung a kol., 2008).



Obrázek 21 Schématické znázornění stripového testu pro stanovení C-reaktivního proteinu (upraveno dle Leung a kol., 2008)

Test byl připraven dle následujícího obrázku a je založen na sendvičovém uspořádání (obrázek 21). CRP ve vzorku se spojí s myší protilátkou proti CRP, která je označena zlatými nanočásticemi. Vzorek postupuje podél nitrocelulóзовé membrány a zachytává se na linii protilátek proti CRP. Pokud je vzorek pozitivní na zánět, všechna vazebná místa se obsadí a nadbytek značených protilátek s navázaným CRP pokračují k testovacím liniím. Podle červených proužků (obrázek 22) určíme semikvantitativní koncentraci ve vzorku (Leung a kol., 2008).



Obrázek 22 Ukázka výsledku testu a zbarvení závislé na koncentraci (upraveno dle Leung a kol., 2008)

### **4.3 Příklady toxikologických testů**

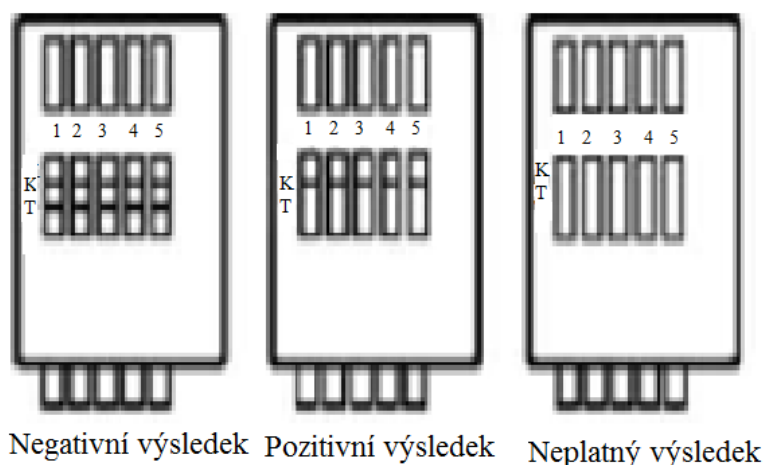
#### **4.3.1 Stanovení toxinu produkovaného řasou *Alexandrium minutum* pomocí paramagnetického proužku**

Toxický vodní květ je díky globálnímu oteplování a lodní dopravě rozšířený i mimo své přirozené prostředí. Tato rostlina ničí ekosystém, rybolov i turismus. Detekce této rostliny se stala úkolem ze zdravotnického i ekonomického hlediska. Jedna z nejvíce kritických a rozšířených otrav je otrava měkkýšů, na kterých vodní květ parazituje a vyvolá u nich paralytickou otravou (Gas a kol., 2016).

Základ testovacího proužku tvoří nitrocelulózová membrána. Vzorek se před nanesením na testovací proužek smíchá s protilátkami AM16 a následně se inkubuje při teplotě 37°C po dobu jedné hodiny. Po inkubaci se směs nanáší na proužek, kde je v testovací zóně zachycena testovaná řasa *A. minutum* protilátkami AM12 za vzniku hnědého komplexu. Výhodou je, že protilátka AM12 a AM16 využívají jiný epitop na mikrořase. Díky použité paramagnetické metodě je možné odečítat výsledek pomocí specifické magnetické čtečky i při nízkých koncentracích (Gas a kol., 2016).

#### **4.3.2 Stanovení marihuany, kokainu, opiátů, metamfetaminu a amfetaminu pomocí multi screeningového testu**

Tento test je založen na paralelním stanovení více analytů v jednom okamžiku. Test stanovuje pět odlišných typů drog. Na testovacích liniích byly ukotveny protilátky proti stanovovaným typům drog. Tento test je založen na kompetitivním uspořádání, pokud je tedy výsledek pozitivní soutěží stanovovaná látka o místo s konjugátem označeného antigenu a nevzniká barevný proužek na testovací linii (obrázek 23)(Medimpex, 2018).

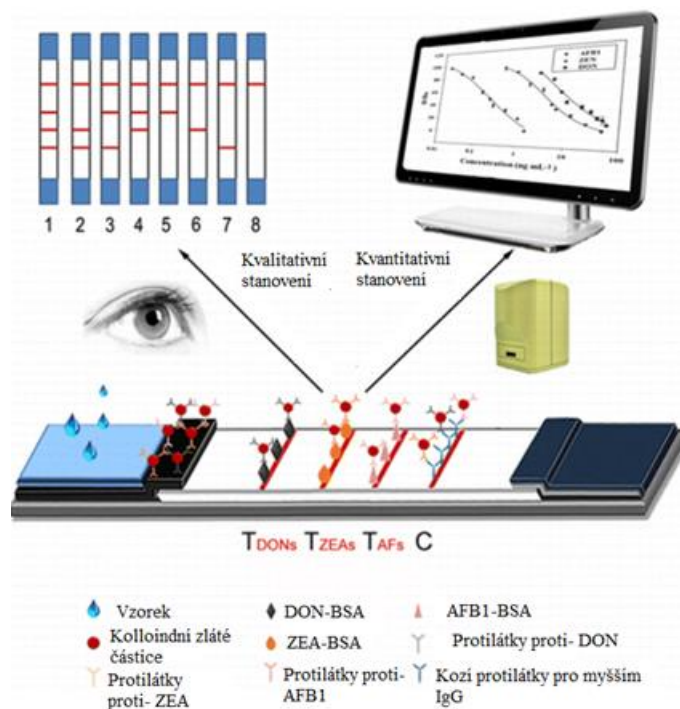


Obrázek 23 Příklady výsledků multi screeningového testu na drogy  
(upraveno dle Medimpex, 2018)

### 4.3.3 Stanovení mykotoxinů v potravinách

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity, které jsou produkovány mnoha druhy invazivních vláknitých hub, jež se usazují za příznivých podmínek a vlhkosti na obilovinách, jako je kukuřice, pšenice nebo rýže. Hlavním problémem mykotoxinu jsou jeho karcinogenní, nefrotoxické, hepatotoxické, neurotoxické, mutagenní, estrogenní a imunosupresivní účinky. Mezi mykotoxiny, které se objevily u obilovin a od nich odvozených produktů, byly aflatoxiny, zearalenon a příbuzné sloučeniny, stejně tak deoxynivalenol a jemu příbuzné sloučeniny. Aflatoxiny, nejčastěji B1 (AFB1), jsou běžně produkovány aspergilem, zatímco zearalenon (ZEA) a deoxynivalenol (DON) jsou produkovány hlavně fusariumem. Zearalenon a jeho metabolity jsou podezřelé jako spouštěcí faktory pro předčasnou pubertu u žen v USA a byly také hlášeny karcinogenní příznaky a reprodukční toxicita. Naopak požití velké dávky deoxynivalenolu způsobuje akutní gastroenteritidu. Nízká dávka zhoršuje růst i změnu imunitní funkce. Aflatoxiny jsou nejvíce toxické ze všech těchto mykotoxinů, díky tomu jsou silnými činiteli podporující rozvoj rakoviny, nejčastěji způsobují jaterní cirhózu nebo primární karcinomy jater. Proto bylo potřebné vytvořit rychlý a přesný test, který by tyto látky stanovoval (Song a kol. 2014).

Song a kol. (2014) připravili imunochromatografický test, který dokáže pomocí tří monoklonálních protilátek stanovit simultánně všechny tři výše zmíněné toxiny Obrázek 244. K sestavení testu využili nitrocelulózovou membránu, na kterou nanесли jednotlivé protilátky a jako kontrolu použili kozí protilátky proti myším IgG.

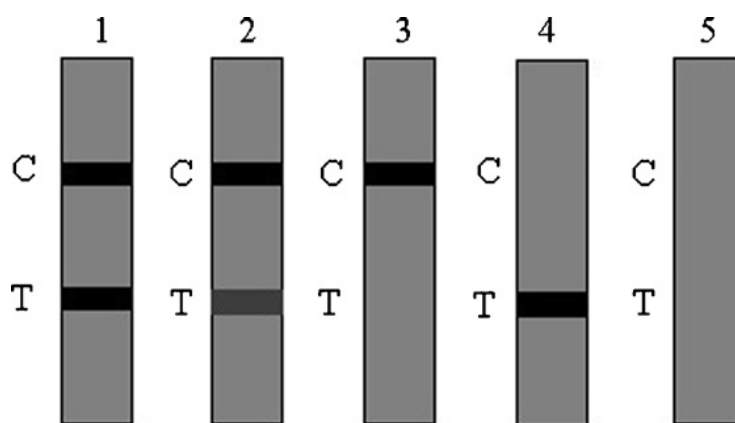


Obrázek 24 Struktura testovacího proužku pro stanovení mykotoxinů AFB1, aflatoxin B1; ZEA, zearalenon; DON, deoxynivalenol; BSA, hovězí sérový albumin (upraveno dle Song a kol., 2014)

#### 4.3.4 Stanovení brevetoxinu v rybách pomocí imunochromatografického testu značeného koloidním zlatem

Brevetoxin je silný neurotoxin produkovaný červeným planktonem *Karenia brevis* z řádu obrněnek. Je zapojen do úmrtí milionu ryb a má potenciál způsobit otravu člověka. Konzumace měkkýšů kontaminovaných brevetoxinem vede k těžkým formám otravy z jídla (Zhou a kol., 2016).

Základem testovacího proužku je nitrocelulósová membrána. Na kontrolní linii byla nanesena kozí protilátka proti myším IgG a na testovací linii byl nanesen konjugát toxinu a kravského albuminu (Zhou a kol., 2016).



Obrázek 25 Vyhodnocení výsledků pro stanovení brevetoxinu

C, kontrolní linie; T; testovací linie; 1 negativní výsledek testu, barva proužku u testovací linie je stejná jako kontrolní linie; 2 pozitivní výsledek testu, barva testovací linie je slabší než testovací; 3 pozitivní výsledek, koncentrace toxinu ve vzorku byla vysoká, proto došlo k neutralizaci veškerého konjugátu; 4 a 5 jsou neplatné výsledky testu (převzato z Zhou a kol., 2016)

Tento test je pouze semikvantitativní a určuje pouze, zda vzorek dosáhl limitní hranice nebo ne (obrázek 25). Testem se dá stanovit přítomnost analytu vyskytující se v koncentračním rozmezí od 1 do 4000 ng . ml<sup>-1</sup> (Zhou a kol., 2016).

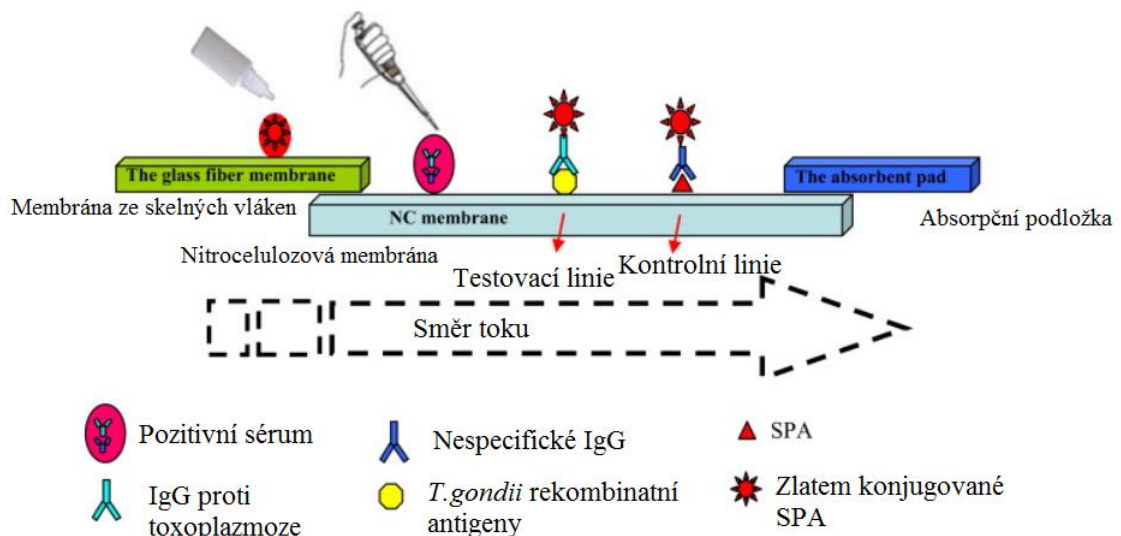
#### 4.4 Příklady imunochromatografických testů používaných ve veterinární medicíně

##### 4.4.1 Stanovení *Toxoplasma gondii* u psů a koček pomocí zlatých nanočástic

Toxoplazmóza je celosvětově rozšířená nemoc způsobena *Toxoplasma gondii*, parazitem infikující páteř hostitele, včetně lidí. Pro stanovení se často používá několik standardizovaných sérologických metod. Mezi ně patří hemaglutinační testy, latexové aglutinační testy a metoda ELISA. Nicméně, tyto testy jsou časově náročné, vyžadují drahé přístroje a velmi dobře vyškolený personál. Proto se imunochromatografické testy staly běžně používanými diagnostickými metodami pro stanovení toxoplazmózy. Většina metod používá zlaté nanočástice pro barevnou detekci. Protilátky upevněné na povrchu zlatých nanočástic mají dlouhou trvanlivost a stabilitu v kapalně i pevné formě. Většina studií použila pro úspěšnou detekci výše zmíněný způsob stanovení, některé se však zaměřily na detekci protilátek proti *Toxoplasma gondii* (Jiang a kol., 2015).

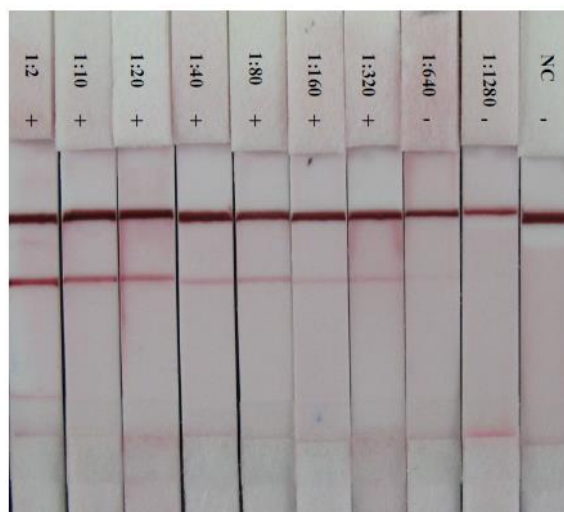
Test funguje na sendvičovém formátu. Testovací proužek byl připraven z nitrocelulózy membrány, membrány ze skelných vláken a absorpční podložky. Na testovací část byly připraveny antigeny *T. gondii* a na kontrolní linii stafylokokový protein A

(SPA). Během testování byly nejprve nadávkovány zlaté nanočástice konjugované se stafylokokovým proteinem A a poté byl aplikován vzorek podle Obrázek 2626 (Jiang a kol., 2015).



Obrázek 26 Struktura testovacího proužku pro stanovení *Toxoplasma gondii* SPA; stafylokokový protein A (upraveno dle Jiang a kol., 2015)

Citlivost metody je velice vysoká, srovnatelná s metodou ELISA. Jak je vidět na Obrázek 2727, čím menší je koncentrace *T. gondii*, tím klesá zbarvení proužku (Jiang a kol., 2015).



Obrázek 27 Klesající zbarvení v závislosti na koncentraci *T. gondii* v ředěných vzorcích vzorku (převzato z Jiang a kol., 2015)

## **4.5 Příklady imunochromatografických testů používaných v mikrobiologii**

V dnešní době existuje celá řada testů pro stanovení celé škály patogenních bakterií, původců onemocnění, průkaz specifických protilátek v infektologii, průkaz toxinů produkovaných patogenními mikroorganismy.

### **4.5.1 Stanovení antigenů *Mycobacterium tuberculosis***

Tuberkulóza zůstává hlavním zdravotním problémem ve většině rozvojových zemí. Rychlá a senzitivní detekce tuberkulózy a jejího původce bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, je důležitá pro prevenci, diagnostiku a následnou léčbu tohoto onemocnění. Významné pro detekci jsou proteiny, které *Mycobacterium tuberculosis* vylučuje. Jedná se o Mpt64, ESAT6, CFP 10 a antigen 85 (Bekmurzayeva a kol., 2013).

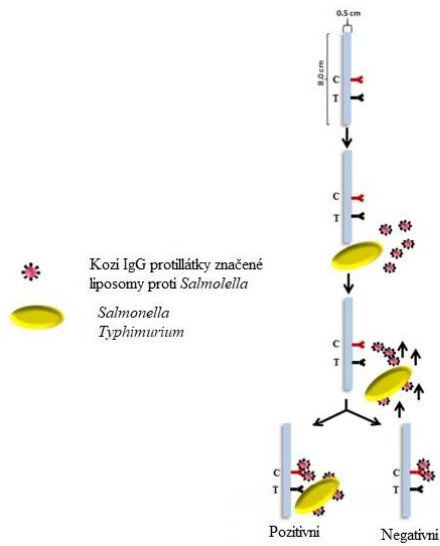
Stanovení pomocí imunochromatografických testů se dá použít k detekci jednoho nebo více antigenů nebo protilátek proti *Mycobacterium tuberculosis*. Testované vzorky (nejčastěji krev nebo bakteriální kultury) reagují v jednoduchých testech a pozitivní reakce je znázorněna pomocí barevných čar. V dnešní době jsou nejčastěji používané testy, pomocí kterých se stanovují protilátky třídy IgG a IgM proti antigenům tuberkulózy. Vyvíjí se nové testy, které jsou založeny na detekci Mpt64. Tyto testy jsou schopné rozlišit *Mycobacterium tuberculosis*, které tuberkulózu nezpůsobují. Mají vysokou senzitivitu a specifitu (kolem 98%), jsou levné a u připravených vzorků je výsledek možné odečíst ihned po 15 minutách (Bekmurzayeva a kol., 2013).

### **4.5.2 Stanovení *Salmonella Typhimurium* ve vzorku rajčat**

Salmonelová infekce je jedna z nejčastějších nemocí přenášená potravinami v západním světě. Infekce je často způsobena nedodržením správných hygienických podmínek při práci s potravinami. Spotřeba ovoce a zeleniny se v poslední době zvýšila z důvodů stravovacích trendů (Shukla a kol., 2014).

Tento test je navržen tak, aby stanovoval celé bakterie během několika minut. Základem testu je nitrocelulózová membrána, na kontrolní linii byly připevněny králičí protilátky proti kozím IgG a na testovací linii kozí IgG protilátky proti salmonele (obrázek 28), (Shukla a kol., 2014).





Obrázek 28 Skruktura testu pro stanovení *Salmonella* Typhimurium  
 C, kontrolní linie; T, testovací linie (upraveno dle Shukla a kol., 2014)

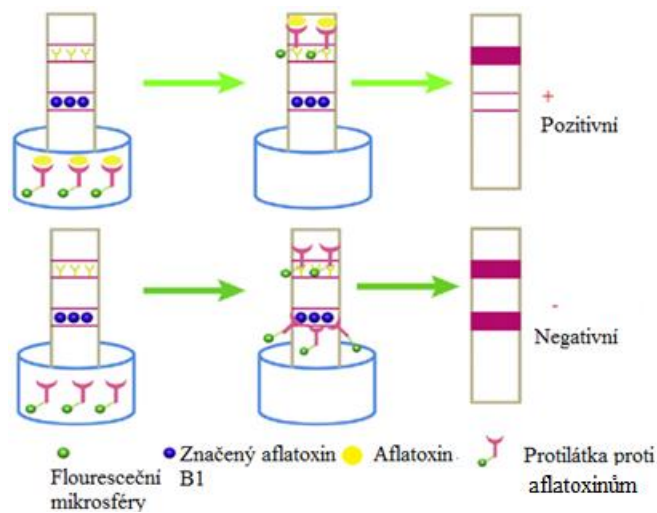
## 5 Výzkum a vývoj v oboru imunochromatografických testů

Dnešní doba vyžaduje čím dál rychlejší získávání výsledků. Nejnovější testy vydávají výsledky v rámci několika minut (Naik a kol., 2017; Zamora-Gálvez a kol., 2017), využívají se nové technologie pro stanovení koncentrace analytu ve vzorku, bez použití drahých přístrojů na odečítání výsledku. Například se může pomocí mobilního telefonu (Shah a kol., 2018) nebo fotoaparátu (Magiati a kol., 2018) odečíst fluorescenční záření. Využívají se nové typy indikátorů (Wu a kol., 2018; Maffert a kol., 2018). Vyvíjejí se i testy, které stanovují specifickou DNA (Takalkar a kol., 2017) či RNA (Zheng a kol., 2018).

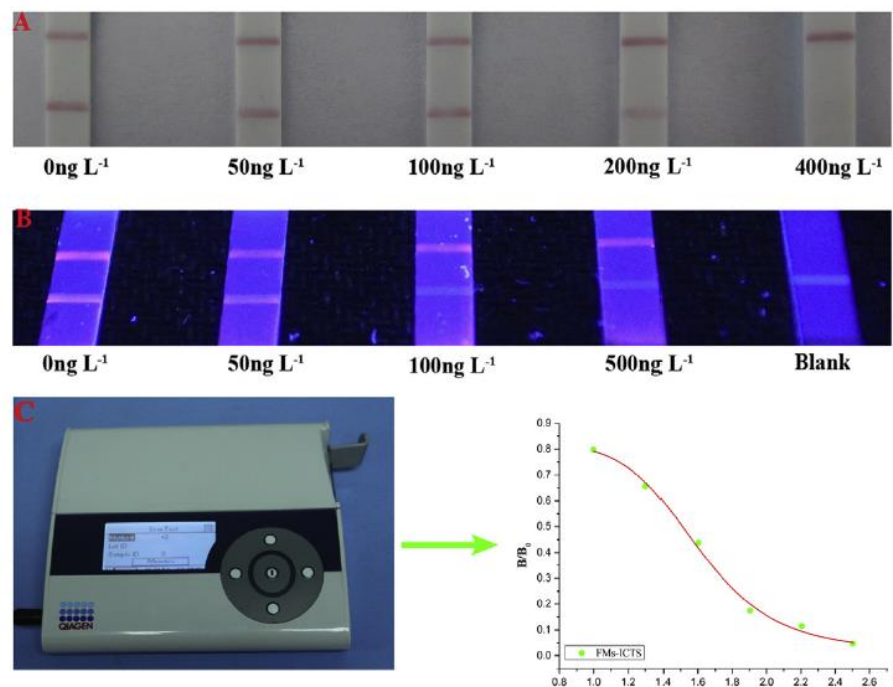
### 5.1 Pro stanovení aflatoxinu M1 v mléce pomocí fluorescence mikrosfér

Mikrosféry jsou malé kuličky z polystyrenu a jsou intenzivně zbarveny na základě smíchání dvou fluorescenčních barev. Fluorescenční mikrosféry mají stabilní konfiguraci a vysokou intenzitu fluorescence, jsou vícebarevné a bezpečné. V lékařské diagnostice mají fluorescenční mikrosférické imunochromatografické testy 8x větší senzitivitu než imunochromatografické testy značené koloidním zlatem. Aflatoxiny jsou vysoko toxické a karcinogenní mykotoxiny vylučované *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Čtyři základní přirozeně vyskytující aflatoxiny jsou aflatoxin B1, B2, G1 a G2. Aflatoxin M1 je hydroxylovaný metabolit aflatoxinu B1 (Zhang a kol., 2016).

Stanovení aflatoxinu M1 (Obrázek 2933) funguje na principu kompetitivního uspořádání testu. Základem testu je nitrocelulózová membrána a využívají se zde monoklonální protilátky. Test se dá odečítat třemi způsoby: pomocí oka, po nasvícení UV lampou a pomocí přístroje, který vydá nejpřesnější výsledky (Obrázek 3029). Výhodou testu je stanovení aflatoxinu ve vzorku i při velice nízkých koncentracích (Zhang a kol., 2016).



Obrázek 29 Princip stanovení aflatoxinu M1 v mléce  
(upraveno dle Zhang a kol., 2016)



Obrázek 30 Způsoby odečítání testu při stanovení aflatoxinu M1 v mléce  
A vizuální odečet výsledků; B odečítání výsledků s využitím UV lampy; C odečet výsledků pomocí přístroje  
(převzato z Zhang a kol., 2016)

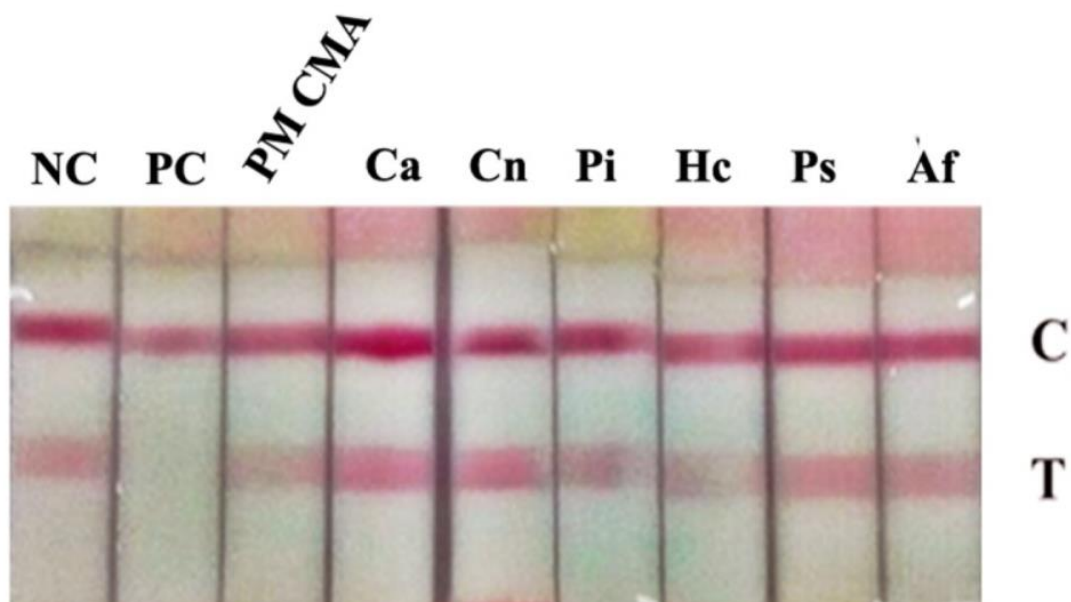
## 5.2 Stanovení *Talaromyces (Penicillium) marneffei* v moči pomocí specifických protilátek

*Talaromyces marneffei* je tepelně dimorfní houba, která může způsobit oportunní, systémové mykózy u pacientů, kteří jsou infikováni virem HIV. Objevuje se i u pacientů s imunodeficitními poruchami, jako je například systémový lupus, rakovina nebo u pacientů

s transplantovanými orgány, kteří dostávají imunosupresivní léky. Včasná diagnóza je důležitá pro kvalitní léčbu (Pruksaphon a kol., 2018).

Imunochromatografický test využívá vysoce specifickou monoklonální protilátku 4D1 proti *T. marneffei* konjugovanou s koloidním zlatem. Test byl vyroben s nitrocelulózové membrány a na testovací linii byly ukotveny králičí protilátky proti myším IgG (Pruksaphon a kol., 2018).

Díky vysoce specifické protilátce nedochází ke vzájemné reaktivitě mezi antigeny *T. marneffei* a jinými běžnými houbami, včetně *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. Jak je vidět na obrázku 31 výsledek testu byl pozitivní pouze u moči obsahující *T. marneffei* (Pruksaphon a kol., 2018).



Obrázek 31 Ukázka specifity testu pro stanovení *T. marneffei*

Vzorky moči s: PC, pozitivní kontrola; PM CMA, myceliální forma *T.marneffei*; Ca, *C. albicans*; Cn, *C. neoformans*; Pi, *P. insidiosum*; Hc, *H. capsulatum*; Ps, *Penicillium* sp.; Af, *A.fumigatus*; NC-negativní kontrola (upraveno dle Pruksaphon a kol., 2018)

### 5.3 Pro stanovení viru západonilské horečky

Virus západonilské horečky patřící do rodu *Flavivirus*, je v současné době jedním z nejrozšířenějších virů přenášených pomocí komárů. Virus je udržován v cyklu komárů a ptáků a je patogenní u lidí a koní, kteří jsou považováni za konečné hostitele (Rebollo a kol., 2018).

Vedle viru západonilské horečky se v různých částech světa šíří i jiné patogenní flaviviry, jako je virus japonské encefalitidy v Asii, virus encefalitidy Saint Louis v Americe, virus encefalitidy Murray Valley v Austrálii a virus Usutu v Africe a Evropě. Identifikace viru je podstatná pro správnou léčbu (Rebollo a kol., 2018).

Tento test využívá monoklonální protilátku 1D11, která rozeznává epitop obalového glykoproteinu viru západonilské horečky a bez vedlejších reakcí se zbytkem flavivirů. Test je vytvořen z nitrocelulóзовé membrány a jako kontrola se používá BSA a protilátky proti němu (Rebollo a kol., 2018).

Imunochromatografický test potvrdil vysokou specifitu monoklonální protilátky 1D11 vůči viru západonilské horečky a jeho úspěšnost byla 100%. Vzorky, které obsahovaly ostatní typy flavivirů byly negativní (Rebollo a kol., 2018).

### 5.3.1 Pro stanovení bioaktivního *Ganoderma triterpenoids*

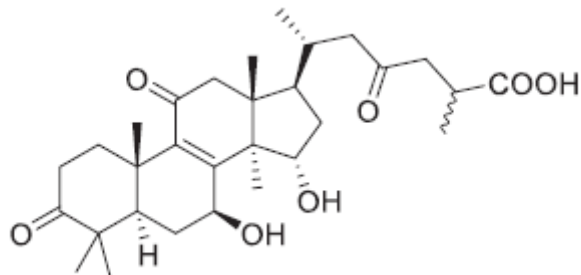
*Ganoderma lingzhi*, známá pod českým názvem jako Lesklokorka lesklá (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**32), je lékařská houba používaná v Číně už přes tisíc let. Lesklokorka je parazitující houba, která prorůstá do stromů. V dnešní době se používá k léčbě mnoha nemocí včetně hepatitidy B, rakoviny, poruch imunity a neurastenii. Nicméně je lesklokorka primárně určena pro léčení rakoviny (Sakamoto a kol., 2016).



Obrázek 32 Lesklokorka lesklá  
(převzato z Medicinman,2018)

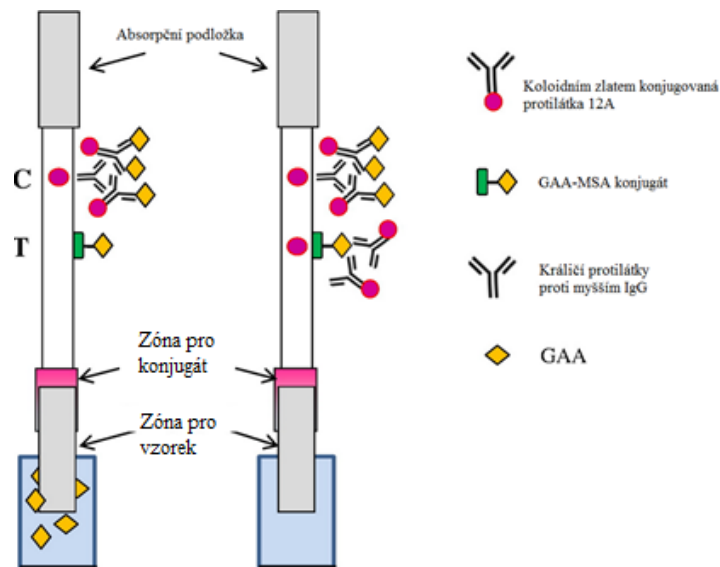
Je známo, že extrakt lesklokorky vykazuje aktivitu proti různým druhům rakovinných buněk, jako je například MCF-7 a MDA-MB-231 (rakovinné buňky prsu), 95-D (rakovinné buňky plic), PC-3 (rakovinné buňky prostaty) a HUC-PC a MTC-11 (rakovinné buňky močového měchýře). K léčbě rakoviny se využívají triterpenoidy, jedná se o kyseliny izolované z leskokorek. K dnešnímu dni je známo více jak 100 těchto kyselin. Nejhojnější z nich je kyselina A (GAA; Obrázek 3333), u které bylo zjištěno, že potlačuje růst a invazivní

chování rakoviny prsu, tím že má antiproliferační účinky. Pro stanovení kvality a obsahu kyseliny A ve vzorku leklorky a její kvality, byl vytvořen tento test (Sakamoto a kol., 2016).



Obrázek 33 Struktura kyseliny A z leklorkek  
(převzato z Sakamoto a kol., 2016)

Testovací proužek (34) byl vytvořen z nitrocelulózové membrány, obsahoval kontrolní myší protilátky třídy IgG proti králičím protilátkám, králičí protilátky a testovací konjugát, který je tvořený ganodermickou kyselinou A (GAA) a myším serózním albuminem (GAA-MSA) (Sakamoto a kol., 2016).



Obrázek 34 Struktura testovacího proužku  
pozitivní výsledek testu (vlevo), negativní výsledek testu (vpravo); C, kontrolní zóna; T, testovací zóna  
(upraveno dle Sakamoto a kol., 2016)

Test pro stanovení ganodermické kyseliny A je založený na nepřímé kompetitivní imunoanalýze využívající vysoce specifické protilátky proti GAA. Protilátka 12A konjugovaná s koloidním zlatem reaguje s přítomnou GAA. Vzniká imunokomplex, který prochází testovací zónou a zachytí se až v kontrolní zóně. Pokud však není GAA přítomna ve

vzorku, samotná protilátka 12A je zachycena jak v testovací, tak kontrolní zóně, což se projevím vznikem barevných skvrn. Tento test je velice citlivý a účinný z kvalitativního i kvantitativního hlediska (Sakamoto a kol., 2016).

## 6 ZÁVĚR

Imunochromatografické stripové metody v posledních letech zaznamenaly veliký rozmach. Svou oblíbenost si získaly hlavně díky rychlé detekci testovaného analytu, jednoduchosti a nízké ceně. Imunochromatografické testy mají podobu proužku, tzv. stripový test, dále se využívají midstream testy anebo kazetové testy.

Stále se hledají nové způsoby značení protilátek, anebo antigenů, které se využívají k detekci analytu ve vzorku. Nejčastěji se používají nanočástice značené koloidním zlatem, dále se využívají značené nanočástice uhlíku nebo latexu, které bývají značené například fluorescenčními barvami. Nově se ke značení protilátek využívá fluorescence mikrosfér.

Imunochromatografické testy poskytují hlavně kvalitativní a semikvantitativní analýzu. Výsledky testů se odečítají nejčastěji vizuálně nebo pomocí UV lamp. V dnešní době jsou však dostupné testy, které dokáží stanovit látky i kvantitativně pomocí speciálních čteček. Nadále se vyvíjejí nové způsoby odečítání výsledků, například pomocí mobilních telefonů.

Imunochromatografické metody nacházejí využití v mnoha oborech. Jsou využívány v mikrobiologii, toxikologii, potravinářství nebo v klinické praxi. Mohou být využívány v laboratoři pro rychlé stanovení analytů v krvi, moči, slinách, slzách i potu, nebo potravinách. Imunochromatografické testy nacházejí své uplatnění i v terénu, kde se používají v ochranném plastovém obalu jako tzv. „screeningové“ testy, nebo je mohou používat lidé sami doma, např. těhotenské testy. V dnešní době se na trh dostávají i testy, které dokáží stanovit více analytů najednou (až dvanáct analytů) paralelně na více testech v kazetě nebo na jednom proužku. Tyto testy se hlavně využívají v toxikologii, kdy se testuje přítomnost drog, popř. léčiv v moči, anebo krvi. Své další využití imunochromatografické metody nacházejí jako tzv. „point of care“ testy, které se provádějí u lůžka pacienta. Mezi tato vyšetření se například řadí stanovení hladiny glykémie nebo se pomocí těchto testů zjišťují přibližné koncentrace C-reaktivního proteinu v krvi.

Využití imunochromatografických testů v praxi je v dnešní době již nezastupitelné a jsou nedílnou součástí laboratoří.



## 7 ZDROJE

All Test Adenovirus Antigen Lateral Flow Immunochromatographic Assays Rapid Test Cassette Swab. *Hangzhou AllTest Biotech* [online]. [cit. 2018-06-29] ©2018. Dostupné z: <http://www.custom-monoclonalantibody.com/sale-8529613-alltest-adenovirus-antigen-lateral-flow-immunochromatographic-assays-rapid-test-cassette-swab.html>

Affinity Chromatography. *AMERSHAM BIOSCIENCES* [online]. [cit. 2018-06-29] ©2002. Dostupné z: [http://www.promix.ru/manuf/ge/chrom/lit/Affinity\\_Chromatography.pdf](http://www.promix.ru/manuf/ge/chrom/lit/Affinity_Chromatography.pdf)

Atasever, A, Ozdermir H. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry* . 2013, 136(2), 864-870. ISSN 03088146.

Bahadir E. B. a Sezgintürk M. K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 82, 286-306. ISSN 01659936.

Bai Z., Luo Y., Xu W., Gao H., Han P., Liu T., Wang H., Chen A. a Huang K. Development of a new fluorescence immunochromatography strip for detection of chloramphenicol residues in chicken muscles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93, 15, 3743-3747. ISSN 00225142.

Bekmurzayeva A., Sypabekova M. a Kanayeca D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2013, 93(4), 381-388. ISSN 14729792.

Berg J. M., Tymoczko J.L. a Stryer L. *Biochemistry*. sixth ed. New York: W.H. Freeman, 2007. ISBN 0-7167-3051-0.

Blažková M., Rauch P. a Fukal L. Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, 25(9), 2122-2128. ISSN 09565663.

Boisen M.L., Oottamasathien D., Jones A.B., Millett M.M., Nelson D.S., Bornholdt Z.A., Fusco M.L., Abelson D.M., Oda S., Hartnett J.N., Rowland M.M., Heinrich M.L., Akdag M., Goba A., Momoh M., Fullah M., Baimba F., Gbakie M., Safa S., Fonnier R., Kanneh L., Cross

R.W., Geisbert J.B., Geisbert T.W., Kulakosky P.C., Grant D.S., Shaffer J.G., Schieffelin J.S., Wilson R.B., Saphire E.O., Branco L.M., Garry R.F., Khan S.H., Pitts K.R. Development of prototype filovirus recombinant antigen immunoassays. *Journal of Infectious Diseases*. 2015, 212(2), 359–367. ISSN 0022-1899.

Carrío A., Sampedro C., Sanchez-Lopez J.L., Pimienta M., Campoy P. Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection. *Sensors*. 2015, 15(11), 29569-29593. ISSN 1424-8220.

Cammarata, Ch. R., Hughes M. E. a Ofner C. M. Carbodiimide Induced Cross-Linking, Ligand Addition, and Degradation in Gelatin. *Molecular Pharmaceutics*. 2015, 12(3), 783-793. ISSN 1543-8384.

Cheng L., Zhang W-X, Ye B-H., Lin J-B. a Chen X-M. In Situ Solvothermal Generation of 1,2,4-Triazolates and Related Compounds from Organonitrile and Hydrazine Hydrate: A Mechanism Study. *Inorganic Chemistry*. 2007, 46(4), 1135-1143. ISSN 0020-1669.

De Giovanni N. a Fucci N. The Current Status of Sweat Testing For Drugs of Abuse: A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, 20(4), 545-561. ISSN 09298673.

Fernández-Sánchez C., Mcneil C.J., Rawson K., Nilsson O., Leung H. Y. a Gnanapragasam V. One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum. *Journal of Immunological Methods*. 2005, 307(1-2), 1-12. ISSN 00221759.

Fiksová M. *Longitudinální protilátkový profil u klišťové encefalitidy*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta.

Fitzgerald J., Leonard P., Darcy E. a O’Kennedy R.. Immunoaffinity Chromatography. Walls D. a Loughran S. T., ed. *Protein Chromatography*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. ISBN 978-1-60761-912-3.

Gao H., Han J., Yang S., Wang Z., Wang L. a Fu Z., Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of ractopamine and salbutamol. *Analytica Chimica Acta*. 2014, 839, 91-96. ISSN 00032670.

Gas F., Baus B., Queré J., Chapelle A. a Dreanno C., Rapid detection and quantification of the marine toxic algae, *Alexandrium minutum*, using a super-paramagnetic immunochromatographic strip test. *Talanta*. 2016, 147, 581-589. ISSN 00399140.

Gel Permeation Chromatography. *DRGP Institute* [online]. ©2018 [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://drgpinstitute.wordpress.com/2014/12/26/gel-permeation-chromatography/>

Giacometti J. a Josić D. Protein and Peptide Separations. *Liquid Chromatography*. Elsevier, 2013, 149-184. ISBN 9780124158061.

Göselová S., Blažková M., Holubová B., Karamonová L., a Rauch P., Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické listy* 108 (2). 2014, 114-119. ISSN 0009-2770.

Haitao L., Xiaodie H., Yang L., Hang Y., Zhenhui K. a Shuit-Tong L. Synthesis of fluorescent carbon nanoparticles directly from active carbon via a one-step ultrasonic treatment. *Materials Research Bulletin*. 2011, 46(1), 147-151. ISSN 00255408.

Hapl J., Hall M., Mufti N. A., Yao Y. M., Macqueen D. B., Wright W. H. a Cooper D. E. Upconverting Phosphor Reporters in Immunochromatographic Assays. *Analytical Biochemistry*. 2001, 288(2), 176-187. ISSN 00032697.

Hennion MC, a Pichon V. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1000(1-2), 29-52. ISSN 00219673.

Huang X, Aguilar Z. P., Xu H., Lai W. A Xiong Y. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, 75, 166-180. ISSN 09565663.

Chase A. Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies—a new tool for the biochemical engineer. *Chemical Engineering Science*. 1984, 39(7-8), 1099-1125. ISSN 00092509.

Chen A., a Yang S.. *Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. Biosensors and Bioelectronics.* 2015, 71, 230-242 . ISSN 09565663.

Ching K. H., He X., Stanker L.H., Lin A.V., McGarvey J.A., Hnasko R. Detection of shiga toxins by lateral flow assay. *Toxins.* 2015;7:1163–1173. ISSN 2072-6651.

Chromý V. a Bittová M. *Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně.* 2., přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-809-0453-937

Imunoglobulin G. In: *Labguide* [online]. © 2014 [cit. 2018-07-01] Dostupné z: <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2015/01/imunoglobulin.jpg>

Jauset-Rubio M., Svobodová M., Teresa Mairal T., McNeil C., Keegan N., Saeed A., Abbas M.N., El-Shahawi MS., Bashammakh A.S., Alyoubi A.O, Sullivan C.K. Ultrasensitive, rapid and inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay. *Scientific Reports.* 2016, 6(1). ISSN 2045-2322.

Jiang W, Liu Y, Chen Y, Yang Q, Chun P., Yao K., Han X., Wang S., Yu S., Liu Y., Wang Q. A novel dynamic flow immunochromatographic test (DFICT) using gold nanoparticles for the serological detection of *Toxoplasma gondii* infection in dogs and cats. *Biosensors and Bioelectronics .* 2015, 72, 133-139. ISSN 09565663

Juřena O. *Příprava polyklonálních protilátek proti progesteronu a jejich využití v imunoafinitní chromatografii.* UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI Přírodovědecká fakulta, 2013.

Kato Y., Araki Y., Juri M., Ishisaka A., Nitta Y., Niwa T., Kitamoto N., Takimoto Y., Kitamoto N. a Takimoto Y. Competitive immunochromatographic assay for leptosperin as a plausible authentication marker of manuka honey. *Food Chemistry.* 2016, 194, 362-365. ISSN 03088146.

Kim Y. K., Lim S.I., Cho I.S., Cheong K.M., Lee E.J., Lee S.O., Kim J-B., Kim J-H., Jeong D-S., An B-H. a An D-J.. A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhea

virus: the lateral immunochromatography assay. *Journal of Virological Methods*. 2015,225:4–8. ISSN 01660934.

Zamora-Gálvez A., Morales-Narváeza E., Romero J., a Merkoçi A.  
Field-Usable Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV). *PLOS ONE*. 2017, 12(1). ISSN 1932-6203.

Kodíček M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 80-7080-551-X.

Koets M., Sander I., Bogdanovic J., Doekes G. a van Amerongen A. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. *Journal of Environmental Monitoring*. 2006, 8(9), 942. ISSN 1464-0325.

Lakner M., Schneider E., Usleber E. a Dietrich R., Becker H. a Erwin Märtbauer. Development and application of immunochromatographic tests for the detection of staphylococcal enterotoxin E. *Food and Agricultural Immunology*. 2008, 10(3), 249-257. ISSN 0954-0105.

*Leptospermum scoparium*. In: *Dobbies garden centres* [online]. ©2018 [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://australianseed.com/shop/item/leptospermum-scoparium->

Lesklokorka lesklá. In: *Medicinman*[online]. ©2018 [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <http://www.medicinman.info/lesklokorka-leskla-ganoderma/>

Li M., Yang H., Li S., Liu Ch., Zhao K., Li J., Jiang D., Sun L., Wang H. Deng A. An ultrasensitive competitive immunochromatographic assay (ICA) based on surface-enhanced Raman scattering (SERS) for direct detection of 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ) in tissue and urine samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015, 211, 551-558. ISSN 09254005.

Liu L., Luo L., Suryoprabowo S., Peng J., Kuang H. a Xu Ch. Development of an Immunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Ciprofloxacin in Milk Samples. *Sensors* . 2014, 14(9), 16785-16798 . ISSN 1424-8220.

Lou S., Patel C., Ching S a Gordon J. One-step competitive immunochromatographic assay for semiquantitative determination of lipoprotein (a) in plasma, *Clinical Chemistry* 39,619, (1993). ISSN 1530-8561.

Maffert P., Reverchon S., Nasser W., Rozard C. a Abaibou H. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017, **36**(10), 1717-1731 . ISSN 0934-9723.

Magiati M., Sevastou A a Kalogianni D.P. A fluorometric lateral flow assay for visual detection of nucleic acids using a digital camera readout. *Microchimica Acta*. 2018, 185(6). ISSN 0026-3672.

Miller, JN., Niessner R., Knopp D. Enzyme and Immunoassays. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* . Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000. ISBN 3527306730.

Moreno M.L., Cebolla A., Munoz-Suano A., Carrillo–Carrion C., Comino I., Pizarro A., León F., Rodríguez-Herrera A a Sousa C. Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*. 2017, 66(2), 250-257. ISSN 0017-5749.

Naik L., Sharma R., Mann B., Lata K., Rajput Y.S. a Seurentha Nath B. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. *Food Chemistry*. 2017, 219, 85-92. ISSN 03088146.

Nielsen K., Yu W.L., Kelly L., Bermudez R., Renteria T., Dajer A., Gutierrez E., Williams J. Algire J. a Torioni de Eschaide S . Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*. *J. Immunoassay Immunochem*. 2007 29(1), 10-18. ISSN 1532-1819.

Ngom B, Guo Y, Wang X a Bi D.. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397(3), 1113-1135. ISSN 1618-2642.

Qi X., Huang Y., Lin Z., Xu L. a Yu H. Dual-Quantum-Dots-Labeled Lateral Flow Strip Rapidly Quantifies Procalcitonin and C-reactive Protein. *Nanoscale Research Letters*. 2016, 11(1). ISSN 1931-7573.

One Step LH Urine Ovulation Test Kit. *Clongene* [online]. ©2018 [cit. 2018-06-29]. Dostupné z: [https://clongene.en.alibaba.com/productshowimg/507356874-210786351/One\\_Step\\_LH\\_Urine\\_Ovulation\\_Test\\_Kit\\_Format\\_strip\\_cassette\\_midstream\\_.html?spm=a2700.8304367.prgc37c812.2.6f5428f00b1wQB](https://clongene.en.alibaba.com/productshowimg/507356874-210786351/One_Step_LH_Urine_Ovulation_Test_Kit_Format_strip_cassette_midstream_.html?spm=a2700.8304367.prgc37c812.2.6f5428f00b1wQB)

Panel Drug Test Kit. *Homehealthtesting* [online]. 2018 [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://www.homehealthtesting.com/way-urine-drug-test-strip-p-110.html>

Paulini I., Siqueira-Silva, Thomaz L., Rocha L., Harsi Ch., Bellei N a Granato C.. Development of a prototype immunochromatographic test for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017, 21(5), 500-506. ISSN 14138670.

Pfaunmiller E.L., Paulemond M.L., Dupper C.M. a Hage D.S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, 405(7), 2133-2145. ISSN 1618-2642.

Pinto, G., M., F., and Jardim, I., C. Use of solid-phase extraction and highperformance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method (2000) *Journal of Chromatography*. 869, 463-469 ISSN 00219673.

Posthuma-Trumpie G.A. , Korf J. a van Amerongen A.. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393(2), 569-582. ISSN 1618-2642.

Prokhorova A.M., Kozhevnikov V.N., Kopchuk D.S., Bernard H. Bris N.L., Tripier r., Handel H., Koenig B. a Kozhevnikovae D.N., 1,2,4-Triazine method of bipyridine ligand synthesis for the preparation of new luminescent Eu(III) complexes. *Tetrahedron*. 2011, 67(3), 597-607. ISSN 00404020.

Pruksaphon K., Intaramat A., Ratanabanangkoon K., Nosanchuk J.D., Vanittanakom N., Youngchim S., a Nielsen K. Development and characterization of an immunochromatographic test for the rapid diagnosis of *Talaromyces (Penicillium) marneffei*. *PLOS ONE*. 2018, 13(4), e0195596-. ISSN 1932-6203

Rebollo B., Pérez T., Camuñas A.,Pérez-Ramírez E.,Llorente F., Sanchez-Seco M.P., Miguel Jiménez-Clavero M. Á. a Venteo Á. A monoclonal antibody to DIII E protein allowing the differentiation of West Nile virus from other flaviviruses by a Lateral Flow Assay. *Journal of Virological Methods*.2018. ISSN 01660934.

Sajid M., Kawde A-N. a Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015, 19(6), 689-705 . ISSN 13196103.

Sakamoto S., Kikkawa N., Kohno T., Shimizu K., Tanaka H. a Morimoto S. Immunochromatographic strip assay for detection of bioactive Ganoderma triterpenoid, ganoderic acid A in *Ganoderma lingzhi*. *Fitoterapia*. 2016, 114, 51-55. ISSN 0367326x.

Santre, P., Gallardo C., Monedero A., Ruiz T., Arias M., Sanz A. a Rudea P. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Veterinary Research*. 2016, 12(1). ISSN 1746-6148.

Seydack M. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. *Biosensors and Bioelectronics* . 2005, 20(12), 2454-2469. ISSN 09565663.

Shah K. G., Singh V., Kauffman P., Abe K. a Yager P. Mobile Phone Ratiometric Imaging Enables Highly Sensitive Fluorescence Lateral Flow Immunoassays without External Optical Filters. *Analytical Chemistry* . 2018, 90(11), 6967-6974. ISSN 0003-2700.

Shen C., Cheng A., Wang M., Sun K., Jia R., Sun T., Zhang N., Zhu D., Luo Q., Zhou Y. a Chen X. Development and evaluation of an immunochromatographic strip test based on the recombinant UL51 protein for detecting antibody against duck enteritis virus. *Virology Journal*. 2010, 7(1), 268. ISSN 1743-422X.



Shim W-B., Kim M. J., Mun H. a KIM M-G.. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1. *Biosensors and Bioelectronics* . 2014, 62, 288-294. ISSN 09565663.

Shukla S., Leem H., Lee J.S. a Kim M. Immunochromatographic strip assay for the rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium in artificially contaminated tomato samples. *Can. J. Microbiol.* 2014,60,399–406. ISSN 0008-4166.

Shyu R.H., Shyu H.F., Liu H.W., Tang S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon*. 2002,40(3),255–258. ISSN 00410101.

Slepička P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V. Nanostrukturovaný povrch polymerů stimulovaný laserem pro elektroniku a tkánové inženýrství. *Chemické Listy*. 106, 875 (2012). ISSN 0009-2770.

Stambach N., Carr S., Cox R. a Voorhees K.J. Rapid Detection of *Listeria* by Bacteriophage Amplification and SERS-Lateral Flow Immunochromatography. *Viruses*. 2015, 7(12), 6631-6641. ISSN 1999-4915.

Song S., Liu N., Zhao Z., Njumbe Ediage E., Wu S., Sun C., De Saeger S. a Wu A.. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Mycotoxin Determination. *Analytical Chemistry*. 2014, 86(10), 4995-5001. ISSN 0003-2700.

Švorčík V., Kolská Z., Kvítek O., Siegel J., Řezníčková A., Řezanka P a Záruba K. "Soft and rigid" dithiols and Au nanoparticles grafting on plasma-treated polyethyleneterephthalate. *Nanoscale Research Letters*. 2011, 6(1), 607I. ISSN 1556-276x.

Takalkar S., Baryeh K., Liu G. Fluorescent carbon nanoparticle-based lateral flow biosensor for ultrasensitive detection of DNA. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, 98, 147-154. ISSN 09565663.

TEST INSTRUCTIONS: DRUG: MultiDrug Screen Urine Test: Marijuana, Cocaine, Opiates Methamphetamine/Ecstasy and Amphetamine, PCP or BZD. *Medimpex* [online]. ©2018 [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://www.meditests.com/t-drug5.html>

Valls A. , Diaz P. , Pastor F.I. a Valenzuela S.V. A newly discovered arabinoxylan-specific arabinofuranohydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(4), 1743-1751. ISSN 0175-7598.

Vician L. a Tishkoff G.H.. Purification of human blood clotting factor X by blue dextran agarose affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1976, 434(1), 199-208 . ISSN 00052795.

Walkup W.G a Kennedy M.B. PDZ affinity chromatography, A general method for affinity purification of proteins based on PDZ domains and their ligands. *Protein Expression and Purification*. 2014, 98, 46-62 . ISSN 10465928.

Wang Ch., Li X., Peng T., Wang Z., Wen K. a Jiang H. Latex bead and colloidal gold applied in a multiplex immunochromatographic assay for high-throughput detection of three classes of antibiotic residues in milk. *Food Control*. 2017, 77, 1-7. ISSN 09567135.

Wild D. a Christopoulos T. K. The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA, and related techniques. 4thed. Waltham, MA: Elsevier, 2013, 1013 p. ISBN 00-809-7037-0.

Wong R. a TSE H. *Lateral flow immunoassay*. New York, NY, Springer, 2009. ISBN 978-1-58829-908-6.

Wu S., Liu L., Duan N., Li Q., Zhou Y. a Wang Z. Aptamer-Based Lateral Flow Test Strip for Rapid Detection of Zearalenone in Corn Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, 66(8), 1949-1954. ISSN 0021-8561.

Xu H., Mao X., Zeng Q., Wang S., Kawde A-N. a Liu G.. Aptamer-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for Protein Analysis. *Analytical Chemistry*. 2009, 81(2), 669-675. ISSN 0003-2700.

Xi F. a Wu J. Preparation of macroporous chitosan layer coated on silica gel and its application to affinity chromatography for trypsin inhibitor purification. *Reactive and Functional Polymers*. 2006, 66(6), 682-688. ISSN 13815148

Yang Q., Gong X., Song T. a Yang J.. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, 30(1), 145-150. ISSN 09565663.

Yoshida T, Honda Y, Tsujimoto T, Uyama H, Azuma J. Selective isolation of  $\beta$ -glucan from corn pericarp hemicelluloses by affinity chromatography on cellulose column. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 111, 538-542 . ISSN 01448617.

Zeng W., Yao L.,Teng J., Yan Ch., Qin P., Liu G., Chen W., Lateral flow test for visual detection of multiple MicroRNAs. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, 264, 320-326. ISSN 09254005.

Zhang Y.,Xiao W., Kong H., Cheng J., Yan X., Zhang M., Wand Q., Qu H. a Zhao Y. A Highly Sensitive Immunochromatographic Strip Test for Rapid and Quantitative Detection of Saikosaponin d. *Molecules*. 2018, 23(2), 338. ISSN 1420-3049.

Zhou Y, Pan F-G, Li Y-S, Zhang Y-Y, Zhang J-H, Lu S-y, Ren H-L a Liu Z-S. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, 24(8), 2744-2747. ISSN 09565663.