

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Elektrochemická detekce patogenních mikroorganismů s využitím kovových
nanočástic jako signál-generujících značek

Bc. Zuzana Škraňková

Diplomová práce

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Electrochemical detection of food-borne pathogens using metal
nanoparticles as signal-generating probes

Bc. Zuzana Škraňková

Thesis

2019

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Škraňková**
Osobní číslo: **C17487**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Elektrochemická detekce patogenních mikroorganismů s využitím kovových nanočástic a kvantových teček**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

Teoretická část: Vypracovat teoretickou rešerši o možnosti stanovení patogenních mikroorganismů vyskytujících se v potravinách pomocí elektrochemických biosenzorů. V první části se zaměřit na nejčastěji se vyskytující patogeny v potravinách a jejich popis. V další části stručně popsat, co jsou to biosenzory a z jakých se skládají části. Stěžejní částí by pak měly být konkrétní příklady využití elektrochemických biosenzorů, se zaměřením na imunosenzory, pro analýzu/průkaz bakteriální kontaminace potravin. Hlavní zaměření by mělo být na detekci celých bakteriálních buněk, menší část pak na možnost stanovení pomocí detekce bakteriální DNA.

Experimentální část:

Příprava magnetických nosičů s imobilizovanými specifickými protilátkami proti vybraným bakteriím (*Salmonella* ssp., *Campylobacter jejuni*). Optimalizace podmínek imobilizace, verifikace účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE.

Příprava protilátek značených kvantovými tečkami nebo zlatými nanočásticemi. Optimalizace podmínek přípravy, verifikace pomocí SDS-PAGE a elektrochemicky.

Square wave anodická/katodická rozpouštěcí voltametrie kvantových teček a zlatých nanočástic.

Isolace bakteriálních buněk ze vzorku s následnou detekcí pomocí značených protilátek, optimalizace množství jednotlivých reagensů.

Elektrochemická detekce celého imunokomplexu.

Mikrobiologická confirmace záchytu bakteriálních buněk ze vzorku, vyhodnocení účinnosti.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Odborná literatura týkající se dané problematiky, z většiny ne starší než 7 let.
Vědecké články dostupné v databázích Scopus, Web of science, PubMed,
Sciencedirect.**

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Pavla Murasová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Věntura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b 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:

.....

Bc. Zuzana Škraňková

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a konzultantce Mgr. Pavle Murasové za odborné vedení, profesionální, a především pozitivní přístup, cenné rady, připomínky, a to nejenom při práci v laboratoři, ale i při zpracování celé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ivetě Brožkové, PhD. za odbornou pomoc a konzultace v oblasti mikrobiologie. Velké poděkování patří také mé rodině a příteli za psychickou podporu a umožnění studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu elektrochemického imunosenzoru pro detekci bakteriálních buněk, konkrétně *Salmonella* spp., a *Campylobacter jejuni*. Systém je založený na principu heterogenní imunoanalýzy, který využívá primární protilátky pro izolaci bakteriálních buněk, imobilizované na magnetickém nosiči, a sekundární protilátky, značené vybranými nanočásticemi, které umožňují následnou elektrochemickou detekci. Nejprve byly optimalizovány postupy pro přípravu magnetického nosiče pro izolaci bakteriálních buněk ze vzorku. Pro značení protilátek pak byly zvoleny CdTe nebo PbS kvantové tečky (QDs) kombinované se silika nanočásticemi. Kromě kvantových teček byly testovány i zlaté nanočástice (AuNPs) a také polymerní dendrony, jako alternativa silika nanočástic. Stanovení probíhalo na tištěných tříelektrokových senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou pomocí square wave anodické, resp. katodické rozpouštěcí voltametrie jako detekční metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Salmonella spp., *Campylobacter jejuni*, kultivační metody, magnetické částice, kvantové tečky, zlaté nanočástice, imunoanalýza, elektrochemický imunosenzor, dendrony, square wave voltametrie

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on preparation of electrochemical immunosensor for detection of whole bacterial cells, specifically *Salmonella* spp., and *Campylobacter jejuni*. The system is based on the principle of heterogeneous immunoassay that uses primary antibodies immobilized on a magnetic carrier and secondary labelled antibodies which enable subsequent electrochemical detection. Firstly, procedures for preparing a magnetic carrier for isolation of bacterial cells from the sample were optimized. CdTe or PbS quantum dots (QDs) combined with silica nanoparticles were then selected for antibody labelling. Next to QDs, gold nanoparticles (AuNPs) were tested, and also polymer dendrons as an alternative to silica nanoparticles. Electrochemical detection was carried out on screen-printed three-electrode sensors with carbon working electrode and square wave anodic or cathodic stripping voltammetry as detection method.

KEYWORDS

Salmonella spp., *Campylobacter jejuni*, Cultivation methods, magnetic particles, quantum dots, gold nanoparticles, immunoassay, electrochemical immunosensor, dendrons, square wave voltammetry

Obsah

Úvod.....	17
1. Metody průkazu bakterií	18
1.1 Klasické kultivační metody pro stanovení patogenů	18
1.1. 1 Stanovení potravinářských patogenů podle norem.....	18
1. 2 Rychlé metody pro stanovení patogenů	23
1.2. 1 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi	24
1.2. 2 Systém VIDAS	24
1.2. 3 Metoda PCR – Polymerázová řetězová reakce	25
1.2. 4 Využití biosenzorů ke stanovení potravinových patogenů.....	27
1.2. 5 Elektrochemické imunosenzory	28
1.2. 6 Využití nanomateriálů pro detekci potravinových patogenů.....	29
1.2. 7 Porovnání vybraných metod.....	33
2. bakteriální kontaminace mléka	35
2.1. Zdroje kontaminace.....	35
2.2 Mikroorganismy způsobující kažení syrového mléka.....	35
2.3 Patogeny vyskytující se v mléce	37
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	37
2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.3.3 <i>Salmonella</i> spp.....	39
2.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	40
2.3.5 <i>Campylobacter jejuni</i>	41
2.3.6 <i>Bacillus cereus</i>	42
3. Experimentální část	44
3.1 Přístroje a pomůcky.....	44
3.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	45
3.3 Dot-Blot analýza	48
3.4 Příprava imunosorbentů	49
3.4.1 Imobilizace primárních protilátek na magnetické částice	49
3. 5 Záchyt a vyočkování bakterií	50
3.5.1 Ověření funkčnosti imunosorbentu pomocí záchytu bakteriálních buněk <i>Salmonella</i> spp.....	50
3.5.2 Ověření funkčnosti imunosorbentu pomocí záchytu bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i>	52

3. 6 Příprava značených protilátek	53
3.6.1 Značení protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp. a anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím SiNPs-CdTe QDs.....	53
3.6.2 Značení protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp. a anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím SiNPs-AuNPs	54
3.6.3 Značení protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp. a anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím polymerních dendronů a CdTe QDs.....	55
3.6.4 Značení protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp. a anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím SiNPs-PbS QDs	56
3.7 Sestavení imunokomplexu pro detekci <i>Salmonella</i> spp. a <i>Campylobacter jejuni</i>	57
3.8 Elektrochemická detekce	58
3.8.1 Elektrochemická detekce na tištěných tříelektrodových senzorech DRP C-110	58
4. Výsledky a diskuze.....	61
4.1 Výběr protilátek pro vývoj systému pro detekci bakteriálních buněk	62
4.2 Příprava magnetických nosičů anti- <i>Salmonella</i> spp.	64
4.3 Ověření účinnosti záchytu buněk <i>Salmonella</i> spp. s využitím připraveného imunisorbentu.....	65
4.4 Příprava značených protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp.	66
4.4.1 SDS-PAGE analýza pro kontrolu značených protilátek.....	68
4.4.2 Elektrochemická detekce připravených značených protilátek	69
4.5 Sestavení celého imunosenzoru pro detekci <i>Salmonella</i> spp.	73
4.5.1 Elektrochemická detekce komplexu <i>Salmonella</i> spp. s použitím SiNPs-AuNPs	74
4.5.2 Elektrochemická detekce komplexu <i>Salmonella</i> spp. s použitím SiNPs-CdTe QDs.....	75
4.5.3 Elektrochemická detekce komplexu <i>Salmonella</i> spp. s použitím Ds-CdTe QDs	76
4.5.4 Imunosenzor pro detekci <i>Salmonella</i> spp. s použitím menšího množství nosiče a konjugátů s SiNPs-CdTe QDs, Ds-CdTe QDs a SiNPs-PbS QDs	78
4.5.5 Imunosenzor pro detekci <i>Salmonella</i> spp. za použití tří různých postupů sestavení imunosenzoru.....	80
4.5.6 Imunosenzor pro detekci <i>Salmonella</i> spp. s využitím různého množství konjugátu	82
4.6 Příprava magnetických nosičů anti- <i>Campylobacter jejuni</i>	83
4.7 Ověření účinnosti záchytu buněk <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím připraveného imunisorbentu.....	84
4.8 Příprava značených protilátek anti- <i>Campylobacter jejuni</i>	86

4.8.1 SDS-PAGE analýza pro kontrolu značených protilátek.....	87
4.8.2 Elektrochemická detekce připravených značených protilátek	87
4.9 Sestavení celého imunosenzoru pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	90
4.9.1 Elektrochemická detekce komplexu <i>Campylobacter jejuni</i> s SiNPs-AuNPs.	90
4.9.2 Elektrochemická detekce komplexu <i>Campylobacter jejuni</i> s SiNPs-CdTe QDs	91
4.9.3 Elektrochemická detekce komplexu <i>Campylobacter jejuni</i> s Ds-CdTe QDs	92
4.9.4 Imunosenzor pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i> s použitím menšího množství nosiče a konjugátů s SiNPs-CdTe QDs, Ds-CdTe QDs a SiNPs-PbS QDs	93
4.9.5 Imunosenzor pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i> za použití tří různých postupů sestavení imunosenzoru	94
4.9.5 Imunosenzor pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím různého množství konjugátu	96
5. Závěr.....	97
6. Zdroje	99

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Salmonella</i> spp. na A-XLD agaru	19
Obrázek 2 <i>Campylobacter jejuni</i> na Columbia agaru	20
Obrázek 3 <i>Escherichia coli</i> na krevním agaru	20
Obrázek 4 <i>Staphylococcus aureus</i> na Baird-Parker agaru	21
Obrázek 5 <i>Listeria monocytogenes</i> na krevním agaru (37 °C, 24 H); (foto autor)	22
Obrázek 6 <i>Bacillus cereus</i> na MYP agaru	23
Obrázek 7 VIDAS systém, dostupné z: http://www.medicalexpo.com/prod/biomerieux/p-rod-70644-616369.html , https://www.biomerieux.pl/diagnostyka-kliniczna/produkt/vidasr (staženo 25. 3. 2019)	25
Obrázek 8 Průběh metody PCR	27
Obrázek 9 Schéma zobrazující hlavní součásti biosenzoru	27
Obrázek 10 Přehled druhů biosenzorů	28
Obrázek 11 Nepřímá metoda detekce bakterií pomocí sendvičového uspořádání	29
Obrázek 12 Magnetické částice: nemodifikované částice (A), s aktivními funkčními skupinami (B) a konjugované s biologickými molekulami (C),	30
Obrázek 13 Princip biosenzoru pro detekci <i>Escherichia coli</i> pomocí protilátek značených zlatými nanočásticemi	32
Obrázek 14 Schéma ilustrující příslušné kroky zpracování vzorku a přibližnou dobu analýzy.	33
Obrázek 15 <i>Escherichia coli</i> O157: H7, 3D ilustrace	38
Obrázek 16 <i>Staphylococcus aureus</i> ; elektronová skenovací mikroskopie	39
Obrázek 17 <i>Salmonella Typhimurium</i> ; 3D ilustrace upravená počítačem	40
Obrázek 18 <i>Listeria monocytogenes</i> , světelný mikroskop	41
Obrázek 19 <i>Campylobacter jejuni</i> ; 3D ilustrace	42
Obrázek 20 <i>Bacillus cereus</i> , elektronový skenovací mikroskop	43
Obrázek 21 Pracoviště pro elektrochemickou detekci	59
Obrázek 22 Detail tištěného tříelektrodového senzoru použitého pro analýzu (DropSens C-110, DropSens Španělsko)	60
Obrázek 23 Schéma znázorňující jednotlivé kroky konstrukce biosenzoru pro detekci bakteriálních buněk	61
Obrázek 24 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření čistoty a kvality protilátek	63
Obrázek 25 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp. na magnetické částice	64
Obrázek 26 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp. na magnetické částice	65
Obrázek 27 Výsledek SDS-PAGE analýzy značených protilátek anti- <i>Salmonella</i> spp s SiNPs-CdTe QDs	68
Obrázek 28 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Salmonella</i> spp. s SiNPs-CdTe QDs	70
Obrázek 29 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Salmonella</i> spp. s SiNPs-CdTe QDs měřeno na elektrodách Orion OHT 000	71
Obrázek 30 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Salmonella</i> spp. s Ds-CdTe QDs	71
Obrázek 31 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Salmonella</i> spp. s SiNPs-PbS QDs	72

Obrázek 32 SWCSV voltamogram měření proudové odezvy značených protilátek AuNPs a graf závislosti proudové odezvy na množství konjugátu s SiNPs- AuNPs.....	73
Obrázek 33 Závislosti proudové odezvy na množství použitého imun sorbentu. Použitý konjugát SiNPs-CdTe QDs.....	74
Obrázek 34 SWCSV voltamogram detekce <i>Salmonella Typhimurium</i> pomocí imunosenzoru s konjugátem s SiNPs-AuNPs.....	75
Obrázek 35 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie <i>Salmonella Typhimurium</i> s konjugátem SiNPs-CdTe QDs.....	76
Obrázek 36 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie <i>Salmonella Typhimurium</i> s konjugátem Ds-CdTe QDs	77
Obrázek 37 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci <i>Salmonella Typhimurium</i> s menším množstvím imun sorbentu	78
Obrázek 38 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci <i>Salmonella Typhimurium</i> s menším množstvím imun sorbentu	79
Obrázek 39 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci <i>Salmonella Typhimurium</i> s menším množstvím imun sorbentu	79
Obrázek 40 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk <i>Salmonella Typhimurium</i> , konjugát SiNPs-CdTe QDs.....	81
Obrázek 41 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk <i>Salmonella Typhimurium</i> , konjugát Ds-CdTe QDs	81
Obrázek 42 Voltamogramy měření imunokomplexu za použití různého množství konjugátů při detekci <i>Salmonella Typhimurium</i>	82
Obrázek 43 SDS-PAGE analýza pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti- <i>Campylobacter jejuni</i> na magnetické částice.....	83
Obrázek 44 SDS-PAGE analýza pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti- <i>Campylobacter jejuni</i> (Thermo Scientific) na magnetické částice.....	84
Obrázek 45 DotBlot analýza pro ověření afinity testovaných protilátek k danému antigenu	86
Obrázek 46 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro stanovení účinnosti konjugace protilátek anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s SiNPs-CdTe QDs	87
Obrázek 47 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Campylobacter jejuni</i> . s SiNPs-CdTe QDs.....	88
Obrázek 48 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s Ds-CdTe QDs	88
Obrázek 49 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti- <i>Campylobacter jejuni</i> s SiNPs-PbS QDs.....	89
Obrázek 50 Voltamogram proudové odezvy značených protilátek SiNPS-AuNPs	89
Obrázek 51 Voltamogram square wave katodické rozpouštěcí voltametrie.....	90
Obrázek 52 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie <i>Campylobacter jejuni</i> s konjugátem SiNPs-CdTe QDs	91
Obrázek 53 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie <i>Campylobacter jejuni</i> s konjugátem Ds-CdTe QDs.....	92
Obrázek 54 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i> s menším množstvím imun sorbentu	93
Obrázek 55 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i> s menším množstvím imun sorbentu	93

Obrázek 56 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i> , konjugát SiNPs-CdTe QDs	95
Obrázek 57 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i> , konjugát Ds-CdTe QDs	95
Obrázek 58 Voltamogramy měření imunokomplexu <i>Campylobacter jejuni</i> za použití různého množství konjugátů	96

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výhody a nevýhody jednotlivých rychlých metod	34
Tabulka 2 Množství roztoků pro přípravu gelů pro SDS-PAGE elektroforézu	46
Tabulka 3 Příprava suspenze bakterií	51
Tabulka 4 Příprava suspenze bakterií	52
Tabulka 5 Podmínky pro měření SWASV a SWCSV	59
Tabulka 6 Použité typy protilátek	62
Tabulka 7 Vyhodnocení účinnosti záchytu bakteriálních buněk <i>Salmonella</i> spp. pomocí imunosorbentu.	66
Tabulka 8 Používané značky pro značení sekundární protilátky	67
Tabulka 9 Jednotlivé postupy sestavení imunosenzoru pro detekci <i>Salmonella</i> Typhimurium	80
Tabulka 10 Vyhodnocení účinnosti záchytu bakteriálních buněk <i>Campylobacter Jejuni</i> pomocí imunosorbentu.	85

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ALOA	Agar podle Ottavianiho a Agostiho (Agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti)
AuNPs	Zlaté nanočástice (Gold nanoparticles)
CAMP test	test na průkaz β -hemolýzy (Christie, Aktins, Munch-Peterson)
CFU	Kolonie tvořící jednotky (Colony forming units)
CNT	Uhlíkové nanotrubičky (Carbon nanotubes)
ČSN	Česká technická norma (Czech technical norm)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (Deoxyrinonucleic acid)
Ds	Dendrony (Dendrons)
ELISA	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EN	Evropská norma (European norm)
FAD	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
FIA	Fluorescenční imunoanalýza (Fluorescenc immunoassay)
HUS	Hemolyticko uremický syndrom (Haemolytic uremic syndrome)
IDF	Mezinárodní mlékařská federace (The international Dairy federation)
	ISO Mezinárodní organizace pro standardizaci (International organization for standardization)
LOD	Detekční limit (Limit of the detection)
mCCDA	Modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (Modified Charcol Cefoperazone Deoxycholate Agar)
MKTTn	Kauffman tetrathionát novobiocin médium
MNP	Magnetické nanočástice (Magnetic nanoparticles)
MPA	Masopectonový agar
mPCR	Multiplexní polymerázová řetězová reakce (multiplex Polymese chain reaction)
MYP	Manitol yolk polymyxine B agar
NC	Nanokanáčky (Nanochannels)
NRs	Nanotyčinky (Nanorods)
NWs	Nanodrátky (Nanowires)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
QDs	Kvantové tečky (Quantum dots)

QMS	System řízení kvality (Quality management system)
qPCR	Polymerázová řetězcová reakce v reálném čase (Polymerase chain reaction in real-time)
RVS	Rappaport Vassiliadis sója médium
SFE	Stafylokokové otravy z potravin (Staphylococcal poisoning from food)
SE	Stafylokokové enterotoxiny (Staphylococcal enterotoxins)
SPR	Nádoba pevné fáze (Solid phase vessel)
TSYE agar	Agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničným extraktem (Tryptone Yeast Soy Extract -Agar)
VIDAS	automatizovaný imunnoanalytický systém
XLD	Xylóza-lyzin deoxylátový agar

ÚVOD

V dnešní době jsou na bezpečnost a zdravotní nezávadnost potravin kladeny čím dál větší požadavky. Jako bezpečné a zdravotně nezávadné potraviny jsou brány ty, které neobsahují patogenní a podmíněně patogenní mikroorganismy, ani jiné cizorodé, zdraví škodlivé látky.

Přítomnost tzv. potravinových patogenů může způsobit vznik alimentárních onemocnění. Z tohoto důvodu je nutné přítomnost těchto patogenů odhalit v co nejkratším čase a eliminovat tak rozvoj případných zdravotních problémů.

Přesto klasické kultivační metody jsou nezbytné a nenahraditelné pro přesnou confirmaci bakteriální kontaminace, jejich nevýhodou je časová náročnost. Zejména pro rychlý záchyt rizikových potravin (surovin či produktů) by mohly sloužit tzv. screeningové metody, které jsou v poslední době vyvíjeny a využívají různých principů. Podle organizace FDA (Food and Drug Administration) jsou uváděny kategorie potravin, které jsou vystavovány většímu riziku kontaminací potravinovými patogeny. Mezi tyto potraviny patří zejména: syrové a nedostatečně upravené maso, nebo syrové, nepasterované mléko a jeho produkty. Dále pak chlazené nebo částečně mražené mořské plody, syrové ryby, potraviny obsahující syrové nebo nedostatečně tepelně opracovaná vejce a špatně omytá zelenina či ovoce.

Jednou z možností rychlých metod pro detekci bakterií v potravinách mohou být elektrochemické imunosenzory. Ty využívají kombinace specifické afinitní izolace bakteriálních buněk ze vzorku, s citlivou elektrochemickou detekcí. Cílem této práce je sestavení takového systému, který by umožnil detekci bakterií, konkrétně *Salmonella* spp. a *Campylobacter jejuni*.

1. METODY PRŮKAZU BAKTERIÍ

Pro průkaz možného výskytu potravinářských patogenů se používají klasické kultivační metody, rychlé neboli screeningové metody a epidemiologické metody. Ty se většinou nepoužívají každá zvlášť, ale ve většině případů se navzájem doplňují. Nevýhodou klasických kultivačních metod je časová a manuální náročnost. Rychlé metody jsou oproti nim v obou směrech méně náročné. I když je využití rychlých metod efektivnější a umožňují nám dosažení výsledků a průkazu přítomnosti potravinových patogenů v kratším čase, klasické kultivační metody s následnými konfirmačními testy jsou stále nezbytné.

1. 1 Klasické kultivační metody pro stanovení patogenů

Pro jednotnost výsledků stanovení potravinových patogenů a srovnatelnost mezi jednotlivými laboratořemi se využívá postupů, které jsou doporučeny Českými technickými normami (ČSN), normami Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO), a Mezinárodní mlékařské federace (IDF). Metody mohou být jak kvalitativní, tak kvantitativní.

Klasické kultivační metody zahrnují neselektivní pomnožení, selektivní pomnožení v tekutém selektivním médiu, kultivaci na agarové půdě a následný výběr charakteristických kolonií dané bakterie a provedení konfirmace, k čemuž slouží biochemické testy [1].

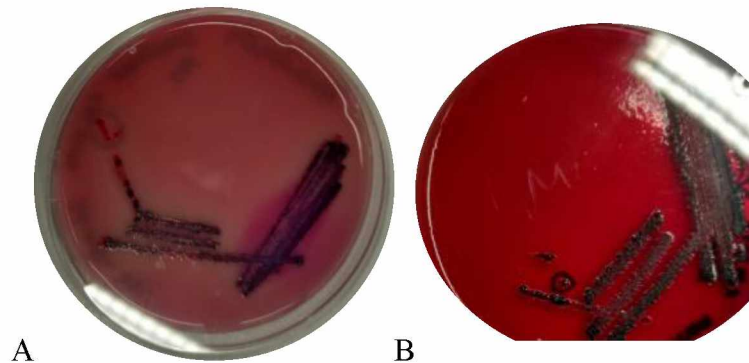
1. 1. 1 Stanovení potravinářských patogenů podle norem

- **Salmonella spp.**

Průkaz bakterií rodu *Salmonella* vychází z normy ČSN EN ISO 6579-1. Metoda zahrnuje čtyři kroky. Prvním krokem je pomnožení v selektivní tekuté půdě, pufrované peptonové vodě, při 34–38 °C po dobu 18 hodin. Kultura se následně přeočkuje a pomnoží ve dvou selektivních tekutých půdách: Rappaport Vassiliadis sója mediu (RVS médium) při 42 °C, 24 hodin a Kauffman tetrathionát novobiocin mediu (MKTTn médium), při 37 °C, 24 hodin. Z RVS média je kultura vyočkována na xylóza-lyzin deoxylátový agar (XLD agar) a z MKTTn média na chromogenní médium (Rambachův agar) a inkubována při 37 °C, 24 hodin. Následně jsou vyočkovány typické kolonie na masopeptonovém agaru (MPA) a provedeny biochemické a sérologické konfirmační

testy. Průkaz je dále založen na negativních výsledcích testů na štěpení močoviny a fenylalanindeaminázy, průkaz β -D-galaktosidázy, VP test a průkaz tvorby indolu [2].

Na obrázku 1 je vidět růst salmonely na XLD agaru, kde kolonie jsou bílé s černým středem a v jejich okolí dochází ke změně barvy půdy. Na Rambach agaru jsou kolonie jasně červené nebo s odstíny od vínové až do modré.



Obrázek 1 *Salmonella* spp. na A-XLD agaru (37 °C, 24 H), B-Rambach agaru (chromogenní médium) (37 °C, 24 H) (foto autor)

- ***Campylobacter jejuni***

Stanovení se provádí podle normy ČSN EN ISO 10272-1. Metodu průkazu vybíráme podle typu vzorku, předpokládaného počtu buněk ve vzorku a úrovni mikroflóry vzorku, která může být nízká nebo vysoká. Na základě toho je prováděno pomnožení nebo se naopak očkuje přímo na selektivně diagnostickou půdu.

Obohacení vzorku se provádí v selektivním tekutém médiu. Je využíváno Boltonova nebo Prestnova bujónu. K následné izolaci se využívá modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem-mCCDA. Inkubace se provádí v mikroaerofilním prostředí 44 h při 41,5 °C.

Po nárůstu jsou prováděny konfirmační testy - kultivace na krevním agaru, pozorování morfologických znaků a biochemické testy (test na katalázu, oxidázu, růst při 42 °C aerofilně a 25 °C mikroaerofilně [3]). Na obrázku 2 je vyfocen typický nárůst kampylobaktera na columbia agaru, kolonie jsou šedé až světle hnědé s nepravidelnými okraji.



Obrázek 2 *Campylobacter jejuni* na Columbia agaru (42 °C, 48 H); (foto autor)

- ***Escherichia coli***

Ke stanovení *Escherichia coli* se využívá již spíše rychlých metod, které dokáží rozlišit jednotlivé sérotypy. V potravinách se stanovuje současně s koliformními mikroorganismy, které poukazují na fekální znečištění, a to podle normy ČSN ISO 4831 – Stanovení koliformních mikroorganismů v potravinách metodou MPN. Využívá se devíti zkumavek s plynovkou s tekutou EC půdou (půda s tryptózou a laurylsulfátem sodným). Zaočkuje se 1 ml vzorku pod plynovku vždy po sobě snižující se ředění. Po 48 hodinách při 30 °C se pozoruje tvorba plynu, sraženiny, zákalu nebo změna barvy indikátoru. Z příloženého návodu se pak odečte kód a odečte se interval, který odpovídá pravděpodobnému počtu mikroorganismů v 1 ml [4]. Na obrázku 3 vidíme typický nárůst *E. coli* na krevním agaru, kde tvoří bílé, slizovité, rozlehlé kolonie.



Obrázek 3 *Escherichia coli* na krevním agaru (37 °C, 24 H); (foto autor)

- **Staphylococcus aureus**

Metoda stanovení koaguláza-pozitivních stafylokoků mezi něž řadíme i *Staphylococcus aureus* se provádí podle normy ČSN EN ISO 6888-1. Podstatou metody je zaočkování určeného objemu vzorku a jeho ředění na povrch selektivní kultivační půdy vždy v dubletu. Inkubuje se při teplotě 35-37 °C po dobu 24–48 hodin. Počet koaguláza pozitivních stafylokoků v mililitru nebo gramu vzorku se získá z počtu typických kolonií následným potvrzením koagulázovým testem.

Stanovení *St. aureus* je založeno na obsahu složek obsažených v arbitrážní půdě podle Baird-Parkera. Základ půdy tvoří pankreaticky natrávený kasein, kvasničný extrakt, masový extrakt, pyruvát sodný, L-glycin, chlorid lithný, agar a voda. K tomuto základu je přidán roztok teluričitanu draselného, žloutková emulze a roztok sulfomethazinu.

Úprava vzorku je dána specifickou normou týkající se typu testovaného vzorku. Inokuluje se 0,1 ml tekutého vzorku nebo výchozí suspenze vždy na dvě plotny. V případě stanovení nízkých počtů se inokuluje 1 ml. Inkubuje se dnem vzhůru při 35-35 °C. Po 24 hodinách se odečítají výsledky. Použijí se plotny obsahující 15-300 kolonií.

Typické kolonie jsou černé, černošedé, někdy dokonce bílé obklopené zónou precipitace, indikující koagulázovou aktivitu. V případě černých a černošedých kolonií se provádí konfirmace - prokázání koagulázové aktivity [5].

Na obrázku 4 je typický nárůst kolonií *Staphylococcus aureus*, který na Baird-Parker agaru tvoří průsvitné kolonie s černým středem.

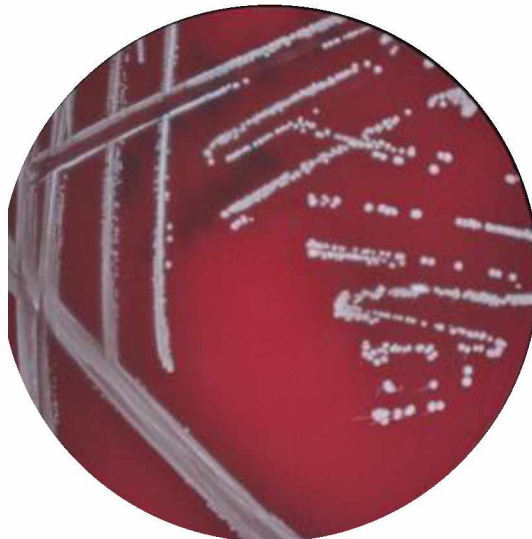


Obrázek 4 *Staphylococcus aureus* na Baird-Parker agaru (35 °C, 24 H); (foto autor)

- **Listeria monocytogenes**

Metoda průkazu se provádí podle normy ČSN EN ISO 11290-1. Průkaz listerií je založen na průkazu β -D-galaktosidázy a nárůstu modrozelených kolonií, fosfolipázy C, kdy dochází ke tvorbě precipitace tzv. halo zóně. Dále pak na hydrolýze eskulinu a nezkvašování manitolu.

Průkaz listerií zahrnuje čtyři po sobě jdoucí kroky. Testovaný vzorek je primárně pomnožen v tekutém selektivním bujónu podle Frasera, tento bujón má pro primární pomnožení poloviční koncentraci nežli pro sekundární a je inkubován při 30 °C, 24 hodin. Po inkubaci se kultura přeočkuje do selektivního média podle Frasera, kde se sekundárně pomnoží. Inkubuje se aerobně při 37 °C, 24–48 hodin. Poté se provede vyočkování na selektivně diagnostické volitelné agary pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA agar) a OXFORD, Rapid´L. mono agar (PALCAM agar). Inkubace probíhá při 37 °C, 24–48 hodin. Pro konfirmační testy přeočkují vybrané kolonie na TSYE agar (agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničným extraktem). Provádějí se testy jako barvení podle Grama, pohyb ve zkumavce, průkaz katalázy, hemolýzy, hydrolýza eskulinu a CAMP test (pro průkaz β -hemolýzy, název testu odvozen od objevitelů- Christie, Aktins, Munch-Peterson) [6]. Na krevním agaru tvoří bílé, drobné kolonie s hladkým povrchem (viz. obrázek 5).



Obrázek 5 *Listeria monocytogenes* na krevním agaru (37 °C, 24 H); (foto autor)

- **Bacillus cereus**

Norma ČSN ISO 7932 udává pokyny pro stanovení počtu presumptivních *Bacillus cereus*. Podstatou je očkování na povrch selektivně diagnostické půdy. Vzorek je odebrán a zpracován na základě příslušných norem daného vzorku. Vždy je očkován určený objem vzorku nebo daného ředění. Výsledek je uváděn v g nebo ml vzorku na základě počtu potvrzených kolonií. Používá se selektivně – diagnostická půda – Mannitol yolk polymyxine B agar (MYP agar), která se zaočkuje 0,1 ml vzorku nebo daným ředěním. Vzorek je kultivován aerobně v zavěšené poloze při 30 °C 18–48 hodin. Hodnotí se misky obsahující 15 až 150 kolonií obsahující charakteristické kolonie, které jsou velké, drsné, růžové a obklopené růžovou zónou precipitace (viz. obrázek 6). Opět je nutné provést potvrzení, pomocí kultivace na krevním agaru, kde tvoří hemolytickou zónu, dále pak předepsanými biochemickými testy a hodnocení morfologie buněk mikroskopicky [7].



Obrázek 6 *Bacillus cereus* na MYP agaru (30 °C, 18 H); (foto autor)

1. 2 Rychlé metody pro stanovení patogenů

Pro rychlou detekci potravinových patogenů je využíváno především biochemických a molekulárně-biologických technik. Jsou to vhodné alternativy k mikrobiologickým metodám, možností jsou především detekce pomocí biosenzorů [8–10], polymerázová řetězová reakce (PCR z angl. Polymerase Chain reaction) [11, 12] nebo ELISA metody (z ang. Enzyme-linked immunosorbent assay) [13]. Tyto metody jsou selektivní a vysoce specifické.

1. 2. 1 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA, z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je metoda využívající specifické afinitní reakce mezi antigenem a protilátkou.

Je dělena podle provedení na nekompetitivní (sendvičová) a kompetitivní (přímá, nepřímá). S ohledem na velikost antigenu, je v případě bakterií nejběžnější uspořádání sendvičové [14].

Využívá dvou protilátek, z nichž jedna, označována jako primární je imobilizovaná na pevnou fázi. Na primární protilátku je následně afinitně vázán stanovovaný antigen (bakteriální buňky nebo toxiny) ze vzorku. Nenavázané složky jsou poté vymyty a je přidána protilátka značená enzymem, která se váže na komplex primární protilátky s antigenem také afinitně. Přebytečné sekundární protilátky jsou opět vymyty. Takto připravený komplex je pak detegován pomocí přidaného substrátu, který je enzymem konvertován na produkt, jehož signál je monitorovaný. Ke značení se využívá různých enzymů, nejčastěji křenová peroxidázy, β -galaktosidázy či alkalické fosfatázy. Deteguje se pomocí optických metod jako je spektrofotometrie, fluorescenční nebo luminiscenční detekce. Vhodnou alternativou jsou pak elektrochemické imunosenzory [14, 15].

Tohoto uspořádání ELISA metody ve formě komerční testovací soupravy (BIOLINE) bylo využito např. pro stanovení Staphylokokových enterotoxinů, enterotoxinů *E. coli* v mléku 68 CFU/ml nebo v hovězím mase $6,8 \times 10^3$ CFU/ml, nebo Salmonelly 1 CFU/25 g vzorku [15–17].

1. 2. 2 Systém VIDAS

V poslední době jsou k detekci potravinových patogenů využívány automatizované systémy ELISA jako jsou např. VIDAS (z angl. Vitek ImumunoDiagnostic ASsay). Jedná se o automatizovaný imunoanalytický systém, který je založený na principu fluorescenční imunoanalýzy (FIA) [18–20].

Celá analýza trvá 45-120 minut. Systém VIDAS zahrnuje použití reagenčního proužku a plastové trubičky (SPR), na které jsou vázány protilátky.

Kapalný vzorek je umístěn na reakční proužek, který obsahuje všechna potřebná činidla. SPR slouží jako pipeta a zároveň jako pevná fáze pro stanovení. Přístroj provede fluorescenční imunoanalýzu automatickým přenosem vzorku do SPR, která má na své vnitřní straně navázané protilátky sloužící pro záchyt cílového patogenu nebo toxinu ze

vzorku. SPR se automaticky přenesou do řady jamek, které obsahují sekundární protilátky označené enzymem alkalickou fosfatázou. Navázaný enzym katalyzuje štěpení substrátu za vzniku fluorescenčního produktu. Výsledek je pak hodnocen jako pozitivní či negativní [21, 22].

Tato metoda byla využita např. pro stanovení *Salmonelly* spp. ve vzorku pórku, *Listeria monocytogenes* v hovězím mase, nebo *E. Coli* O157-H7 v sýru [15, 16].



Obrázek 7 VIDAS systém, dostupné z: -<http://www.medicaexpo.com/prod/biomerieux/product-70644-616369.html>, <https://www.biomerieux.pl/diagnostyka-kliniczna/produkt/vidasr> (staženo 25. 3. 2019)

1. 2. 3 Metoda PCR – Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase ChainReaction) je metoda založená na zmnožení specifického úseku DNA a jeho detekci. PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybrané DNA pomocí DNA-polymerázy, a to ve směru od 5' k 3' konci.

Metodu můžeme rozdělit do tří základních kategorií -jednoduchá polymerázová reakce (PCR), multiplexní polymerázová řetězová reakce (mPCR), a polymerázová řetězová reakce v reálném čase/ kvantitativní (qPCR).

Jednoduchá polymerázová reakce je nejčastěji používaná metoda molekulární analýzy pro detekci potravinových patogenů. Umožňuje detekci potravinového patogenu přítomného v potravinách detekcí specifické cílové sekvence DNA. PCR byla použita při detekci častých potravinových patogenů jako *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus* 1×10^4 CFU/ml v syrovém mléce, *Campylobacter jejuni* nebo *Salmonella* spp. o koncentraci 4 CFU/ 25 g vzorku [23].

Multiplexní PCR je oproti ní jednoduchá a rychlejší při současném zesílení genových cílů. Rozdílem je využití více specifických primerů zatímco u jednoduché PCR se využívá pouze jedna sada specifických primerů. mPCR je možné stanovit pět a více

patogenů současně. Chen a kol.(2012) využili tuto metodu pro stanovení *E. coli* O157:H7 v koncentraci 5×10^4 CFU/ml, *St. aureus*, *Salmonella* spp. 10^3 CFU/ml nebo *Listeria monocytogenes* 10^3 CFU/ml [24, 16].

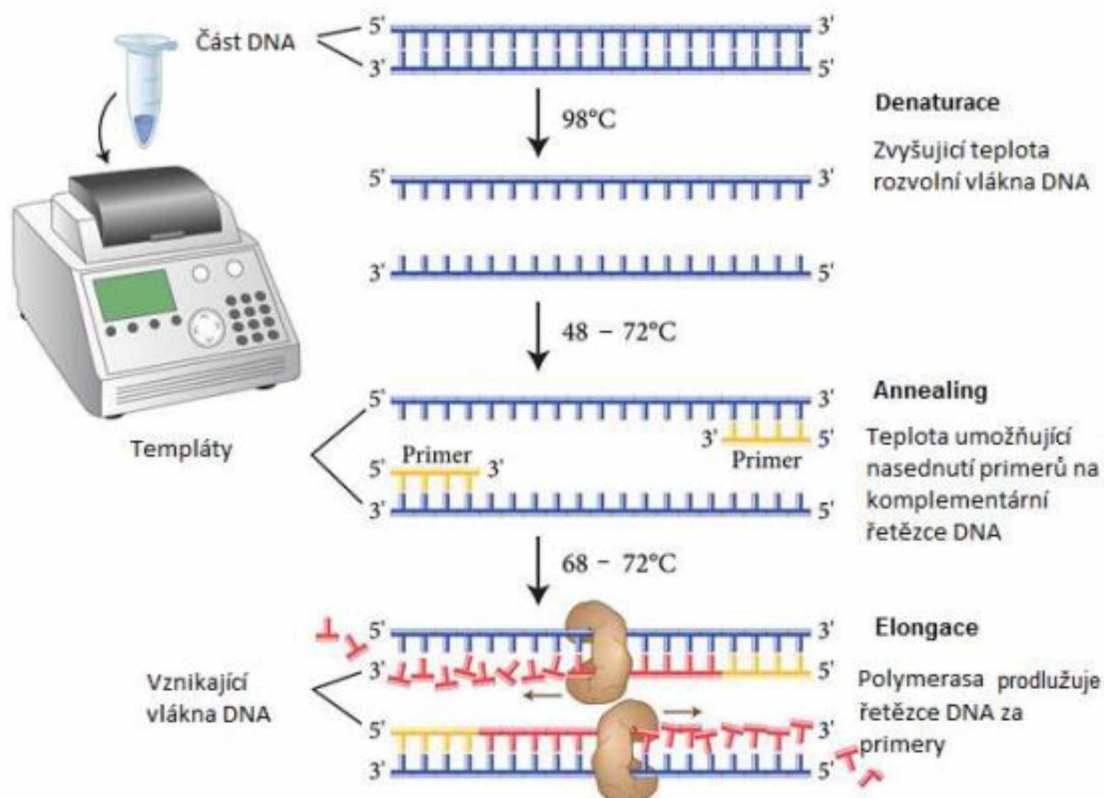
PCR v reálném čase nevyžaduje pro detekci patogenů vyhodnocení pomocí elektroforézy na rozdíl od jednoduché PCR, ale sleduje průběh celé reakce měřením fluorescenčního signálu, poskytovaného přímo použitými sondami. Intenzita fluorescence je úměrná množství ampliconů PCR. Těto metody využil Hu a kol. (2014) při detekci *Listeria monocytogenes* v množství ≤ 18 CFU/10 g ve vzorku mletého hovězího masa, *Salmonella enterica*, *E. coli* a *Campylobacter jejuni* [24, 16].

Zavedení metody PCR v mikrobiální diagnostice ve výzkumných laboratořích se stalo rutinní záležitostí a slouží jako alternativa tradičních detekčních metod. Vyžaduje malé množství materiálu a kromě toho, že je rychlá, selektivní a specifická, má také velmi nízké detekční limity. Výhodou je také její robustnost. Může být i automatizována [25, 26]

Detekční limit PCR se pohybuje v rozmezí 10^3 – 10^4 buněk/ml vzorku, kterého je potřeba na reakci pouze malé množství a musí být předem obohacen. U tradičních detekčních metod se pohybují detekční limity 1 buňka/25 g vzorku. Nejdůležitějšími parametry jsou obvykle kvalita šablony DNA, čistota činidel a teploty dosažené během reakce. Ke zvýšení účinnosti se potravinová matrice před analýzou pomocí PCR upravuje podle druhu vzorku.

PCR Probíhá ve třech krocích lišících se teplotou, zahrnují denaturaci, hybridizaci (annealing) a syntetickou fázi (elongaci). Na obrázku 8 je znázorněn průběh metody PCR.

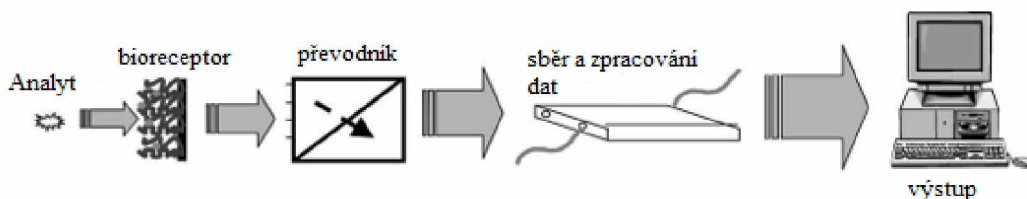
V první fázi je cílová DNA denaturována za vysoké teploty na jednořetězcovou DNA. Následně dochází k renaturaci dvou řetězců syntetických oligonuklidů, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Takto připravené řetězce zvané primery slouží jako předloha pro syntézu nového řetězce DNA. Polymerační proces, při kterém se primery komplementární k jednořetězcové DNA prodlužují vlivem přítomnosti enzymu DNA-polymerázy. Produkty jsou pak vizualizovány ethidium bromidem po elektroforetické separaci, jako pásy [25–27, 23].



Obrázek 8 Průběh metody PCR, převzato a upraveno z [45]

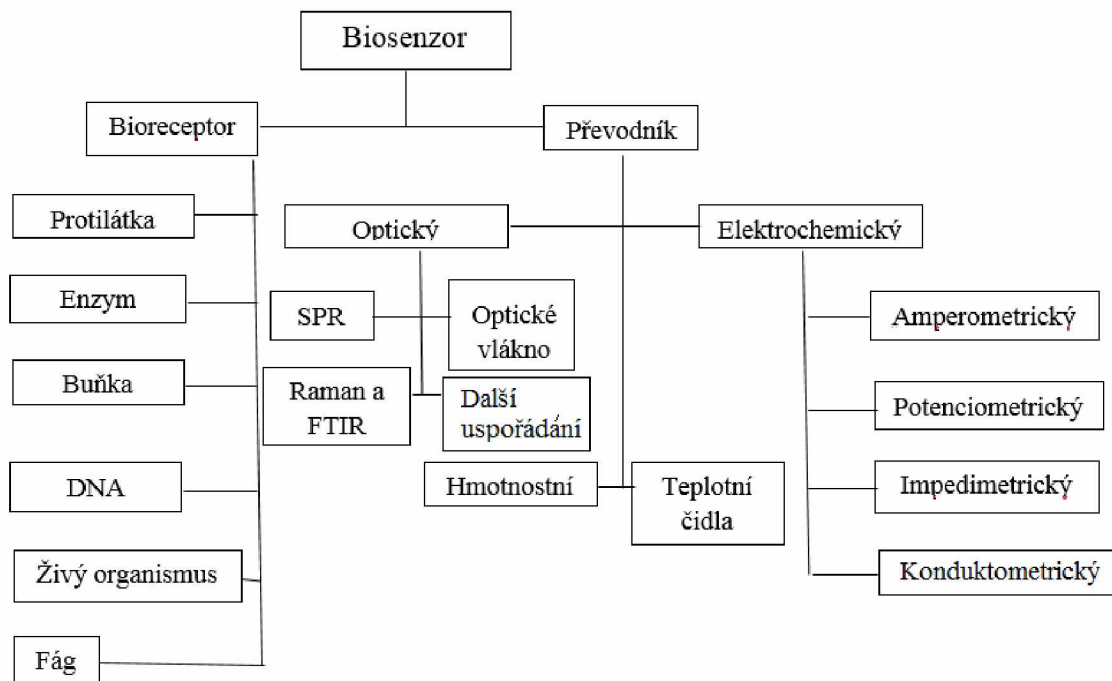
1. 2. 4 Využití biosenzorů ke stanovení potravinových patogenů

Biosenzory jsou analytická zařízení, která přeměňují biologickou odezvu na elektrický signál, který je úměrný koncentraci sledovaného analytu. Biosenzor se skládá ze dvou hlavních částí: bioreceptoru, který rozpozná cílový analyt, a převodníku pro převedení na měřitelný elektrický signál (viz. obrázek 9)



Obrázek 9 Schéma zobrazující hlavní součásti biosenzoru, převzato a upraveno z [17]

Bioreceptorem může být tkáň, enzym, buňka, protilátka, DNA atd. Bioreceptor rozhoduje o citlivosti a selektivitě biosenzoru. Převodníky jsou děleny na optické a elektrochemické, hmotnostní nebo teplotní čidla. Podrobnější rozdělení ukazuje schéma na obrázku 10 [28–30].



Obrázek 10 Přehled druhů biosenzorů, převzato a upraveno z [11]

Vývoj v oblasti biosenzorů přináší zlepšení citlivosti a selektivity při detekci potravinových patogenů. Detekce je rychlá, spolehlivá a efektivní [29, 30].

Kombinace biochemických receptorů (protilátka, enzymy, nukleové kyseliny atd.) s fyzikálním nebo fyzikálně-chemickým převodníkem umožňuje ve většině případů pozorovat specifické biologické reakce (např. interakce mezi antigenem a protilátkou). Umožňují tak detekci širokého spektra analytů i ve složitých maticích vzorků.

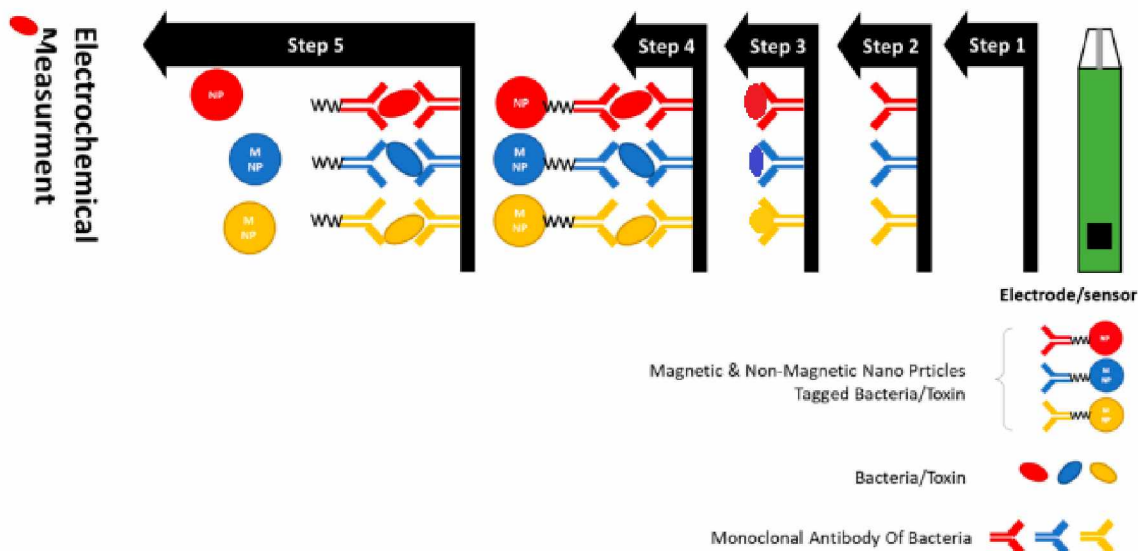
Ideální biosenzor je takový, který poskytuje odezvu v „reálném čase“, zvláště v případě detekce rychle se kazících potravin. Měl by snadno rozlišovat cílový organismus nebo toxiny. Měl by být odolný vůči tepelným změnám, pH nebo změně iontových sil. Měl by být citlivý, specifický, reprodukovatelný a robustní [30, 31].

1. 2. 5 Elektrochemické imunosenzory

Elektrochemické imunosenzory jsou jedním z uvedených typů biosenzorů, které jsou využívány pro detekci bakterií. Jsou založeny na afinitní interakci mezi antigenem (bakteriální buňkou) a protilátkou s následnou elektrochemickou detekcí. Obvykle se provádí imunoanalýza na pevné fázi. Tou může být mikrotitrační destička, trubičky, kapiláry, pevné částice (nemagnetické nebo magnetické povahy) [32] nebo přímo povrch elektrody [9], na které se provádí výsledné měření. Podle pořadí navázání protilátek

a protilátek značených rozlišujeme dva typy stanovení. Jedná se o stanovení přímé nebo nepřímé. V případě přímé detekce reaguje značená protilátka přímo s antigenem. Při nepřímém stanovení se využívá primární protilátka a sekundární značené protilátky. Na obrázku 11 je vidět schéma celé reakce kde detekce probíhá přímo na povrchu elektrody [11, 27, 30, 33].

U elektrochemických biosenzorů jsou pro biologické vzorky měřené signály obecně elektronické povahy. Výsledný signál je pak generován buď změnou vodivosti, impedance nebo změnou proudu při akumulaci náboje. Změnu můžeme pak měřit konduktometricky, amperometricky nebo potenciometricky [27, 30, 33].**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**



Obrázek 11 Nepřímá metoda detekce bakterií pomocí sendvičového uspořádání, převzato a upraveno z [11]

1. 2. 6 Využití nanomateriálů pro detekci potravinových patogenů

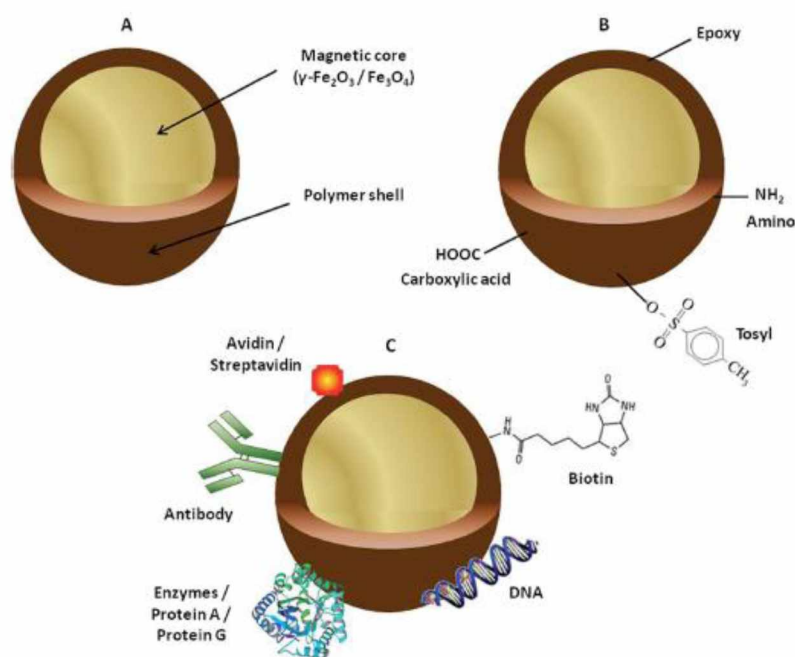
Biosenzory jsou perspektivní alternativou k tradičním analytickým metodám a pravděpodobně i jeden z nejslibnějších způsobů řešení jednoduchosti a rychlosti detekce potravinových patogenů. Obvykle používané enzymy mohou být v tomto případě nahrazovány i elektroaktivními nanomateriály [31, 34].

Vývoj v oblasti nanotechnologií umožňuje variabilitu v oblasti biosenzorů, kde jsou nanomateriály výhodné z hlediska detekce, kde přináší zvýšení výsledného signálu. Jedná se o nanomateriály jako jsou magnetické nanočástice (MNP), zlaté nanočástice (AuNPs), uhlíkové nanotrubičky (CNT), nanorody (NRs), kvantové tečky (QDs), nanodrátky (NWs), nanokanáčky (NC) atd. [34–36].

Magnetické částice

Magnetické částice (MNP) jsou díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem vysoce funkčním materiálem vhodným pro použití v biomedicíně, potravinářství pro záchyt buněk. Jejich výhodou je manipulace působením vnějšího magnetického pole. Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických nosičů jsou oxidy železa, maghemit, magnetit a jejich směs, nebo různé typy feritů ve formě magnetických kapalin či prášků [34, 37].

Výhodou magnetických částic je, že na ně mohou být navázány různé ligandy obsahující funkční skupiny, a slouží tak jako efektivní nosič pro immobilizaci biologicky aktivních látek (viz. obrázek 12). Magnetické částice mohou být následně modifikovány specifickými protilátkami na něž se zachytí a izolují cílové patogeny [34, 37].



Obrázek 12 Magnetické částice: nemodifikované částice (A), s aktivními funkčními skupinami (B) a konjugované s biologickými molekulami (C), převzato z [32]

Kvantové tečky

Kvantové tečky (QDs) jsou polovodičové nanokrystaly syntetizované z anorganických polovodičových materiálů jako jsou selenid nebo tellurid kadmia, fosfid india atd. Velikost kvantových teček se pohybuje v rozmezí 1-20 nm. Mají vynikající vodivost, elektro-katalytickou aktivitu, velký povrch vhodný pro elektrochemické biosenzory a dobré optické vlastnosti, které jsou vhodné pro optické biosenzory [34, 36].

Jejich vlastností ve spojení s biosenzory využil Zhong a kol. (2019) při stanovení *Escherichia Coli* O157:H7 v mléce za použití diferenčně pulzní voltametrie, kdy CdS QDs použil pro značení sekundárních protilátek. Stanovené množství odpovídalo 30 CFU/ml [38].

Dále pak Yu a kol. (2017) použil CdTe/CdS QDs pro značení sekundárních anti-*E. coli* protilátek a pomocí nich stanovili *E. coli* ve vzorku mléka s limitem detekce 10^4 CFU/ml [35].

Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice (AuNPs) se využívají díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a jednoduché syntéze [39].

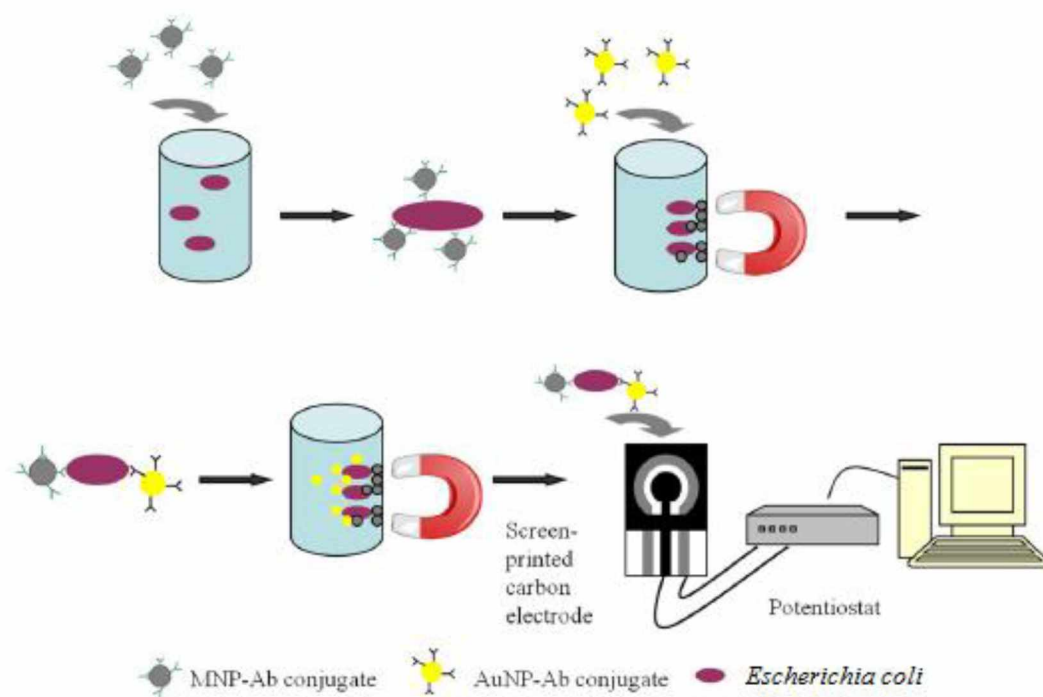
Na obrázku 13 je znázorněn celý postup elektrochemické detekce patogenu pomocí AuNPs značených protilátek, který použil Hassan a kol. (2015). V prvním kroku dochází k navázání bakterií na magnetické částice s imobilizovanými protilátkami, v kroku druhém se přidají zlatými nanočásticemi značené protilátky a celý komplex detegoval na tičtých uhlíkových elektrodách chromamperometrickou detekcí. Stanovili tak *Escherichia coli* ve vzorcích vody a hovězím mase, kde prokázali široký rozsah detekce 10^2 - 10^4 CFU/ml [40]. Silva, Magalhaes a kol. (2019) za použití zlatých nanočástic stanovili bakteriální buňky *Salmonella* Typhymurium v jablečném džusu. Komplex byl tvořen na PVC membráně pokryté AuNPs, která byla součástí elektrody. Limit detekce potenciometrického biosenzoru v tomto uspořádání byl 6 CFU/ml [41]. Zlaté nanočástice také použil také Oh a kol. (2017) při stanovení *Salmonella* Typhimurium ve vepřovém mase, kde limit detekce byl 10^4 CFU/ml, zlaté nanočástice, které byly součástí snímacího čipu, na němž tvořily monovrstvu a byly detegovány biosenzorem na

principu povrchové

plasmonové

rezonance

[42].



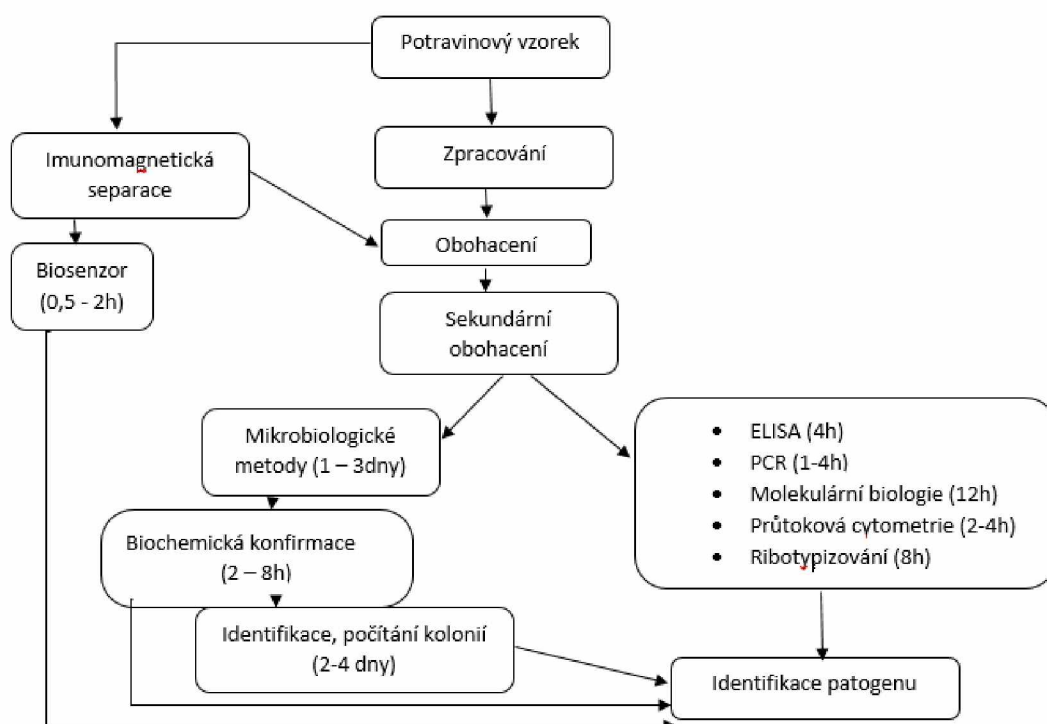
Obrázek 13 Princip biosenzoru pro detekci *Escherichia coli* pomocí protilátek značených zlatými nanočásticemi, převzato a upraveno z [40]

1. 2. 7 Porovnání vybraných metod

Obrázek 14 popisuje sled jednotlivých kroků, které jsou prováděny při identifikaci patogenních mikroorganismů v potravinách. Jak již bylo zmíněno, tradiční metody detekce jsou časově náročné a obsahují mnoho kroků.

Tabulka 1 přehledně shrnuje výhody a nevýhody rychlých metod. Volba mezi rychlou a klasickou metodou však závisí vždy na konkrétním účelu analýzy.

Rychlé metody jsou vhodné pro odhalení rizikových potravin a zabránění tak případnému alimentárnímu onemocnění. Při propuknutí onemocnění je stále důležitá biochemická konfirmace pro stanovení léčby.



Obrázek 14 Schéma ilustrující příslušné kroky zpracování vzorku a přibližnou dobu analýzy. Převzato a upraveno z [44].

Tabulka 1 Výhody a nevýhody jednotlivých rychlých metod. Převzato a upraveno z [43]

Detekční metoda	Výhody	Nevýhody
A) Na bázi nukleových kyselin		
Jednoduchá PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoce citlivé - Vysoce specifické - Automatizovatelné - Reprodukovatelné výsledky 	<ul style="list-style-type: none"> - Ovlivněno inhibitory PCR, vyžaduje čištění DNA - Těžké rozlišit živé a neživé buňky
Multiplexní PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoce citlivé - Vysoce specifické - Možnost detekce více patogenů - Automatizovatelné - Reprodukovatelné výsledky 	<ul style="list-style-type: none"> - Ovlivněno inhibitory PCR - Komplementarita závisí na použitém primeru - Těžké rozlišit živé a neživé buňky
PCR v reálném čase	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoce citlivé - Vysoce specifické - Reprodukovatelné - Rychlé (čas) - Bez nutnosti post-amplifikační úpravy produktu 	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoká cena - Ovlivnění inhibitory PCR - Vyžaduje zkušený personál - Může dojít ke křížové kontaminaci
B) Využití biosenzoru		
Optické biosenzory	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoká citlivost - Detekce v reálném čase - Beznačkové (z ang. label-free) 	<ul style="list-style-type: none"> - Vyšší cena
Elektrochemické biosenzory	<ul style="list-style-type: none"> - Pro velké série vzorků - Automatizovatelný - Beznačkové (z angl. label-free) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nízká specifita - Omezení pro analýzu vzorků s nízkým počtem mikroorganismů - Interference matrice
Hmotnostní biosenzory	<ul style="list-style-type: none"> - Nákladné - Snadná obsluha - Beznačkové - Detekce v reálném čase 	<ul style="list-style-type: none"> - Nízká specifita - Nízká citlivost - Dlouhá doba inkubace bakterií - Řada dílčích kroků
C) Imunoanalytické		
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoce specifická - Může být automatizována - Detekce více bakterií či toxinů - Může pracovat s velkým počtem vzorků 	<ul style="list-style-type: none"> - Méně citlivá - Falešně negativní výsledky - Vyžadováno obohacení vzorku - Vyšší cena

2. BAKTERIÁLNÍ KONTAMINACE MLÉKA

Cílem této práce je sestavit elektrochemický imunosenzor pro detekci bakterií, který by byl využitelný pro průkaz případné kontaminace mléka.

Mikrobiální čistota je nejvýznamnějším požadavkem na jakost mléka. Mléko je pro člověka bohatou potravinou na živiny, ale na druhé straně je vhodným prostředím pro růst mikroorganismů, a to kvůli neutrálnímu pH a vysoké vodní aktivitě. Některé mikroorganismy využívají tyto živiny obsažené v mléce přímo a některé mikroorganismy rozpoutávají jejich metabolismus.

Mikrobiální čistota ovlivňuje trvanlivost mléka a jeho technologickou zpracovatelnost. K určování jakosti syrového mléka se využívá mikroskopického hodnocení mikroflóry, pomocí enzymatických zkoušek jsou pak sledovány produkty metabolismu bakterií přítomných v mléce [44, 45].

Průměrné množství bakterií stanovené kultivační metodou u kravského mléka získaného ze zdravého vemene se uvádí 10^5 CFU/ml, u ostatních druhů mléka až 10^6 CFU/ml, mezi tyto bakterie však neřadíme patogenní bakterie [45–47].

2. 1. Zdroje kontaminace

Ke kontaminaci může docházet buď primárně nebo sekundárně. Primární kontaminaci způsobují bakterie obsažené ve strukových kanálcích, mikroorganismy z povrchu vemene a prostředí, ve kterém je kráva dojena (výkaly, krmivo, půda). Dále pak záleží na hygienických podmínkách v průběhu přepravy, a při jeho dalším zpracování [45, 47].

Sekundární kontaminace je způsobena množением mikroorganismů v důsledku primární kontaminace. Je ovlivněna dobou chlazení mléka po nadojení, teplotou chlazení a časem růstu mikroorganismů, za daných podmínek [47].

2. 2 Mikroorganismy způsobující kažení syrového mléka

Při sledování mikrobiální kvality mléka se sleduje celkový počet mezofilních mikroorganismů, dále pak koliformní bakterie, termorezistentní mikroorganismy, sporotvorné anaerobní bakterie, bakterie mléčného kvašení a psychrofilní mikroorganismy [45, 47].

Koliformní bakterie slouží jako indikátor fekálního znečištění mléka, ke kterému může docházet, jak primárně, tak sekundárně. Inaktivovány jsou při tepelném zpracování

mléka. Patří sem rody *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Escherichia*. Běžně se vyskytují v zažívacím traktu lidí a zvířat [45, 47].

Termorezistentní mikroorganismy přežívají i pasterační záhřev ($> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$). Patří sem rod *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*. Důležitou skupinou bakterií vyskytující se v mléce jsou především enterokoky. Vyskytují se ve fekáliích lidí a zvířat. Enterokoky nepovažujeme za přímé ukazatele fekálního znečištění, ale pouze za indikátory nedostatečné sanitace zařízení pro zpracování mléka [45, 47].

Sporotvorné anaerobní mikroorganismy se mohou nacházet na povrchu vemene a struků. Spory jsou vysoce odolné vůči prostředí, přežívají v půdě, prachu, a to po dlouhou dobu. Poukazují na celkovou čistotu prostředí. Nejčastěji se vyskytují spory bakterií rodu *Bacillus*, v malém množství pak např. bakterie rodu *Clostridium*. Spory přežívají i pasterační záhřev. Při nedostatečné sterilizaci způsobují nejen vady trvanlivého mléka, ale i zrajících sýrů [45, 47].

Bakterie mléčného kvašení se mohou vyskytovat buď jako kontaminanty potravin, nebo se používají jako šlechtěné varianty využívající se v čistých mlékárenských kulturách. Patří sem několik rodů bakterií s podobnými fyziologickými znaky. Jsou to G^+ , nesporetné, fakultativně anaerobní bakterie. Vyskytují se jak ve tvaru tyčinek, tak koků. Bakterie mléčného kvašení mohou být homofermentativní, kdy fermentují sacharidy na kyselinu mléčnou, nebo heterofermentativní, kdy dochází kromě kyseliny mléčné i ke tvorbě ethanolu, oxidu uhličitého, kyseliny mravenčí, kyseliny octové a jablečné. Rody patřícími do této skupiny jsou *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* [48].

Psychrotrofní mikroorganismy se mohou množit i při teplotách pod $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při pasteračním záhřevu nejsou zcela usmrceny a zhoršují technologické vlastnosti mléka. Do mléka se dostávají primární kontaminací z krmiv, kontaminované vody nebo z prachu. K sekundární kontaminaci psychrofilními bakteriemi dochází při nedostatečné dekontaminaci ploch, se kterými může syrové mléko přijít do styku. Patří sem např. rody *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria* [45, 47].

2. 3 Patogeny vyskytující se v mléce

Nejčastějšími patogeny jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogene*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* nebo *Bacillus cereus*.

2.3.1 *Escherichia coli*

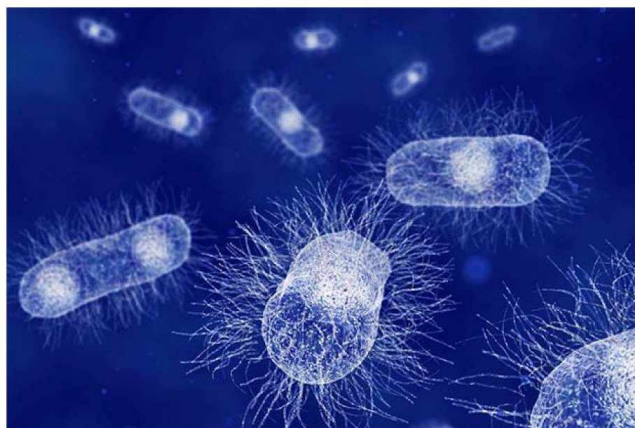
Escherichia coli je běžně se vyskytující bakterie v gastrointestinálním traktu lidí a teplokrevných zvířat. Jako součást bakteriální mikroflóry. Zatímco většina kmenů je nepatogenních a v některých případech se mohou používat i jako probiotika zabraňující průniku a rozšíření patogenních bakterií, některé kmeny mohou být patogenní, neboť jsou schopny produkovat toxiny a způsobovat tak vážné infekce [49].

Hlavním zdrojem alimentárních infekcí je kontaminovaná voda a potrava. Ke kontaminaci dochází především při špatném hygienickém zpracování a zacházení s potravinami hlavně na místech kde může docházet ke styku s fekáliemi. Mezi rizikové potraviny patří nedostatečně tepelně opracované maso a masné výrobky či mléko [49–52].

Escherichia coli je G^- , fakultativně anaerobní tyčinka (viz. obrázek 15) se zaoblenými konci mající bičík, který umožňuje pohyb, a je pokryta fimbriemi, které zajišťují adhezi na hostitelskou buňku.

Infekční dávka 10 buněk. Inkubační doba 2-4 dny. Způsobuje břišní křeče, hemoragické průjmy, někdy se může objevit i horečka nebo zvracení. Tyto problémy mohou přetrvávat až 10 dní, avšak pro některé jedince to může být až život ohrožující onemocnění [28, 52, 53].

Je známo přibližně 200 druhů sérotypů, z toho polovina je spojena s onemocněním lidí. Sérotypy jsou definovány pomocí O a H antigenů. Somatický (tělový) O-antigen je endotoxický lipopolysacharid, který je termostabilní a má antigenní vlastnosti i po projití varem. Kdežto H-antigen je flagelární (bičíkový), vyskytuje se u pohyblivých kmenů *E. coli* a jsou tvořeny polymerázovou bílkovinou [49, 50].



Obrázek 15 *Escherichia coli* O157: H7, 3D ilustrace; převzato z [54]

2. 3. 2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je bakterie významně ovlivňující zdravotní nezávadnost syrového mléka. Vyvolává stafylokokové otravy z potravin (SFE), způsobené intoxikací stafylokokovými enterotoxiny (SE), které produkují toxinogenní kmeny *St. aureus*. Intoxikace se projevuje průjemem, zvracením, bolestmi hlavy. Dále se podílí na různých dalších onemocněních např. kožních infekcích, osteomyelitidě (hnisavé onemocnění kostí) nebo syndromu toxického šoku [28, 47, 53].

Jedná se o G^+ , fakultativně anaerobní koky o velikosti 0,5 - 1 μ m, které jsou nepohyblivé a shlukují se do tvaru hroznů (viz. obrázek 16). Optimální teplota růstu je 37 °C, může však růst v rozmezí 10–45 °C. Při teplotě nižší než 10°C není již schopen tvořit toxiny, ale přežívá i při nízké vodní aktivitě vody [47, 53].

Enterotoxiny produkované *St. aureus* jsou rezistentní k proteolytickým enzymům zažívacího traktu a jsou termostabilní. Infekční dávkou pro člověka je 10^3 – 10^8 buněk. Nebezpečná hladina enterotoxinů uvolněná do potravin je 10^8 buněk/kg potravin a 20 ng enterotoxinu v potravine může způsobit mírnou intoxikaci [28, 53].

St. aureus vyskytující se v syrovém mléce SE neprodukuje. K jeho kontaminaci může docházet částicemi prachu k nimž stafylokoky adherují nebo při jeho produkci, kdy může docházet ke kontaminaci způsobené zánětlivým onemocněním (mastitidy). U některých jedinců přežívají na sliznici dutiny ústní nebo nosní, na pokožce nebo v gastrointestinálním traktu. Také jsou součástí běžné mikroflóry mléčných žláz.

St. aureus se může vyskytovat i ve vzduchu, prachu, vodě, mléce a mnoha potravinách [28, 55].



Obrázek 16 *Staphylococcus aureus*; elektronová skenovací mikroskopie; převzato z [56]

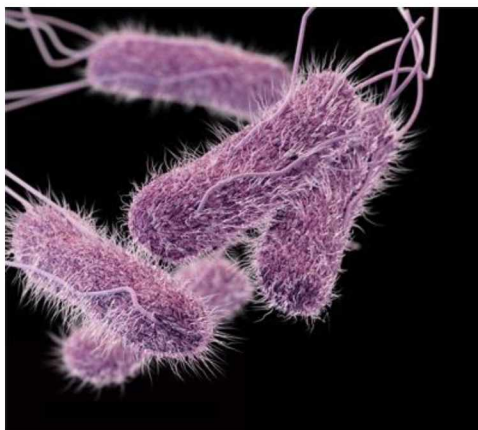
2. 3. 3 *Salmonella* spp.

Jedná se o patogenní bakterii ve tvaru tyčinek, G^- , fakultativně anaerobní, většinou pohyblivých díky svým bičíkům (viz. obrázek 17). Patří do čeledi Enterobacteriaceae. Pro člověka a teplotokrevné živočichy je patogenní *Salmonella enterica*, do které spadají sérotypy – *S. Enteritidis*, *S. Typhi* a *S. Typhimurium*. Salmonely přežívají ve střevech lidí a zvířat. Bylo izolováno několik sérotypů. Některé druhy se mohou vyskytovat u zvířat bez jakýchkoliv příznaků, jiné mohou způsobovat těžké infekce [55, 57].

Optimální teplota růstu je 37 °C. Množí se však v širším rozmezí teplot (10-45 °C), ničí ji pouze pasterační teploty. Chlazení zabraňuje množení, ale nevede k usmrcení bakterií, proto pak salmonela po požití kontaminované potravy může způsobovat gastroenteritidu. Onemocnění způsobené salmonelami označované jako salmonelóza, projevuje se nevolností, zvracením, průjmem může být doprovázeno horečkami, akutním střevním zánětem nebo břišními křečemi.

Onemocnění může způsobit 15-20 buněk, množství záleží na věku, zdravotním stavu člověka a také na druhu salmonely. Inkubační doba je obvykle 12 až 24 hodin [28, 52, 53].

K infekci dochází především prostřednictvím fekální kontaminace potravinářských produktů, vody nebo přímým kontaktem s nakaženými zvířaty či lidmi. Kontaminovány jsou především potraviny živočišného původu, vejce, maso, syrové mléko [29, 53, 55, 58, 59].



Obrázek 17 *Salmonella Typhimurium*; 3D ilustrace upravená počítačem, převzato z [60]

2. 3. 4 *Listeria monocytogenes*

V případě *Listeria monocytogenes* můžeme mluvit o oportunnímu patogenu, tedy velmi odolným mikroorganismu, který se může vyskytovat ve vodě, bahně, odpadních vodách, výkalech lidí i zvířat.

Zdrojem nákazy jsou zejména potraviny živočišného původu jako jsou: mléko, mléčné výrobky, maso a výrobky z něj. Mezi rizikové potraviny patří i listová zelenina. Především zelenina pěstovaná na půdě hnojené hnojem nebo půdě kontaminované odpadními vodami [61–63].

Ke kontaminaci může dojít při nedodržení hygienických podmínek při dojení mléka, nebo při špatné úpravě potravin. Za zdroj kontaminace skotu může být zodpovědná i nedostatečně fermentovaná siláž [63–65].

Vyvolává onemocnění zvané listerióza. Nejvíce rizikovou skupinou jsou lidé se sníženou imunitou, novorozenci, u těhotných žen způsobuje potraty nebo narození mrtvého dítěte. Doba inkubace je v rozmezí 2 dny až 3 týdny. Infekční dávka je 1000 buněk. Příznaky onemocnění jsou podobné chřipce, člověk trpí bolestmi hlavy, malátností či horečkou, později může docházet k otravě krve [28, 52, 53].

Listeria Monocytogenes je G^+ fakultativně anaerobní tyčinka (viz. obrázek 18) schopna se rozmnožovat i při chladničkových teplotách. Má schopnost růst v širokém rozmezí teplot a pH. Optimální teplota růstu je však 37 °C. K jejímu usmrcení je zapotřebí pasteračních teplot nebo varu [47, 64].

Onemocnění způsobené *Listerií monocytogenes* jsou vzácná, ale mají vysokou míru úmrtnosti [62].



Obrázek 18 *Listeria monocytogenes*, optický mikroskop, převzato z [66]

2. 3. 5 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni jsou G⁻ štíhlé, mírně spirálovité, zakřivené tyčinky (viz. obrázek 19) obvykle s rotačním pohybem. Je mikroaerofilní a termofilní povahy. Tyto vlastnosti brzdí růst tohoto organismu v přírodě a krmivu. Optimální teplota růstu je 42 °C [47, 67, 68].

Patří mezi potravinové patogeny. Způsobuje onemocnění gastrointestinálního traktu tzv. kamylobakteriízy. Jedná se o akutní střevní infekci doprovázenou bolestmi břicha, průjemem, horečkou, bolestmi hlavy a svalů. Onemocnění trvá 5–7 dní. U domácích zvířat může způsobovat potraty.

Campylobacter jejuni je vylučován stolicí a živočišnými sekrety. Ke kontaminaci dojnic dochází po požití špatné vody nebo krmiva kontaminovaného fekáliemi. Infekce člověka nastává po požití kontaminované potravy, vody, ale i kontaktem s nakaženým zvířetem [28, 52, 53].

Infekční dávka u zdravého člověka se udává 400–500 buněk. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 2–5 dní [28, 52, 67, 68].

Předcházet onemocnění je možno dodržováním hygienických postupů při zpracování potravin a jejich dostatečnou tepelnou úpravou. *Campylobacter jejuni* je citlivý na vyšší teploty, dosažením pasteračních teplot dochází k usmrcení. V případě chladničkových teplot přežívá ve vodě, mléce a mraženém drůbežím mase [28, 52, 67, 68].



Obrázek 19 *Campylobacter jejuni*; 3D ilustrace, převzato z [69]

2. 3. 6 *Bacillus cereus*

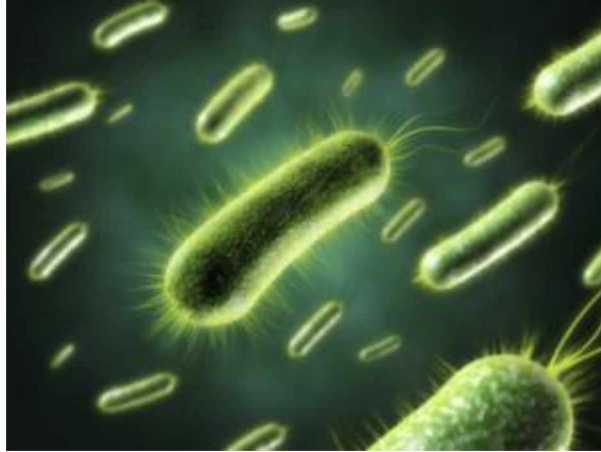
Bacillus cereus je G^+ , fakultativně anaerobní bakterie běžně se vyskytující v půdě, vzduchu, prachu, kde přežívá ve formě spor. Do potravin se dostává kontaminovanými surovinami, kde je přítomna ve formě spor. Ty snáší suché prostředí a přežívají různé teplotní režimy. Při vyšších teplotách potravin dochází ke klíčení spor.

Zdrojem mohou být nevhodně skladované potraviny, které se po kuchyňské tepelné úpravě ponechají při pokojové teplotě. Nejrizikovějšími potravinami jsou vařená rýže, mléko, masné výrobky, ale i zelenina a koření [55, 57, 70, 71].

Bacillus cereus produkuje dva toxiny. Emetický a diarhogenní toxin. Emetický toxin způsobuje nevolnost a zvracení, je termostabilní, doba inkubace 1-6 hodin a doba trvání obtíží 6–24 hodin. Rizikovou potravinou je především vařená rýže, těstoviny a jiné potraviny s vysokým obsahem sacharidů. Diarhogenní neboli průjmový toxin způsobuje vodnaté průjmy a bolesti břicha. Vyskytuje se především v mléčných a masných výrobcích. Doba inkubace je 8–16 hodin, onemocnění pak trvá v rozmezí 12–24 hodin. Tento toxin je inaktivován při teplotě 65 °C po dobu 3 minut.

Onemocnění způsobené touto bakterií má obecně rychlý klinický průběh. Infekční dávka je uváděna 10^5 až 10^8 buněk [55, 57, 70, 71].

K infikaci dochází především prostřednictvím fekální kontaminace potravinářských produktů, vody nebo přímým kontaktem s nakaženými zvířaty či lidmi. Kontaminovány jsou především potraviny živočišného původu, vejce, maso, syrové mléko [53, 55, 58, 59]. Na obrázku 20 můžeme vidět snímek bakterie *Bacillus cereus* z elektronového skenovacího mikroskopu.



Obrázek 20 *Bacillus cereus*, elektronový skenovací mikroskop, převzato a upraveno z [72]

V rámci experimentální části práce jsme se zaměřili na *Campylobacter Jejuni* a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc™ XRS+ System s ImageLab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- magnetické míchadlo s ohřevem MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrozkušavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Termoblok Block heater Grant Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- třepačka Vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Itálie)
- magnetický separátor Dynal – MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- potenciostat MultiEmStat4 + software PStace (PalmSens, Houten, Nizozemí)
- potenciostat EmStat Blue (PalmSens, Houten, Nizozemí)
- tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)
- aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA)
- Dot-blot zařízení (SciePlast Ltd., Cambridge, Velká Británie)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, USA)
- skleněné zkumavky a jednorázové plastové pomůcky (L-hokejky, očkovací misky) (VWR international s.r.o)
- Termostat ST 5.POl-EKO, Polsko

3.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Použité chemikálie:

- Akrylamid (C_3H_5NO) (Sigma - Algrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N' - methylen-bis - akrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$), p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, $C_{12}H_{25}SO_4Na$), p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- Persíran amonný, p.a. ($(NH_4)_2S_2O_8$) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, $C_6H_{16}N_2$) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycin ($C_2H_2NO_2$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- molekulový marker Precision Plus ProteinTMStandards: 10-250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Glutaraldehyd 50 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Základní chemikálie čistoty p.a (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- Vzorkový roztok Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Použité roztoky:

Roztok A: 30 % směs akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu

roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8

roztok C: 1,0 M Tris-HCl pufr, pH 6,8

roztok D: 10 % roztok SDS

roztok E: 10 % roztok persíranu amonného

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin a 0,1 % SDS, pH 8,3 – 8,6

Postup:

Nejprve byla sestavena aparatura. Do držáku byla skla důkladně omytá vodou a lihem a byla připevněna do stojánku. Byl připraven 10 %-ní dělicí gel smícháním roztoků v množstvích uvedených v tabulce 2, nadávkován do prostoru mezi skly, převrstven vodou, aby nedošlo k vyschnutí a nechán 20-30 minut kdy došlo k polymeraci. Po ztuhnutí dělicího gelu byla destilovaná voda odsáta filtračním papírem. Byl připraven

5 %-ní zaostřovací gel smícháním roztoků v množstvích uvedených v tabulce 2, který byl nadávkován na dělicí gel. Do roztoku zaostřovacího gelu byla vložena šablona pro vytvoření 10 - ti jamek. Gel se nechal přibližně 15 minut polymerovat. Po ukončení polymerace byla šablona vyjmuta a jamky propláchnuty elektrodoým pufrem.

Tabulka 2 Množství roztoků pro přípravu gelů pro SDS-PAGE elektroforézu

	5 %-ní zaostřovací gel (ml)	10 %-ní dělicí gel (ml)
Destilovaná voda	1,4	2,0
Roztok A	0,33	1,65
Roztok B	-	1,25
Roztok C	0,25	-
Roztok D	0,02	0,05
Roztok E	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

Připravený gel byl vyjmut ze stojánku a vložen do držáku do nádoby pro elektroforetickou separaci. Skla byla umístěna tak, aby kratší sklo mířilo vždy do středu držáku, a jamky byly uvnitř zcela převrstvený elektrodoým pufrem.

Vzorky byly pro analýzu smíchány v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem (10 μ l vzorku a 10 μ l vzorkového pufru) a tato směs byla inkubována 3 minuty při teplotě 100°C v termobloku. Do jamek bylo dávkováno vždy 20 μ l vzorku Hamiltonovou stříkačkou. Do jedné jamky byl dávkován standard molekulových hmotností, a to v objemu 3 μ l.

Po nadávkování vzorků byla nádoba naplněna elektrodoým pufrem. Elektrodová nádoba byla uzavřena víkem. Bylo nastaveno konstantní napětí 180 V a 30 mA na jeden gel. Elektroforetické dělení probíhalo přibližně 40 minut, dokud bromfenolová modř ze vzorkového pufru nebyla téměř u dolního okraje skel. Po skončení dělení byl vypnut zdroj napětí a vyjmut držák s gely. Gel byl přenesen do Petriho misky, propláchnut destilovanou vodou a obarven.

Barvení gelů roztokem amoniakálního stříbra

Použité roztoky:

- Fixační roztok: 5 % kyselina octová + 50 % etanol (50 ml kyseliny octové + 500 ml etanolu bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1000 ml)
- 10 % roztok glutaraldehydu (10 ml glutaraldehydu + 40 ml destilované vody)
- Vyvolávací roztok: 0,05 % kyselina citrónová + 0,04 % formaldehyd, (500 ml destilované vody + 250 mg kyseliny citrónové + 0,54 ml formaldehydu)
- Ustalovací roztok: 5 % kyselina octová, (950 ml destilované vody + 50 ml kyseliny octové)
- 9 M NaOH: 3,6 g rozpuštěno v 6 ml destilované vody a doplněno na objem 10 ml
- 20 % roztok AgNO₃: 6 g AgNO₃ rozpuštěno ve 30 ml destilované vody
- Roztok amoniakálního stříbra: 20 % roztok AgNO₃ je titrován až do světle béžového zákalu roztoku: 10 ml destilované vody + 0,7 ml NH₃ + 0,119 ml 9 M NaOH, po vytitrování je roztok doplněn na objem 50 ml.

Postup:

Po elektroforetické separaci byl gel vyjmut z aparatury a propláchnut destilovanou vodou. Následovala fixace ve fixačním roztoku buď přes noc při 4 °C nebo 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po fixaci byl gel rehydratován v destilované vodě po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byl gel inkubován 30 minut v 10 % roztoku glutaraldehydu při laboratorní teplotě. Následovalo promývání gelu destilovanou vodou 6 x 10 minut. Po promytí byl gel inkubován 15 minut v roztoku amoniakálního stříbra. Po inkubaci byl gel opláchnut destilovanou vodou a převrstven vyvolávacím roztokem. Nakonec byl gel převeden do ustalovacího roztoku, ve kterém byl skladován.

3.3 Dot-Blot analýza

Použité chemikálie:

- polyklonální králičí anti-*Salmonella* spp. protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- Monoklonální myši anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG2, koncentrace 0,2 mg/ml, Thermo Scientific, USA)
- Sekundární protilátky (konjugát) anti-myši IgG-HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA, čistota ≥ 96 %), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Substrátový roztok: barvení pomocí chlornaftolu (Opti-4CN™ kit (BioRad, USA), Opti-4CN™ Diluent (10,8 ml redestilované vody + 1,2 ml činidla), Opti-4CN™ Substrate (240 μ l/12 ml)
- Buněčný lyzát: suspenze bakterie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 43971 (Institut Pasteur Francie) v pufru PBS

Použité roztoky:

- Ekvilibrační a promývací roztok: PBS-T pufr pH 7,4 (PBS s 0,25 % Tween 20)
- Blokovací roztok: 5 % BSA v PBS-T
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25 % BSA v PBS-T
- Roztok pro ředění sekundární značené protilátky: PBS-T pufr pH 7,4
- Negativní kontroly: 3 μ g BSA ve 100 μ l PBS-T pufru a 10 mM fosfátový pufr pH 7,3 (100 μ l)

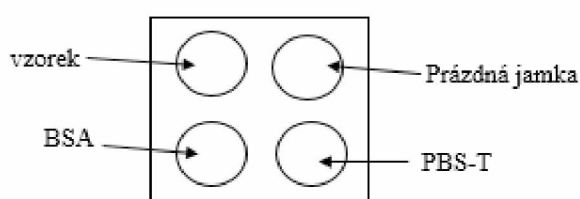
Použitá membrána a zařízení:

- Immun-Blot™ PVDF membrane (pro proteinový blotting, 0,2 μ m, Bio-Rad)
- Dot-Blot DHM 96 unit (Scie-Plas, Cambridge, UK) -průměr 3 mm

Postup:

Nejprve byla membrána po dobu 3 minut smočena ve 100 % methanolu. Poté byla membrána umístěna do aparatury, která byla připojena na vakuum. Poté proběhla ekvilibrace membrány, tak že jamky byly promyty 100 μ l PBS-T pufru. Po promytí byl

nadávkován vzorek 100 μ l (3 μ l buněčného lyzátu + 97 μ l PBS) negativní kontroly následovalo opět promytí jamek 100 μ l promývacího roztoku a membrána byla vyjmuta z aparatury a rozstříhána podle nadávkovaných vzorků (viz. schéma níže). Následovala blokace 1 hodinu v blokovacím roztoku na třepačce při laboratorní teplotě. Po blokaci byly jamky 3x promyty PBS-T pufrem. Vzorek byl dále inkubován s primární protilátkou (1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě). Po inkubaci a promytí (3x rychle 3x s 5minutovou inkubací) byly přidány sekundární protilátky a opět inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepačce. Následovalo rychlé promytí (3x) PBS-T pufrem a 3x s inkubací 5 minut. Po promytí byl přidán substrátový roztok a po cca 15 minutách byla reakce ukončena převedením membrány do destilované vody.



3.4 Příprava imunosorbentů

3.4.1 Imobilizace primárních protilátek na magnetické částice

Použité chemikálie:

- ProMagTM 1 Series COOH Surfactant free, velikost částic 0,746 μ m (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA)
- polyklonální králičí anti-*Salmonella* spp. protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad)
- monoklonální myší anti-*Campylobacter jejuni* (IgG2, koncentrace 0,2 mg/ml, ThermoScientific, USA)
- 2-(N-Morfolin-4-yl)ethansulfonová kyselina (C₆H₁₃NO₄S, MES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC, C₈H₁₇N₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosuccinimid sodný (Sulfo-NHS, C₄H₄NNaO₆S) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

- Ostatní chemikálie čistoty p.a (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- 0,1 M MES pufr pH 5
- 0,1 M MES pufr s 1 M NaCl

Postup:

Pro přípravu magnetického nosiče byl použit 1mg magnetických částic (37 μ l ze zásobního roztoku) a doplněn na 1 ml 0,1 M MES pufrém pH 5. Částice byly 5x promyty 1 ml 0,1 M MES pufru pH 5. Poté byl přidán roztok EDAC (7,5 mg/250 μ l 0,1 M MES pufru pH 5). Dále byl přidán roztok sulfo-NHS (1,25 mg/250 μ l 0,1 M MES pufru pH 5) a celkový reakční objem byl doplněn na 1 ml 0,1 M MES pufrém pH 5.

Po inkubaci 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě byly částice promyty 2x 1 ml 0,1 M MES pufru pH 5. K částicím byly následně přidány protilátky (polyklonální anti-*Salmonella* spp., polyklonální anti-*Campylobacter jejuni* nebo monoklonální anti-*Campylobacter jejuni*) v množství 25 μ g v 1 ml 0,1 M MES pufr pH a proběhla inkubace přes noc při 4 °C na rotátoru.

Po inkubaci byly částice s imobilizovanými protilátkami promyty 2 x 1 ml 0,1 M MES pufru pH 5, 1 x 1 ml 0,1 M MES pH 5 s 1 M NaCl a nakonec 5 x 1 ml 0,1 M MES pufru pH 5.

Ze vzorku protilátek před imobilizací bylo odebráno 10 μ l pro ověření účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE. Stejně bylo odebráno z frakce po imobilizaci, a prvních promývacích frakcí každým pufrém.

3.5 Záchyt a vyočkování bakterií

3.5.1 Ověření funkčnosti imunosorbentu pomocí záchytu bakteriálních buněk *Salmonella* spp.

Použité chemikálie:

- Imunosorbent-magnetické částice ProMag s imobilizovanými polyklonálními králičími anti-*Salmonella* spp. protilátkami (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA), (25 μ g protilátek na 1 mg nosiče)
- suspenze bakterií: 0,5 podle McFarlanda odpovídající $1,5 \times 10^8$ buněk
- TSA- Tryptone soya agar (HiMedia, Indie)

Použité roztoky:

- PBS-T pufr pH 7,4
- Fyziologický roztok

Postup:

Nejprve byly připraveny vzorky s různým počtem buněk. Vzorky byly připraveny desítkovým ředěním od 10^8 - 10^1 podle tabulky 3.

Tabulka 3 Příprava suspenze bakterií

Ředění	Předpokládaný počet buněk	Příprava suspenze desítkovým ředěním
10^7	10 000 000 bb	1 ml z 10^8 +9 ml fyz. roztoku
10^6	1 000 000 bb	1 ml z 10^7 +9 ml fyz. roztoku
10^5	100 000 bb	1 ml z 10^6 +9 ml fyz. roztoku
10^4	10 000 bb	1 ml z 10^5 +9 ml fyz. roztoku
10^3	1 000 bb	1 ml z 10^4 +9 ml fyz. roztoku
10^2	100 bb	1 ml z 10^3 +9 ml fyz. roztoku
10^1	10 bb	1 ml z 10^2 +9 ml fyz. roztoku

Pro izolaci buněk bylo využito ředění 10^1 až 10^4 . Pro každou koncentraci bylo použito 250 μ g imunosorbentu připraveného podle postupu v kapitole 3. 2. 1. Nejprve byly částice promyty 3x promyty 0,5 ml PBS-T pufrém. Po posledním promytí byl pomocí magnetického separátoru odebrán supernatant a byl přidán 1 ml buněčné suspenze daného ředění a následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě na rotátoru.

Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce. Následovalo 2x promytí 1 ml PBS-T pufru a odebrány promývací frakce.

Pro ověření účinnosti imunosorbentu bylo vyočkováno 100 μ l ředění 10^2 - 10^4 původní suspenze, z vazebné frakce 10^1 - 10^3 pak 100 μ l na TSA médium, a z promývacích frakcí opět 100 μ l na tentýž agar. K částicím bylo přidáno 100 μ l PBS-T pufru a suspenze částic byla vyočkována na TSA médium (2x 50 μ l).

3.5.2 Ověření funkčnosti imunosorbentu pomocí záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni*

Použité chemikálie:

- Imunosorbent- magnetické částice ProMags imobilizovanými polyklonálními králičími anti-*Campylobacter jejuni* protilátkami (25 µg protilátek na 1mg nosiče)
- Suspenze bakterií: 0,5 podle McFarlanda odpovídající $1,5 \times 10^8$ buněk
- Columbia agar- Columbia blood agar base (HiMedia, Indie)

Použité roztoky:

- PBS-T pufr pH 7,4
- Fyziologický roztok

Postup:

Nejprve byly připraveny vzorky s různým počtem buněk. Vzorky byly připraveny desítkovým ředěním od 10^8 - 10^1 podle tabulky 4:

Tabulka 4 Příprava suspenze bakterií

Ředění	Předpokládaný počet buněk	Příprava suspenze desítkovým ředěním
10^7	10 000 000 bb	1 ml z 10^8 +9 ml fyz. roztoku
10^6	1 000 000 bb	1 ml z 10^7 +9 ml fyz. roztoku
10^5	100 000 bb	1 ml z 10^6 +9 ml fyz. roztoku
10^4	10 000 bb	1 ml z 10^5 +9 ml fyz. roztoku
10^3	1 000 bb	1 ml z 10^4 +9 ml fyz. roztoku
10^2	100 bb	1 ml z 10^3 +9 ml fyz. roztoku
10^1	10 bb	1 ml z 10^2 +9 ml fyz. roztoku

Pro izolaci buněk bylo využito ředění 10^1 až 10^3 . Pro každou koncentraci bylo použito 250 µg imunosorbentu připraveného podle postupu v kapitole 3.2.1, které byly odebrány a 3x promyty 0,5 ml PBS-T pufrům. Po posledním promytí byl supernatant odtáhnout a bylo přidáno 1 ml buněčné suspenze a inkubováno 30 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce. Následovalo 2x promytí 1 ml PBS-T pufru a odebrány promývací frakce.

Pro ověření bylo vyočkováno 100 μ l ředění 10^2 - 10^4 původní suspenze, z vazebné frakce 10^1 - 10^3 pak 100 μ l na Columbia agar, a z promývacích frakcí opět 100 μ l na tentýž agar. K částicím bylo přidáno 100 μ l PBS-T pufru a vyočkováno na Columbia agar 50 μ l, to vše v dubletu.

3.6 Příprava značených protilátek

3.6.1 Značení protilátek anti-*Salmonella* spp. a anti-*Campylobacter jejuni* s využitím SiNPs-CdTe QDs

Použité chemikálie:

- Kvantové tečky – CdTe QDs (- COOH), (CEITEC, Brno, ČR)
- Silika-nanočástice – SiNPs (-NH₂), velikost částic 200 nm (Sigma Aldrich, USA)
- polyklonální králičí anti-*Salmonella* spp. protilátky (IgG, koncentrace 4mg/ml, BioRad, USA)
- polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl

Postup:

Nejprve byl připraven zásobní roztok silika nanočástic 30 mg/2 ml redestilované vody. Z tohoto roztoku bylo pro značení protilátek odebráno 200 μ l což odpovídá 3 mg nanočástic. Nanočástice byly promyty 5 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru (s centrifugací 5 000 rpm, 5 min). Po posledním promytí byl supernatant odtažen a přidáno 500 μ l pufru, 0,5 mg EDC ve 300 μ l pufru a 50 μ l zásobního roztoku CdTe QDs a doplněno na objem 1 ml. Suspenze byla inkubována 60 minut na rotátoru při laboratorní teplotě ve tmě.

Po inkubaci byly nanočástice s navázanými QDs promyty 3 x 1 ml fosfátového pufru s 1 M NaCl a 2 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru.

K takto modifikovaným nanočásticím byly přidány protilátky, které byly připraveny následujícím způsobem.

K 20 µg protilátek anti-*Salmonella* spp. ve 250 µl fosfátového pufru bylo přidáno 3,75 mg EDC ve 300 µl fosfátového pufru a následovala inkubace 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě ve tmě.

Po inkubaci byly přidány protilátky k nanočásticím a inkubovány přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce a částice byly 3 x promyty 1 ml fosfátového pufru. Promývací frakce byly také uchovány pro následnou analýzu pomocí SDS-PAGE.

3.6.2 Značení protilátek anti-*Salmonella* spp. a anti-*Campylobacter jejuni* s využitím SiNPs-AuNPs

Použité chemikálie:

- Zlaté nanočástice – AuNPs (-COOH) modifikované PEG 3500, velikost částic 20 nm (Orion, H. Technologies Španělsko)
- Silika-nanočástice – SiNPs (-NH₂), velikost částic 200 nm (Sigma Aldrich, USA)
- polyklonální králičí anti-*Salmonella* spp. protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr s 1 M NaCl

Postup:

Nejprve byl připraven zásobní roztok silika nanočástic 30 mg/2 ml redestilované vody. Z tohoto roztoku bylo pro značení protilátek odebráno 200 µl což odpovídá 3 mg nanočástic. Nanočástice byly promyty 5 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru (s centrifugací 5 000 rpm, 5 min). Po posledním promytí byl supernatant odtažen a přidáno 500 µl pufru k tomu 0,5 mg EDC ve 300 µl a 10 µl AuNPs a doplněno na objem 1 ml. Suspenze byla inkubována 60 minut na rotátoru při laboratorní teplotě ve tmě.

Po inkubaci byli nanočástice s navázanými AuNPs promyty 3 x 1ml fosfátového pufru s 1M NaCl a 2 x 1 ml 0,1M fosfátovým pufrům. K takto modifikovaným nanočásticím byly přidány protilátky, které byly připraveny následujícím způsobem.

K 20 µg protilátek v 250 µl fosfátového pufru bylo přidáno 3,75 mg EDC ve 300 µl fosfátového pufru a následovalo 30 minut aktivovat na rotátoru při laboratorní teplotě ve tmě.

Po inkubaci byly přidány protilátky k nanočásticím a inkubovány přes noc při 4 °C.

Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce a částice byly 3 x promyty 1 ml fosfátového pufru. Promývací frakce byly také uchovány pro následnou analýzu pomocí SDS-PAGE.

3.6.3 Značení protilátek anti-*Salmonella* spp. a anti-*Campylobacter jejuni* s využitím polymerních dendronů a CdTe QDs

Použité chemikálie:

- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), the sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Polyester bis-MPA dendrony, generation 3, MPA dendron 8C/1A, (8x -COOH, 1x -NH₂) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- polyklonální králičí anti-*Salmonella* spp. protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- CdTe/COOH QDs (CEITEC, Brno, ČR).

Postup:

Byl připraven zásobní roztok dendronů ve 100% methanolu (1mg/ml). Ze zásobního roztoku bylo odebráno 250 µg a přidáno 0,5 mg EDC ve 20µl methanolu. Roztok byl promýchán a bylo přidáno 28 µl zásobního roztoku CdTe QDs a inkubováno 5 min při 80 °C. Po centrifugaci (5000 rpm, 2 min) byl odstraněn supernatant a přidáno 30 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. K 50 µg protilátek v 50 µl 0,1 M fosfátového pufru bylo přidáno 0,2 mg EDC v 50 µl fosfátového pufru a inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Takto aktivované protilátky byly přidány k dendronům s CdTe QDs a doplněny na celkový objem 1 ml.

3.6.4 Značení protilátek anti-*Salmonella* spp. a anti-*Campylobacter jejuni* s využitím SiNPs-PbS QDs

Použité chemikálie:

- Silika-nanočástice – SiNPs (-NH₂), velikost částic 200 nm (Sigma Aldrich, USA)
- Olovnaté tečky – PbS QDs (-COOH), velikost 160 nm, (Mesolight)
- polyklonální králičí anti-*Salmonella* spp. protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1M fosfátový pufr s 1M NaCl

Postup:

Nejprve byl připraven zásobní roztok silikananočástic 30 mg/2 ml redestilované vody. Z tohoto roztoku bylo pro značení protilátek odebráno 200 µl což odpovídá 3 mg nanočástic. Nanočástice byly promyty 5 x 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrem (s centrifugací 5 000 rpm. 5 min). Po posledním promytí byl supernatant odtáhnut a přidáno 500 µl pufru k tomu 0,5 mg EDC ve 300 µl a 4 µl PbS QDs a doplněno na objem 1 ml. Suspenze se nechala inkubovat 60 minut na rotátoru při laboratorní teplotě ve tmě.

Po inkubaci byly nanočástice promyty 3 x 1ml fosfátovým pufrem s 1 M NaCl a 2 x 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrem. K takto modifikovaným nanočásticím byly přidány protilátky, které byly připraveny následujícím způsobem.

Byl připraven roztok 20 µg protilátek v 250 µl fosfátového pufru bylo a přidáno 3, 75 mg EDC ve 300 µl fosfátového pufru a následovala inkubace 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě ve tmě.

Po inkubaci byly protilátky přidány k nanočásticím a inkubovány přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce a následovalo 3 x promytí 1 ml fosfátového pufru pomocí centrifugace. Byly odebrány všechny promývací frakce a ponechány pro další analýzu SDS-PAGE.

3.7 Sestavení imunokomplexu pro detekci *Salmonella* spp. a *Campylobacter jejuni*

Použité chemikálie:

- Imunosorbent-magnetické částice ProMag s imobilizovanými primárními polyklonálními králičími anti-*Salmonella* spp. protilátkami (25 µg protilátek na 1 mg nosiče)
- Sekundární polyklonální protilátky anti- *Salmonella* spp. značené SiNPs-CdTe QDs, SiNPs-PbS QDs, Ds-CdTe QDs nebo SiNPs-AuNPs
- Imunosorbent-magnetické částice ProMag s imobilizovanými primárními polyklonálními králičími anti-*Campylobacter Jejuni* protilátkami (25 µg protilátek na 1 mg nosiče)
- Sekundární polyklonální značené (CdTe QDs, PbS QDs, Ds/CdTe QDs, AuNPs) protilátky anti-*Campylobacter jejuni*
- Suspenze bakterií *Salmonella* Typhimurium: 0,5 podle McFarlanda odpovídající 1×10^8 buněk
- Suspenze bakterií *Campylobacter jejuni*: 2 podle McFarlanda odpovídající 1×10^8 buněk
- Bismuth nitrate pentahydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité roztoky:

- PBS-T pufr pH 7,4
- 5 ppm Bi (III)

Postup:

Pro sestavení imunokomplexu bylo použito 250 µg imunosorbentu (6,25 µg protilátek), který byl promyt 3x 1 ml PBS-T pufru pH 7,4. Po promytí byl přidán 1 ml suspenze *Salmonella* Typhimurium o příslušném ředění (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3) a 30 µl značených protilátek SiNPs-CdTe QDs, 20 µl protilátek značených SiNPs-AuNPs nebo 15 µl protilátek značených polymerních Ds-CdTe QDs, a následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě na rotátoru. Po inkubaci byl imunokomplex 5x promyt PBS-T pufrům pH 7,4 a detegován elektrochemicky.

3.8 Elektrochemická detekce

Pro analýzu imunokomplexu značeného ionty kovů byl použit tříelektrodový senzor DRP C-110 (DropSens, Španělsko). Ionty kovů byly detegovány pomocí metody anodické/katodické rozpouštěcí voltametrie.

3.8.1 Elektrochemická detekce na tištěných tříelektrodových senzorech DRP C-110

Použité chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková (HCl), (35%, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Bismut nitrate pentahydrate, (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- 0,1 M HCl
- 5 ppm Bi (III)

Použité zařízení a elektrody:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)
- Potenciostat PalmSens (PalmSens, Houten, Nizozemí)

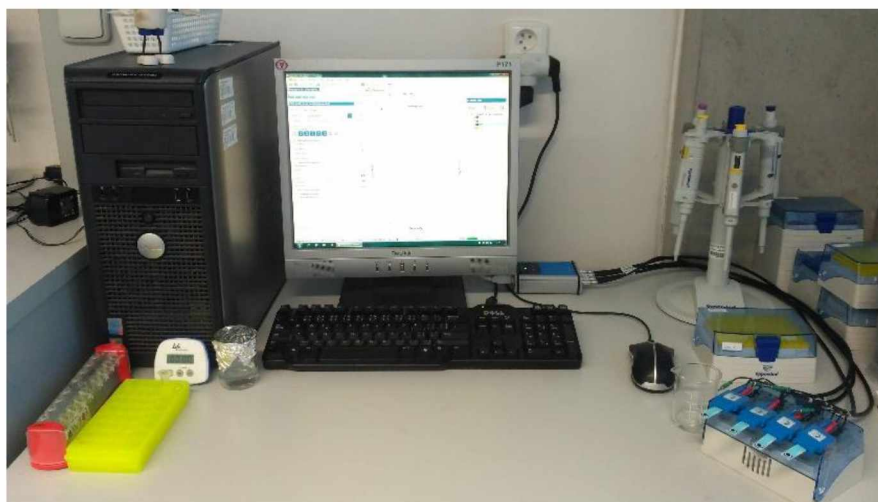
Postup:

Pro elektrochemické měření byly použity: anodická rozpouštěcí square wave voltametrie (SWASV), měřeno v záporné oblasti potenciálů. Tato detekce byla použita pro vzorky pro které byly použity sekundární značené protilátky s SiNPs-PbS QDs, SiNPs-CdTe QDs a Ds-CdTe QDs. A katodická rozpouštěcí square wave voltametrie (SWCSV), měřeno v oblasti kladných potenciálů, pro vzorky (imunokomplex tvořený imunosorbentem s vychytanými bakteriemi a označenými sekundárními protilátkami) značené SiNPs-AuNPs.

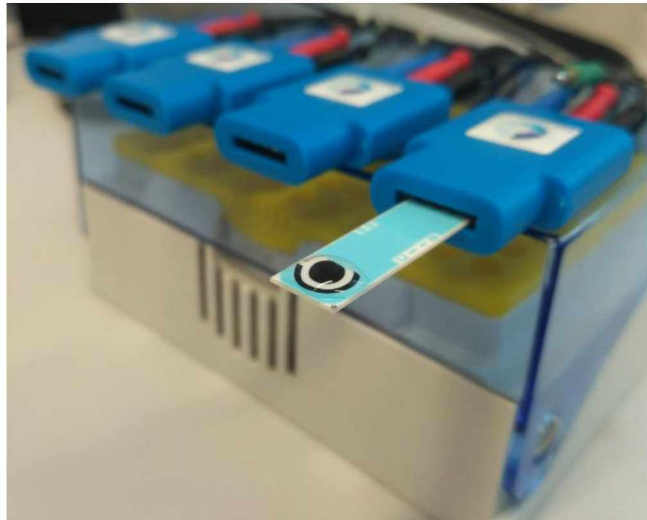
Ke vzorku bylo přidáno 100 μ l 0,1 M HCl, následovala 3 minutová inkubace, separace magnetických částic, po které bylo k supernatantu přidáno se 10 μ l roztoku Bi (III) (výsledná koncentrace 500 ppb) a roztok byl nanesen na elektrodu. Podmínky voltametrické detekce jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Podmínky pro měření SWASV a SWCV

	SWASV	SWCV
E	-0,15 V	0,15 V
T	0 s	120 s
E_{dep}	-1,0 V	1,2 V
t_{dep}	120 s	180 s
t_{ekv}	2 s	2 s
E_{poč}	-1,0 V	1,2 V
E_{konc}	0,0 V	0,0 V
E_{step}	0,003 V	0,003 V
Amplituda	0,02805 V	0,02805 V
Frekvence	25,0 HZ	25,0 HZ



Obrázek 21 Pracoviště pro elektrochemickou detekci (foto autor)

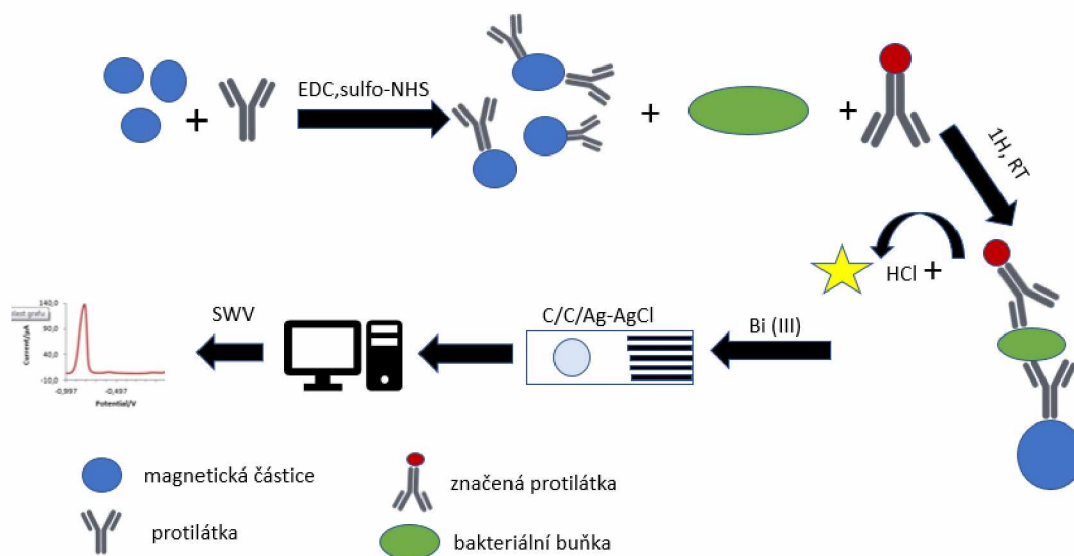


*Obrázek 22 Detail tištěného třielektrodového senzoru použitého pro analýzu (DropSens C-110, DropSens Španělsko)
(foto autor)*

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Diplomová práce byla zaměřena na vývoj systému, pomocí kterého bude možné detegovat celé bakteriální buňky ve vzorcích potravin. Systém je založený na kombinaci imunanalýzy magnetické separace a elektrochemické detekce. Zaměřili jsme se na vývoj systému pro detekci dvou patogenních bakterií, konkrétně *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 43971 (Institut Pasteur, Francie) a *Campylobacter jejuni*, s ohledem na jejich častý výskyt v potravinách, kde jsou původci alimentárních onemocnění. Veškeré experimenty a funkčnost vyvíjeného systému byla testována v pufru. V případě funkčnosti systému detegovat bakteriální buňku v pufru, bude následovat testování ve vzorcích mléka či jiných mléčných výrobcích.

Elektrochemický systém detekce bakteriálních buněk byl založený na tvorbě imunokomplexu. Uspořádání celého systému sestává z několika dílčích kroků (viz. obrázek 23). Nejprve je nezbytný účinný záchyt bakteriální buňky ze vzorku. K tomu je využito protilátek, které jsou imobilizované na magnetických částicích z důvodů snadné manipulace pomocí magnetického separátoru, a také snadného odmytí ostatních složek. Po záchytu bakteriálních buněk, jsou navázány protilátky, které byly značeny pomocí QDs a AuNPs pro snadnou elektrochemickou detekci. Celý imunokomplex je pak detegován pomocí rozpouštěcí anodické/katodické square wave voltametrie.



Obrázek 23 Schéma znázorňující jednotlivé kroky konstrukce biosenzoru pro detekci bakteriálních buněk

První část experimentální práce spočívala v přípravě jednotlivých složek nezbytných pro sestavení celého systému, tedy magnetických nosičů s imobilizovanými specifickými

protilátkami proti bakteriím *Campylobacter jejuni* a *Salmonella* Typhimurium (imunisorbentu) a značených protilátek (konjugátu), se stejnou specifitou, pro následnou detekci. Dále byla ověřována schopnost připraveného imunisorbentu vázat bakteriální buňky vybraných bakterií. Pro potvrzení byla použita standardní kultivační metoda.

Pro značení protilátek byly použity CdTe nebo PbS kvantové tečky (QDs) a zlaté nanočástice (AuNPs), a to v kombinaci se silika nanočásticemi (SiNPs) nebo polymerními dendrony (Ds) na které je možné navázat více komponentů.

V části druhé jsem se zabývala využitím připravených reagensů pro sestavení celého imunosenzoru založeného na tvorbě imunokomplexu protilátek s bakteriálními buňkami, s následnou elektrochemickou detekcí. Byla testována funkčnost pro různá množství bakteriálních buněk *Salmonella* Typhimurium a *Campylobacter jejuni*, v rozsahu 10^0 - 10^4 . Pro elektrochemickou detekci celých imunokomplexů byla použita metoda square wave katodické/anodické rozpouštěcí voltametrie na tištěných elektrodách DropSens C-110 s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentochloridovou referenční elektrodou (C/C/Ag-AgCl) s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem.

4.1 Výběr protilátek pro vývoj systému pro detekci bakteriálních buněk

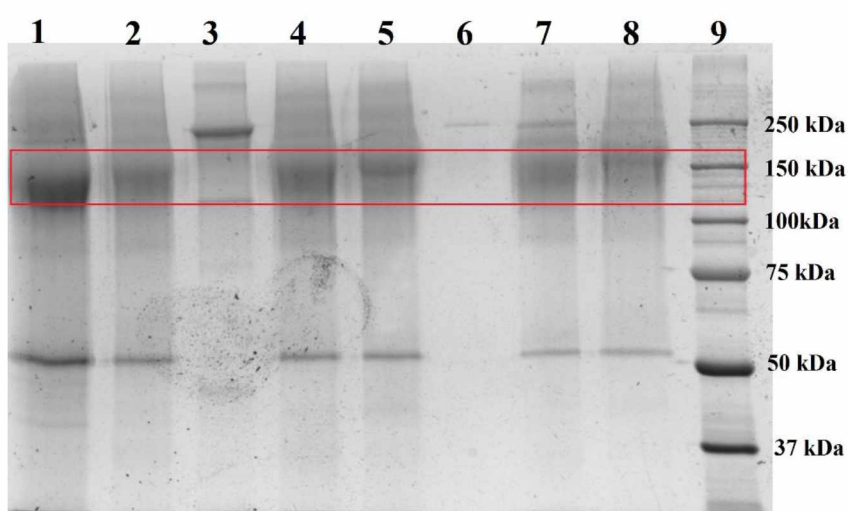
Pro vývoj systému byly využity komerčně dostupné protilátky, zakoupené od několika výrobců. Byly zakoupeny protilátky proti různým druhům bakterií (viz. tabulka 6).

Tabulka 6 Použité typy protilátek

Protilátka	Výrobce	Zdroj	Klonalita	Koncentrace	Pozice na gelu (viz. obrázek 21)
anti- <i>Campylobacter jejuni</i>	BioRad (USA)	králíčí	polyklonální	4 mg/ml	1
anti- <i>Listeria</i> spp.	Virostat (USA)	králíčí	polyklonální	5 mg/ml	2
anti- <i>Listeria monocytogenes</i>	HyTest (Finsko)	myší	monoklonální	4,1 mg/ml	3
anti- <i>Listeria monocytogenes</i>	Invitrogen (USA)	myší	monoklonální	4 mg/ml	4
anti- <i>Salmonella</i> spp.	BioRad	králíčí	polyklonální	4 mg/ml	5

	(USA)				
anti- <i>Salmonella</i> spp.	Virostat (USA)	králíčí	monoklonální	5 mg/ml	6
anti- <i>Bacillus</i> spp.	Virostat (USA)	králíčí	polyklonální	5 mg/ml	7
anti- <i>Escherichia Coli</i>	Virostat (USA)	králíčí	polyklonální	5 mg/ml	8

Čistota a kvalita těchto vybraných protilátek byla ověřována pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) s následným barvením roztokem amoniakálního stříbra. Pro separaci byl použit 10 % polyakrylamidový gel a na jamku byly dávkovány 2 µg protilátky. Protože systém byl vyvíjen pro detekci *Salmonella* Typhimurium a *Campylobacter jejuni* zaměřili jsme se při hodnocení výsledků na tyto protilátky (obr. 21, pozice 1 a 5). Na základě výsledků jsme se rozhodli použít polyklonální protilátky anti-*Salmonella* spp., od firmy BioRad (pozice 5), z důvodu toho, že proužek monoklonálních protilátek anti-*Salmonella* spp. od firmy Virostat (pozice 6) nebyl téměř viditelný. Pro detekci bakterie rodu *Campylobacter* jsme měli jen jeden typ protilátek od firmy BioRad, a jak je vidět na obrázku 21, pozice 1, největší intenzitu má proužek odpovídající proteinu o Mr 150 000, tedy kompletní molekule protilátky třídy IgG, a dá se předpokládat jejich funkčnost.

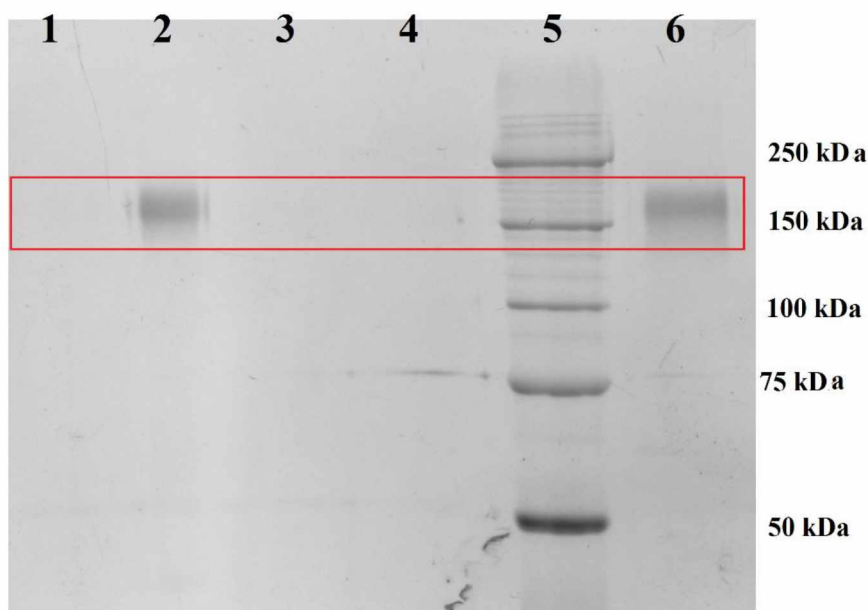


Obrázek 24 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření čistoty a kvality protilátek, 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra; 1- anti-*Campylobacter jejuni* IgG (BioRad), 2- anti-*Listeria* IgG (Virostat), 3- anti-*Listeria* IgG (HyTest), 4- anti-*Listeria* IgG (Invitrogen), 5- anti-*Salmonella* spp. IgG (BioRad), 6- anti-*Salmonella* spp. IgG (Virostat), 7- anti-*Bacillus* (Virostat), 8- anti-*Escherichia coli* IgG (Virostat), 9 - standard molekulových hmotností (10-250 kDa).

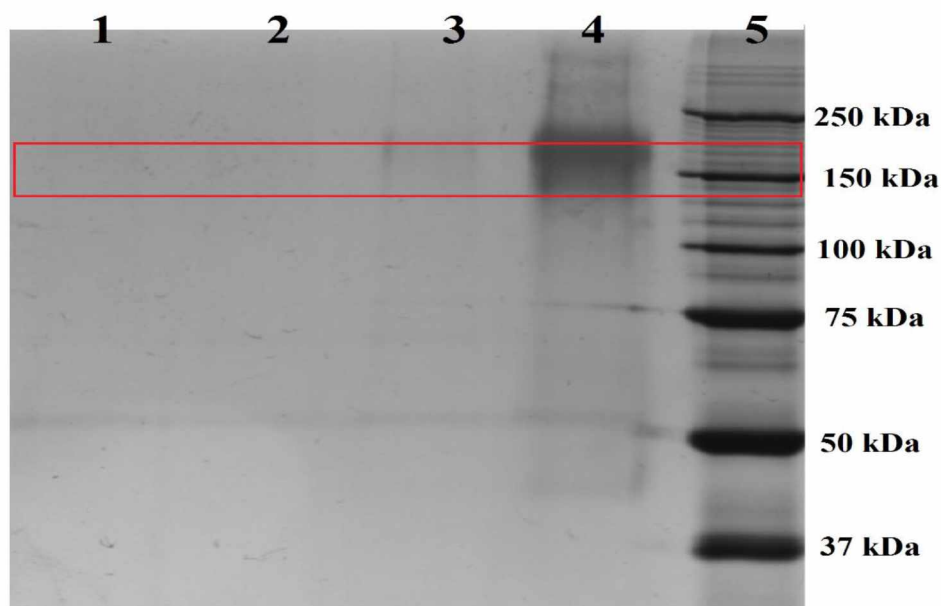
4.2 Příprava magnetických nosičů anti-*Salmonella* spp.

Pro přípravu magnetického nosiče s imobilizovanými protilátkami anti-*Salmonella* spp. tzv. imunisorbentu, byla použita dvoukroková karbodiimidová metoda [73], při které jsou nejprve karboxylové skupiny magnetických částic aktivovány pomocí EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidu) a sulfo-NHS (the sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide) a následně jsou molekuly protilátek imobilizovány přes amino skupiny.

Imobilizace protilátek byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1, a s cílem dosáhnout co nejúčinnější vazby byla použita různá množství EDC a sulfo-NHS. Byla testována množství 3,75 mg EDC/ 0,625 sulfo-NHS, 0,6 mg EDC /0,1 mg sulfo-NHS, 60 µg EDC /10 µg sulfo-NHS, 6 µg EDC / 1 µg sulfo-NHS a 12 µg EDC/1 µg sulfo-NHS. Účinnost imobilizace byla ověřena SDS-PAGE analýzou frakcí před a po imobilizaci a promývacích frakcí (data jsou uvedena pouze s nejhorší a nejlepší účinností). Z obrázků 22 a 23 je patrné, že při použití 12 µg EDC a 1 µg sulfo-NHS docházelo po imobilizaci k částečnému vymývání protilátek v promývacích krocích (viz. obrázek 25- pouice 2- promývací frakce (Tris-HCl pH 8), a účinnost imobilizace byla denzitometricky vyhodnocena (77 %). Při použití 7,5 mg EDC a 1,25 mg sulfo-NHS a při úpravě promývacích kroků k vymývání protilátek nedocházelo (viz. obrázek 26) a účinnost imobilizace dosahovala 91 %.



Obrázek 25 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti-*Salmonella* spp. na magnetické částice, 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra. 1- promývací frakce (0,1 M MES s 1 M NaCl), 2- promývací frakce (Tris-HCl pH 8), 3- promývací frakce (0,1 M MES pH 5), 4- frakce po imobilizaci, 5- standard molekulové hmotnosti (10-250 kDa), 6. původní vzorek protilátek před imobilizací



Obrázek 26 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti-*Salmonella* spp. na magnetické částice, 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra. 1- promývací frakce (0,1 M MES s 1 M NaCl), 2- promývací frakce (0,1 M MES pH 5), 3- frakce po imobilizaci, 4- původní vzorek protilátek před imobilizací, 5- standard molekulové hmotnosti (10-250 kDa)

Jako optimální množství EDC a sulfo-NHS pro další experimenty bylo tedy vybráno množství 7,5 mg EDC a 1,25 mg sulfo-NHS.

4.3 Ověření účinnosti záchytu buněk *Salmonella* spp. s využitím připraveného imunosorbentu

Pro ověření, zda připravený imunosorbent s primárními protilátkami anti-*Salmonella* spp. je schopný vycytávat buňky z připravené suspenze *Salmonella* Typhimurium byla použita kultivační metoda. Postupovalo se podle již publikované práce [74] následovně: z výchozí bakteriální suspenze se zákalem 0,5 podle McFarlanda (odpovídá 1×10^8 CFU/ml) byla připravena ředění od 10^4 - 10^1 CFU/ml. Pro ověření záchytu bylo použito 250 μ g imunosorbentu, ke kterému byl přidán 1 ml příslušného ředění a po inkubaci a promytí byl vyočkován na TSA médium imunosorbent s vycyтанými bakteriálními buňkami, supernatant po inkubaci (vazebná frakce) a dvě promývací frakce. Po kultivaci (viz. postup 3. 5. 1) byla procentuálně vyjádřena účinnost záchytu (viz. tabulka 7). Celkově byl experiment proveden 3x. Pokud účinnost záchytu budeme hodnotit podle jednotlivých ředění pozorujeme, že nejvyšší účinnost imunosorbentu je do ředění 10^3 CFU/ml, u ředění 10^4 CFU/ml účinnost záchytu klesá, kdy pravděpodobně dochází k převýšení kapacity nosiče.

Tabulka 7 Vyhodnocení účinnosti záchytu bakteriálních buněk *Salmonella* spp. pomocí imunosorbentu na základě kultivační metody. Výsledky jsou uváděny vždy v procentech po jednotlivých ředění. Výsledná účinnost je sumou z vyočkovaných frakcí částic, vazebné frakce a dvou promývacích, vztaženou

Ředění (CFU/ml)	Záchyt (%)		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
10^1	30	127	42
10^2	22	111	34
10^3	132	177	106
10^4	56	75	64

Na základě těchto výsledků lze říct, že je připravený imunosorbent funkční a byl použit pro další experimenty.

4.4 Příprava značených protilátek anti-*Salmonella* spp.

Pro detekci bakteriálních buněk byla vybrána elektrochemická detekce s využitím protilátek značených elektroaktivními značkami. Obvykle se pro ELISA metody využívají enzymy [14], v našem případě však byly využity nanočástice, konkrétně kvantové tečky a zlaté nanočástice. Využití kvantových teček navíc v kombinaci se silika nanočásticemi, které byly použity, může přispět ke zvýšení signálu při elektrochemické detekci a tím ke zvýšení citlivosti celého stanovení. Pro tuto práci bylo zvoleno několik signál generujících značek a dva typy nanočástic, se kterými byly kombinovány (viz. tabulka 8).

Tabulka 8 Používané značky pro značení sekundárních protilátek při přípravě konjugátů

Signál generující značky			
	velikost	funkční skupina	firma
CdTe QDs	7-10 nm	-COOH	CEITEC, Brno, ČR
AuNPs	20 nm	-COOH	Orion High-Technologies, Španělsko
PbS QDs	160 nm	-COOH	Mesolight, Čína
Nanočástice pro konjugaci se signál generující značkou			
SiNPs	200 nm	-NH ₂	Sigma-Aldrich, USA
Dendrony (Ds)	NA	8x -COOH, 1x -NH ₂	Sigma-Aldrich, USA

Pro přípravu konjugátů, tj. pro značení protilátek byla použita opět kovalentní karbodiimidová metoda. Pro snadnou manipulaci, přípravu a možnost odmytí nenavázaných kvantových teček a zlatých nanočástic, byly použity v kombinaci se silika nanočásticemi nebo polymerními dendrony. Navíc lze předpokládat, že na nanočástice, a následně i na protilátky, můžeme navázat více než jednu kvantovou tečku nebo zlatou nanočástici, a to může přispívat ke zvýšení citlivosti.

Předpokládáme, že takto značené protilátky nám poskytují dostatečný signál pro detekci bakteriálních buněk.

Značené protilátky byly připraveny podle postupů v kapitole 3. 6. Nejprve byly aktivovány karboxylové skupiny kvantových teček nebo zlatých nanočástic pomocí EDC a poté se přidaly silika nanočástice, které obsahují amino skupiny, přes které se navazují. Následně byly přidány protilátky také aktivované pomocí EDC, které se navázaly na volné aminoskupiny silika nanočástic. V případě polymerních dendronů, byly kvantové tečky s karboxylovými skupinami vázány na amino skupinu dendronů a protilátky následně přes amino skupiny v molekule na karboxylové skupiny dendronů. Karboxylové skupiny byly opět aktivovány pomocí EDC (viz. kapitola 3. 6. 3).

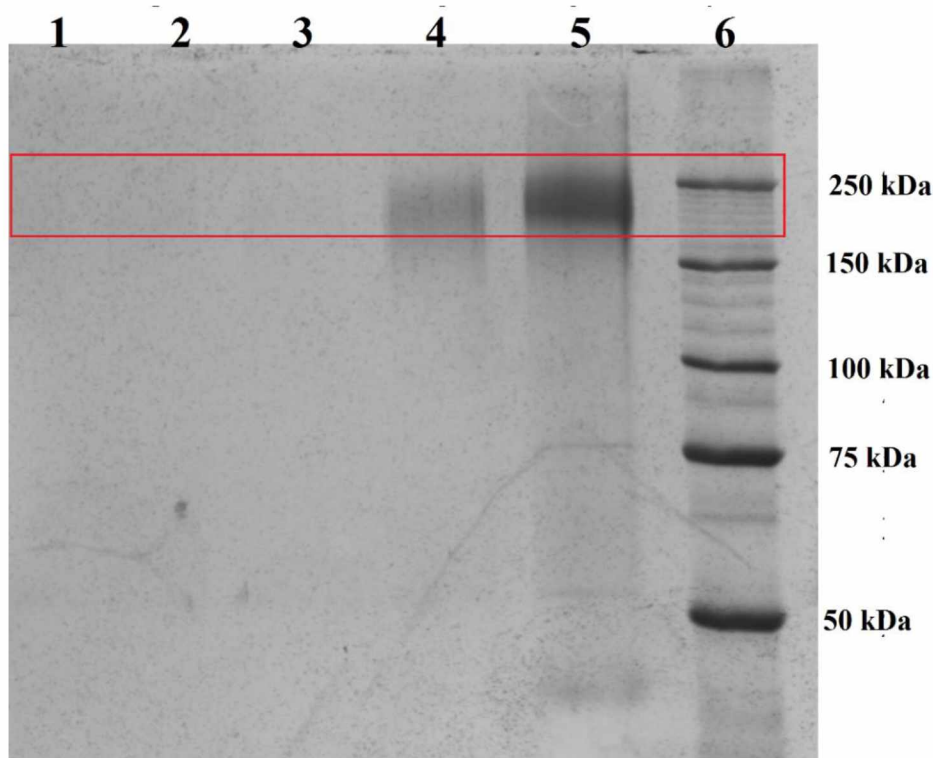
Pro kontrolu účinnosti přípravy značených protilátek byla provedena SDS-PAGE analýza frakcí před a po konjugaci. Značené protilátky byly také ověřeny

elektrochemicky pomocí square wave katodické/anodické rozpouštěcí voltametrie, zda po označení nám připravená značka poskytne signál pro detekci.

Značené protilátky byly připraveny podle postupů v kapitole 3. 6. Nejprve byly aktivovány karboxylové skupiny kvantových teček nebo zlatých nanočástic pomocí EDC a poté se přidali silika nanočástice, které obsahují amino skupiny, přes které se navazují. A nakonec se přidaly aktivované protilátky pomocí EDC, které se navázaly na volné aminoskupiny.

4.4.1 SDS-PAGE analýza pro kontrolu značených protilátek

SDS-PAGE analýza byla provedena na 10 % dělicím polyakrylamidovém gelu s 5 % zaostřovacím gelem a po separaci byl gel obarven roztokem amoniakálního stříbra. Na gel bylo dávkováno vždy 10 μ l původního vzorku protilátek, vazebné frakce a tři promývacích frakcí. V případě SiNPs-CdTe QDs výsledky analýzy vidíme na obrázku 27. Účinnost imobilizace byla v průměru 95 %. Dále vidíme, že došlo k posunu k vyšší Mr z obvyklých 150 kDa. Tento posun by mohl být způsoben t přítomností EDC, použitého pro aktivaci protilátek tak QDs.



Obrázek 27 Výsledek SDS-PAGE analýzy značených protilátek anti-Salmonella spp s SiNPs-CdTe QDs. 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvené roztokem amoniakálního stříbra. 1-3 promývací frakce, 4- vazebná frakce, 5- původní vzorek protilátky před značením, 6- standard molekulové hmotnosti (10-250 kDa)

Podobně se vázaly i protilátky se zlatými nanočásticemi, které byly analyzovány také SDS-PAGE analýzou a účinnost byla v průměru 89 %. V případě využití SiNPs-PbS QDs, se vázaly s téměř 100 %-ní účinností (data nejsou uvedena). Výsledky SDS-PAGE analýzy ve všech případech potvrdily, že protilátky anti-*Salmonella* spp. se nám konjugují s použitými značkami.

4.4.2 Elektrochemická detekce připravených značených protilátek

Připravené konjugáty (značené sekundární protilátky) byly ověřeny i elektrochemicky, aby se ověřilo zda poskytují elektrochemickou odezvu. Současně bylo pro detekci bakterií *Salmonella* Typhimurim nutné vybrat optimální množství konjugátu, které bude následně používáno analýzu celého imunokomplexu.

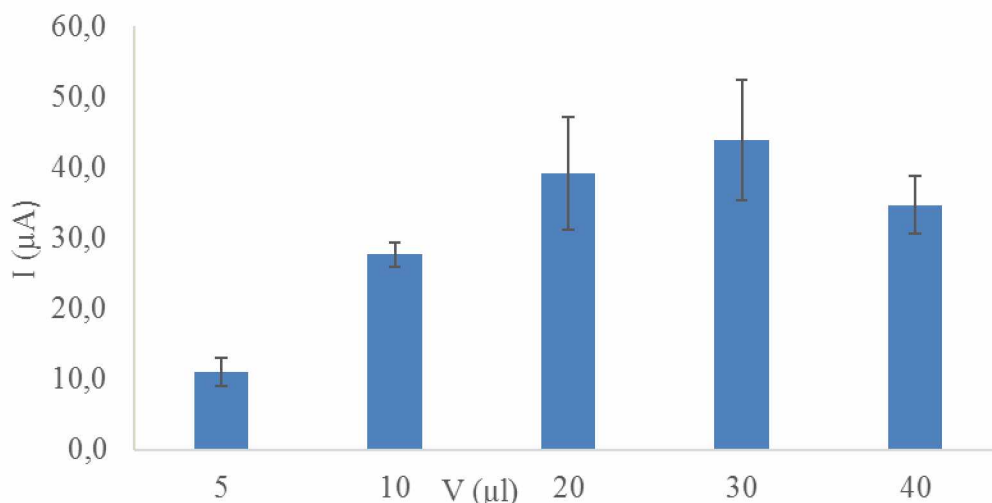
Konjugáty, byly proměřovány za pomoci multipotenciostatu (MultiEmStat4 +) na elektrodách DropSens (Španělsko) C-110 (C/C/Ag-AgCl) a elektrodách Orion HiTechnology (C/C/Ag-AgCl) (Španělsko) použita byla detekční metoda square wave anodické/katodické rozpouštěcí voltametrie. Před vlastním měřením byly vzorky konjugátů inkubovány s kyselinou chlorovodíkovou, kdy v kyselém prostředí došlo k uvolnění iontu kovu z jádra QDs, který je poté detegován. Pro detekci pomocí square wave anodické rozpouštěcí voltametrie (SWASV) byl přidán roztok Bi(III) pro vytvoření

in situ filmu na povrchu pracovní elektrody, Cd (II) a Pb(II) ionty následně poskytují signál.

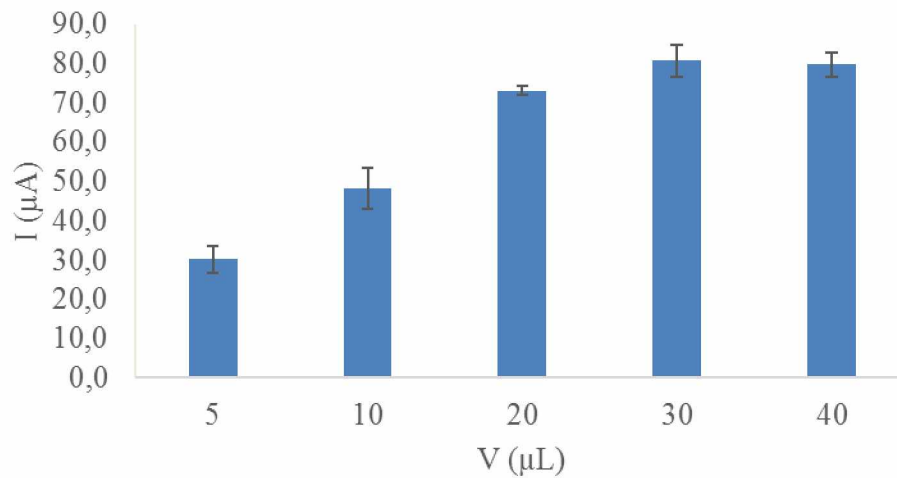
Pro určení optimálního množství konjugátu se testovala různá množství, pro SiNPs-CdTe QDs se testoval objem 5, 10, 20, 30 a 40 μl konjugátu. Pro Ds/CdTe QDs pak 1, 2, 5, 10 a 15 μl a pro SiNPs-PbS QDs 5, 10, 20, 30 μl .

Vhodné množství bylo určeno na základě porovnání proudové odezvy při potenciálu maxima píků uvolněných iontů kovů pro jednotlivá množství. Konkrétně při potenciálech -0,8 V Cd(II) , -0,6 V Pb (II).

Na obrázku 28 je výsledný graf závislosti proudové odezvy na množství použitého konjugátu měřené na elektrodách DropSens C-110 a na obrázku 29 měřené na elektrodách Orion.

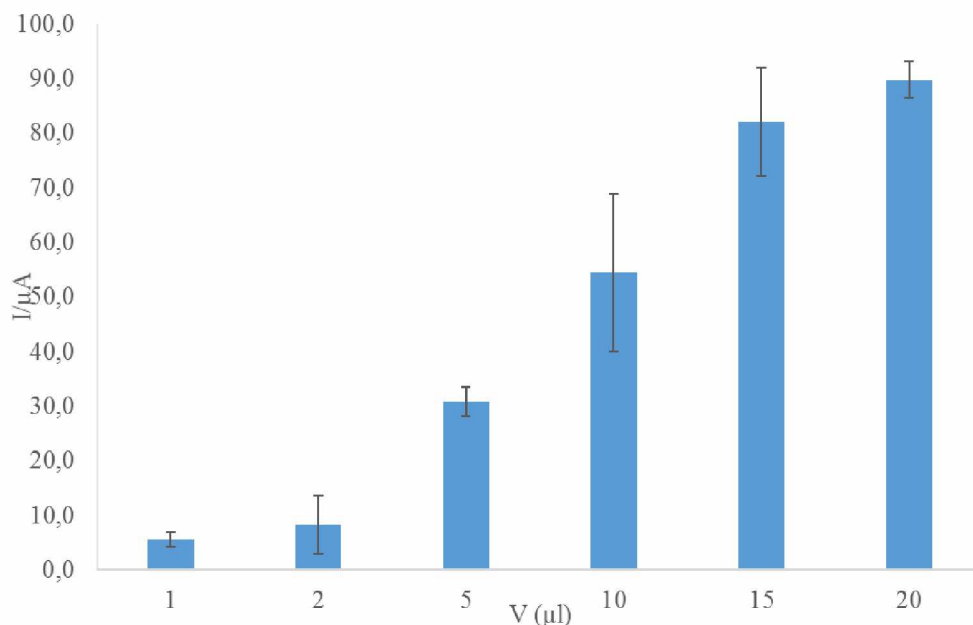


Obrázek 28 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Salmonella spp. s SiNPs-CdTe QDs měřeno na elektrodách DropSens C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb), (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,8 V (průměrné hodnoty ze tří měření)



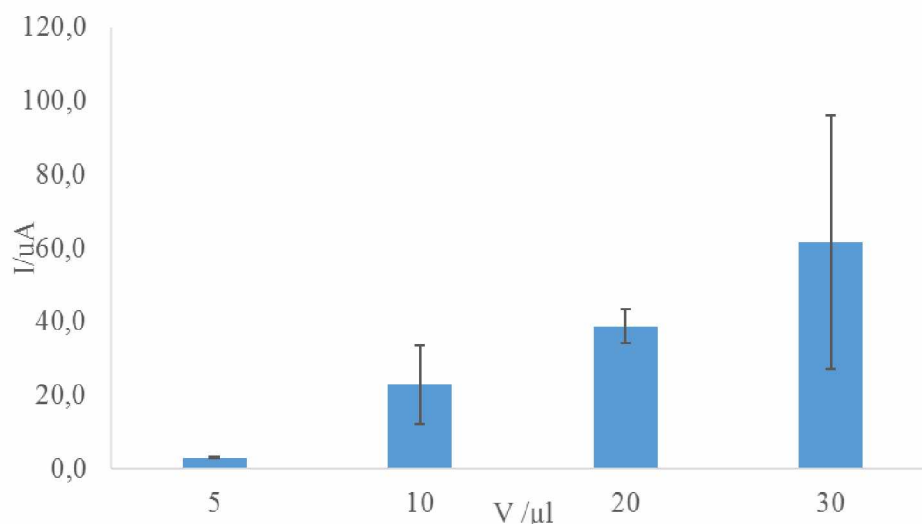
Obrázek 29 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Salmonella spp. s SiNPs-CdTe QDs měřeno na elektrodách Orion OHT 000 s in situ vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb), (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,8 V (průměrné hodnoty ze tří měření)

Výsledky získané na obou typech elektrod jsou srovnatelné. Na základě těchto výsledků bylo pro další experimenty vybráno množství 30 μl konjugátu s SiNPs-CdTe QDs. Dále byly testovány protilátky značené pomocí Ds-CdTe QDs (viz. obrázek 30).



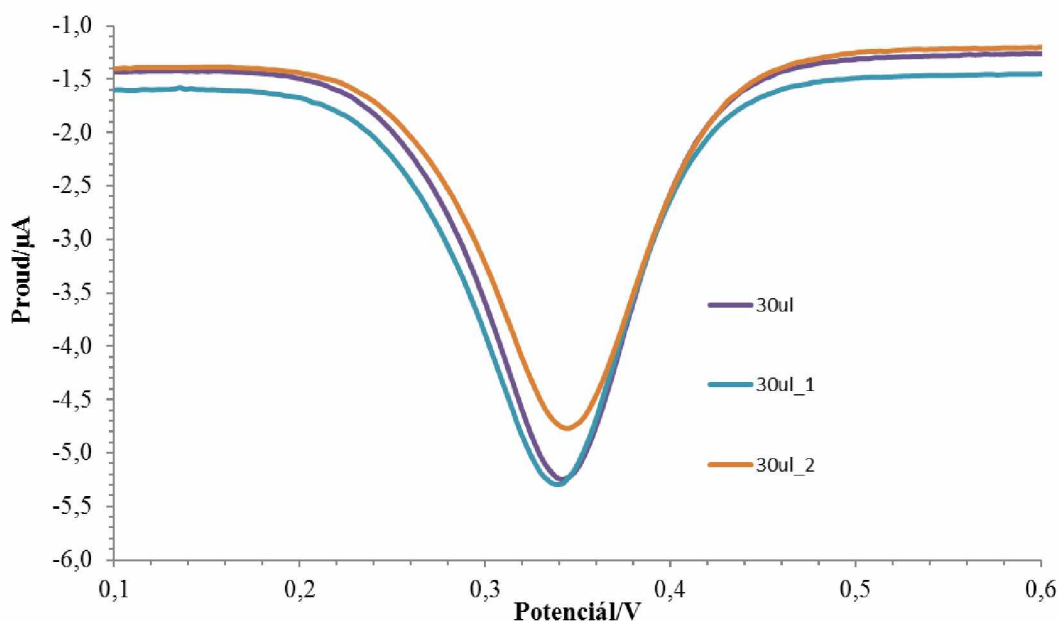
Obrázek 30 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Salmonella spp. s Ds-CdTe QDs měřeno na elektrodách DropSens C-110 s in situ vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb), (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,8 V (průměrné hodnoty ze tří měření)

V tomto případě bylo vybráno pro tvorbu komplexu množství konjugátu 15 μl . Při množství 20 μl je již rozdíl v proudové odezvě v porovnání s 15 μl minimální a z ekonomického hlediska proto bylo zvoleno 15 μl . V případě kombinace SiNPs-PbS QDs se jako optimální množství jeví 30 μl , stejně jako v případě SiNPs-CdTe QDs (viz. obrázek 31).



Obrázek 31 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Salmonella spp. s SiNPs-PbS QDs měřeno na elektrodách DropSens C-110 s in situ vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb) (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,5 V (průměrné hodnoty ze tří měření)

Pro konjugáty značené SiNPS-AuNPs bylo pro další experimenty používáno množství 30 μl , které bylo stanoveno jako optimální již v předešlých pracích a v rámci této práce nebylo testováno. Na obrázku 32 je uveden voltamogram pro tuto analýzu. Byla použita metoda SWCSV, elektrody DropSens C 110 (C-C/Ag-AgCl) a odečítáno při potenciálu 0,4 V.



Obrázek 32 SWCSV voltamogram měření proudové odezvy značených protilátek AuNPs a graf závislosti proudové odezvy na množství konjugátu s SiNPs- AuNPs elektrody DropSens C-110 (dávkové množství 100 µl), SWCSV, proudové odezvy odečítány při potenciálu 0,35 V.

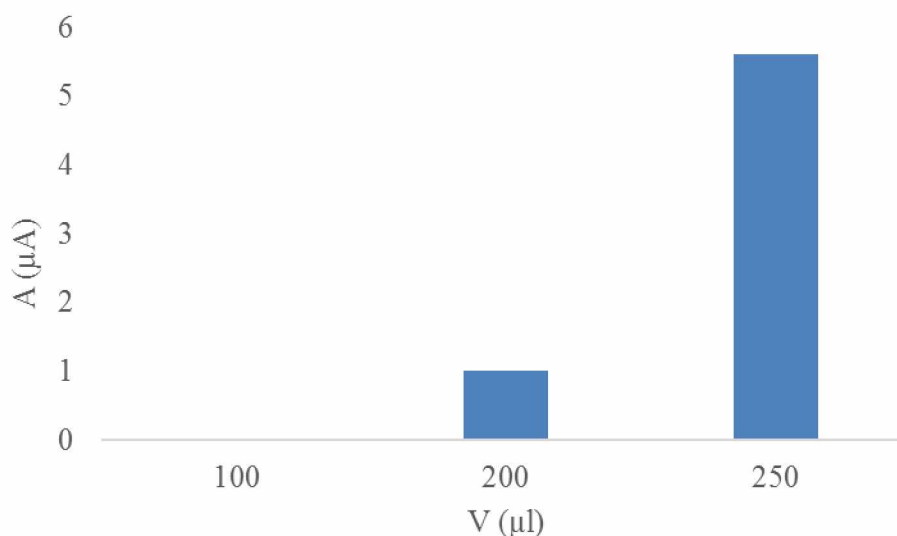
Na základě výsledků byly pro všechny experimenty vybrány elektrody DropSens C-110. Na nich byly testovány všechny konjugáty značené SiNPs-CdTe QDs, SiNPs-PbS a Ds-CdTe QDs a SiNPs-AuNPs, které poskytovaly dostatečné vysoké signály a před vlastním měřením nebylo nutné elektrochemické přečištění elektrod, které je nezbytné v případě elektrod Orion OHT000

4.5 Sestavení celého imunosenzoru pro detekci *Salmonella* spp.

Pro sestavení celého systému pro detekci bakteriálních buněk bylo vedle stanoveného optimálního množství konjugátu nezbytné určit i vhodné množství imunosenzoru tak, abychom dokázali zachytit bakteriální buňky i při co nejnižším množství buněk obsažených v suspenzi, a zároveň byli schopni navázat dostatek konjugátu pro detekci (jednotlivé kroky stanovení uvedeny na obrázku 23).

Bylo testováno množství 100, 200 a 250 µg imunosenzoru, ředění bakteriální suspenze bylo všude stejné, a to 10^2 CFU/ml. Detekční metoda byla opět square wave anodická rozpouštěcí voltametrie pro analýzu komplexu s QDs a katodická pro analýzu komplexu s AuNPs. Měření probíhalo na elektrodách DropSens C-110, a pro toto testování bylo použito 30 µl konjugátu SiNPs-CdTe QDs. Nejvhodnějším množstvím pro

záchyt bakteriálních buněk bylo určeno 250 μg imunosorbentu tj. 6,25 μg protilátek (obrázek 33), které bylo použito v následujících experimentech.



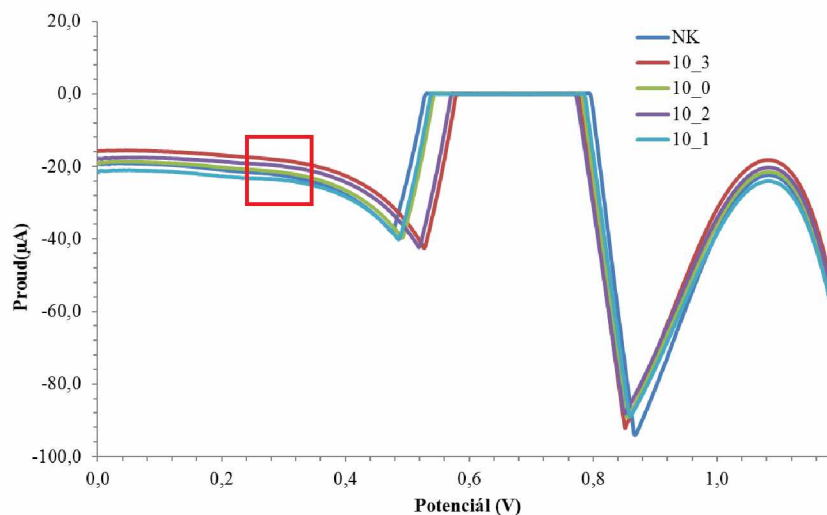
Obrázek 33 Závislosti proudové odezvy na množství použitého imunosorbentu. Použitý konjugát SiNPs-CdTe QDs, elektroda DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, odečítáno při potenciálu $-0,85\text{ V}$, měření bylo provedeno jednou

V těch poté bylo testováno různé množství buněk v rozmezí 10^0 - 10^3 CFU/ml *Salmonella* Typhimurium. K imunosorbentu byl přidáván vždy 1 ml suspenze daného ředění a současně i dané množství konjugátu značeného SiNPs-AuNPs, SiNPs-CdTe QDs, SiNPs-PbS QDs nebo Ds-CdTe QDs. V další části jsou uvedeny výsledky dosažené s jednotlivými konjugáty použitými pro označení imunokomplexu.

4.5.1 Elektrochemická detekce komplexu *Salmonella* spp. s použitím SiNPs-AuNPs

V případě konjugátu s SiNPs-AuNPs bylo vybráno používané množství 30 μl .

Přesto že, při předešlé analýze samotných konjugátů byly píky standardní (viz. obrázek 32), můžeme na obrázku 34 vidět, že při sestavení celého systému nebyl detekován pík charakteristický pro ionty zlata, který je odečítán při potenciálu 0,35 V. Celý záznam má navíc nestandardní průběh, který byl však získán opakovaně, a proto od využití těchto konjugátů s SiNPs-AuNPs bylo v další práci upuštěno.

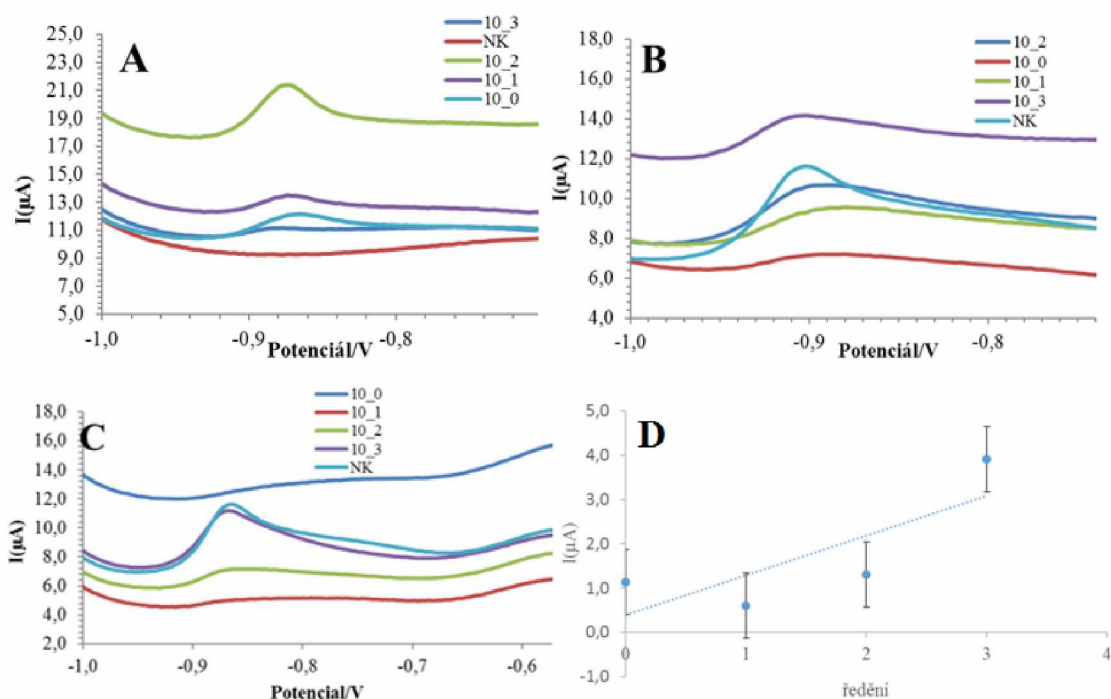


Obrázek 34 SWCSV voltamogram detekce *Salmonella* Typhimurium pomocí imunosenzoru s konjugátem s SiNPs-AuNPs, elektroda DropSens C-110, SWCSV, charakteristický pík pro ionty zlata je odečítán při potenciálu 0,35 V.

4.5.2 Elektrochemická detekce komplexu *Salmonella* spp. s použitím SiNPs-CdTe QDs

Dalším používaným konjugátem pro tvorbu imunosenzoru byl konjugát s SiNPs-CdTe QDs. Pro detekci byla použita metoda SWASV. Při detekci celého komplexu byl pozorován posun maxima píku Cd(II) k zápornějším potenciálům, proto byly proudové odezvy odečítány při potenciálu $-0,85 - -0,9$ V (obrázek 35).

Byly pozorovány vysoké proudové odezvy u negativních kontrol, které byly měřeny současně se vzorky obsahujícími bakteriální buňky. Negativní kontrola neobsahovala bakteriální suspenzi, ta byla nahrazena 1 ml PBS-T pufru, jinak probíhalo stanovení stejným postupem jako v případě vzorků obsahujících bakteriální buňky. Vysoké proudové odezvy u negativních kontrol mohly být způsobeny tím, že docházelo k sorpci konjugátu na samotný imunosorbent. Na základě toho se pak u ostatních experimentů prováděla před záchytem bakteriálních buněk blokáce imunosorbentu pomocí 1 % BSA po dobu 30 minut.

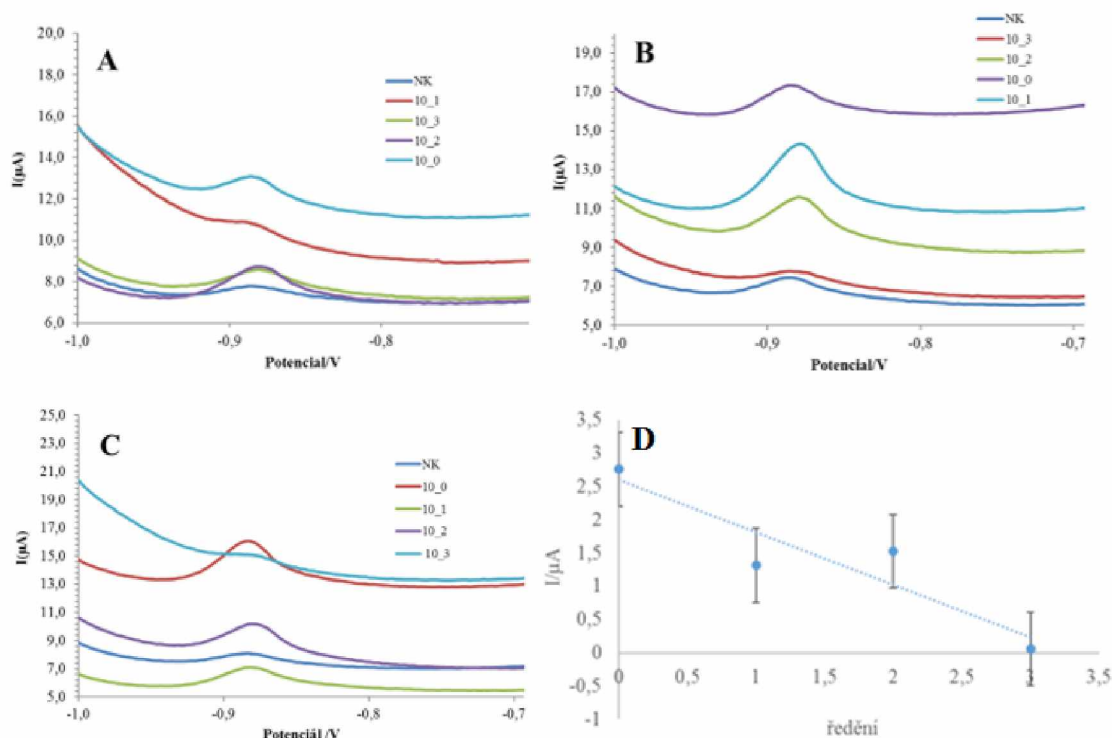


Obrázek 35 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie *Salmonella Typhimurium* s konjugátem SiNPs-CdTe QDs; elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, odezvy odečítány při potenciálu $-0,85$ V, A) voltamogram prvního měření B) voltamogram druhého měření C) voltamogram třetího měření D) závislost proudové hodnoty na ředění

Měření bylo provedeno třikrát, a pro celkové vyhodnocení byly kalkulovány průměrné hodnoty. Pro potvrzení, zda jednotlivá ředění odpovídají množství buněk, bylo použité ředění 10^0 - 10^3 CFU/ml vždy vyočkováno na TSA medium. Přestože ředění byla připravena správně a počty kolonií na miskách odpovídaly příslušnému ředění, byly velké rozdíly v proudových odezvách jednotlivých experimentů. Také nebyl pozorován vzestupný trend v závislosti na množství bakteriálních buněk, jak jsme předpokládali, a imunosenzor vykazoval špatnou reprodukovatelnost.

4.5.3 Elektrochemická detekce komplexu *Salmonella* spp. s použitím Ds-CdTe QDs

Postup sestavení imunokomplexu byl stejný jako v kapitole 3. 7. Měření probíhalo opět za použití SWASV na elektrodách DropSens-C110. Výška píku uvolněných Cd(II) iontů byla odečítána při potenciálu $-0,85$ V.



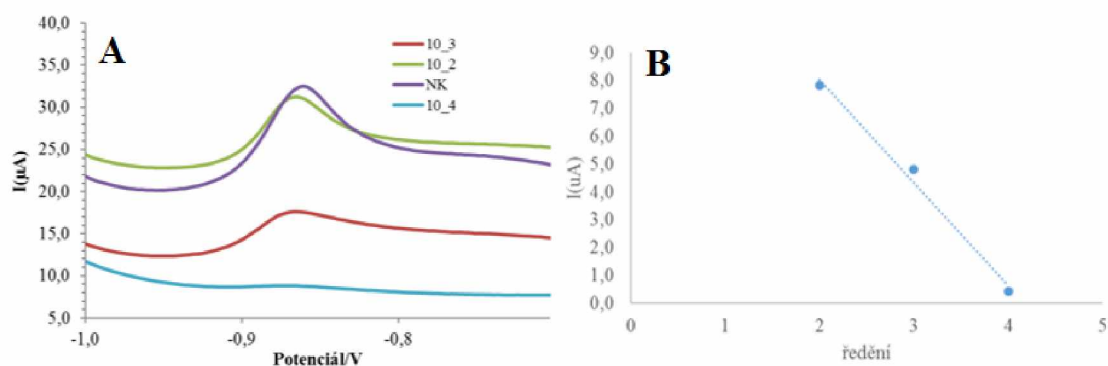
Obrázek 36 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie *Salmonella Typhimurium* s konjugátem *Ds-CdTe* QDs; elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, odezvy odečítány při potenciálu $-0,85$ V, A) voltamogram prvního měření B) voltamogram druhého měření C) voltamogram třetího měření D) závislost proudové hodnoty na ředění

Při tomto měření jsme pozorovali spíše klesající trend závislosti proudové odezvy na množství bakteriálních buněk ve vzorku. V tomto experimentu již byla přidána blokáce imunosorbentu před přidavkem suspenze bakteriálních buněk a jak je zřejmé z obrázku 36 negativní kontroly již nemají tak vysoké proudové odezvy, takže blokáce byla zahrnuta i do dalších experimentů. Opět pro kontrolu, zda množství buněk jednotlivých ředění odpovídá se ověřovalo vyočkováním na TSA medium a vyhodnoceny. V tomto případě, i přestože kontrola na miskách odpovídala též příslušným ředěním byly odezvy ředění 10^0 , 10^1 a 10^2 CFU/ml vyšší než ředění 10^3 CFU/ml. Na základě těchto výsledků byl postup přípravy imunosenzoru modifikován.

4.5.4 Imunosenzor pro detekci *Salmonella* spp. s použitím menšího množství nosiče a konjugátů s SiNPs-CdTe QDs, Ds-CdTe QDs a SiNPs-PbS QDs

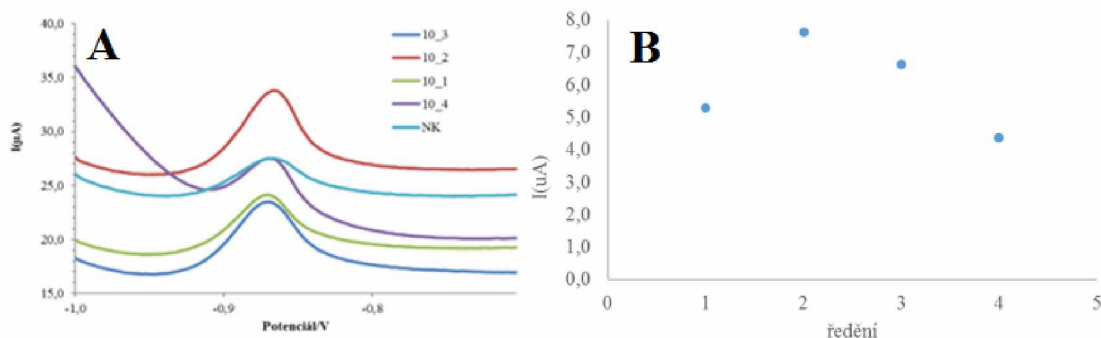
Na základě předchozích výsledků a poznatků s předešlých prací jsme vytvořili komplex, kdy bylo použito menší množství nosiče (100 μg) i přesto, že při prvních pokusech se jako vhodnější jevílo množství 250 μg .

Opět bylo použito několik množství bakteriálních buněk, konkrétně ředění suspenze od 10^1 do 10^4 CFU/ml. Toto měření (viz. obrázek 37) však vzhledem k časovým možnostem mohlo být provedeno pouze jednou.



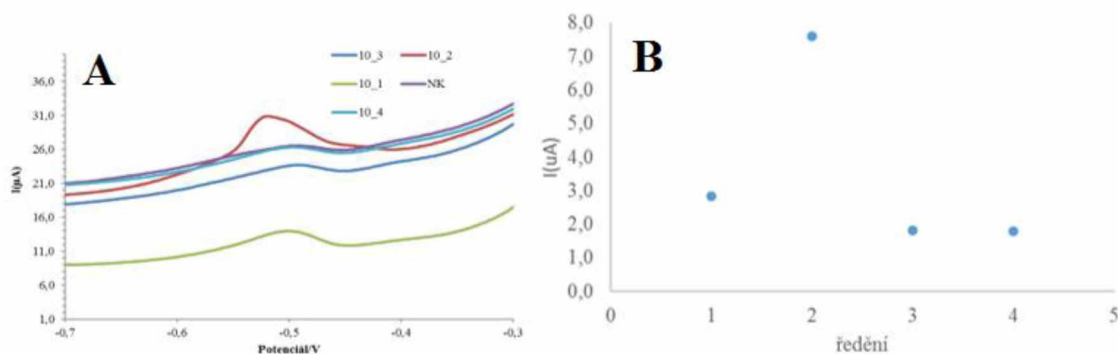
Obrázek 37 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci *Salmonella Typhimurium* s menším množstvím imunosorbentu; A) SWASV voltamogram měření celého systému se *Salmonella Typhimurium* s konjugátem s SiNPs-CdTe QDs; množství použitého imunosorbentu 100 μg , elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWAV, výšky píků odečítány při potenciálu - 0,9 V B) závislost proudové hodnoty na ředění suspenze bakteriálních buněk

Zde můžeme vidět (viz. obrázek 37 B) velký pokles odezvy u ředění 10^4 , namísto předpokládaného růstu proudové odezvy se zvyšujícím se množstvím buněk. Jedním vysvětlením by mohlo být přesycení imunosorbentu, kdy afinitní vazba není dostatečně silná a mohlo by dojít k následnému vymytí buněk konjugátem, který je přidáván současně se vzorkem, oproti obvyklému uspořádání sendvičové imunoanalýzy. Proudové odezvy všech ředění byly jinak srovnatelné s předchozími měřeními. Obdobně tomu bylo při použití konjugátu Ds-CdTe QDs, kde jak můžeme vidět na obrázku 38 B, byla nejvyšší odezva při ředění 10^2 CFU/ml, ale při 10^4 CFU/ml již opět velký pokles.



Obrázek 38 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci *Salmonella Typhimurium* s menším množstvím imunosorbentu; A) SWASV voltamogram měření celého systému se *Salmonella Typhimurium* s konjugátem s Ds-CdTe QDs; množství použitého imunosorbentu 100 μg , elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků odečítány při potenciálu - 0,9 V B) závislost proudové hodnoty na ředění suspenze bakteriálních buněk

Další použitou značkou pro přípravu konjugátů byly SiNPs- PbS QDs. Ty byly vybrány zejména proto, že v případě, pokud bychom chtěli stanovit dva druhy bakterií vedle sebe v jednom stanovení, je možné kombinovat kvantové tečky různých kovů, které jsou využity jako značky protilátek, protože po uvolnění odpovídajícího kovu poskytují proudovou odezvu při různých potenciálech. Pb(II) mají charakteristický detekční potenciál -0,6 V, ale při měření celého systému opět docházelo k jeho posunu, a to k -0,5 V (viz. obrázek 39).



Obrázek 39 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci *Salmonella Typhimurium* s menším množstvím imunosorbentu; A) SWASV voltamogram měření celého systému se *Salmonella Typhimurium* s konjugátem s SiNPs-PbS QDs; množství použitého imunosorbentu 100 μg , elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků odečítány při potenciálu - 0,5 V B) závislost proudové hodnoty na ředění suspenze bakteriálních buněk

Při tomto měření můžeme vidět úplné vychýlení proudové odezvy ředění 10^2 CFU/ml a není pozorován předpokládaný trend závislosti.

Ve všech případech byly suspenze jednotlivých ředění vyočkovány a spočítány vyrostlé kolonie. Počet kolonií vždy řádově odpovídal danému ředění, z čehož lze usoudit, že odchylky jsou způsobeny problémy při tvorbě imunokomplexu.

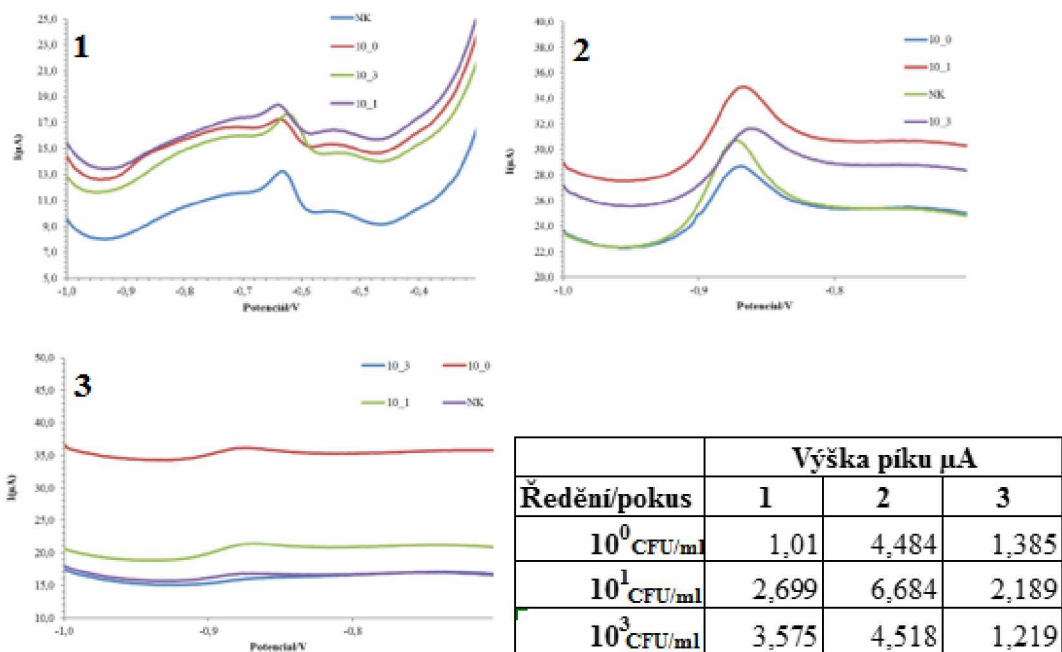
4.5.5 Imunosenzor pro detekci *Salmonella* spp. za použití tří různých postupů sestavení imunosenzoru

Další možností, kterou jsme zkoušeli, abychom byli schopni zdůvodnit nefunkčnost systému pro detekci *Salmonella* Typhimurium a velké odchylky mezi jednotlivými měřeními, bylo zkoušení tří způsobů tvorby imunokomplexu, kdy rozdíl v jednotlivých způsobech byl v přidavku jednotlivých reagensů (viz. tabulka 9).

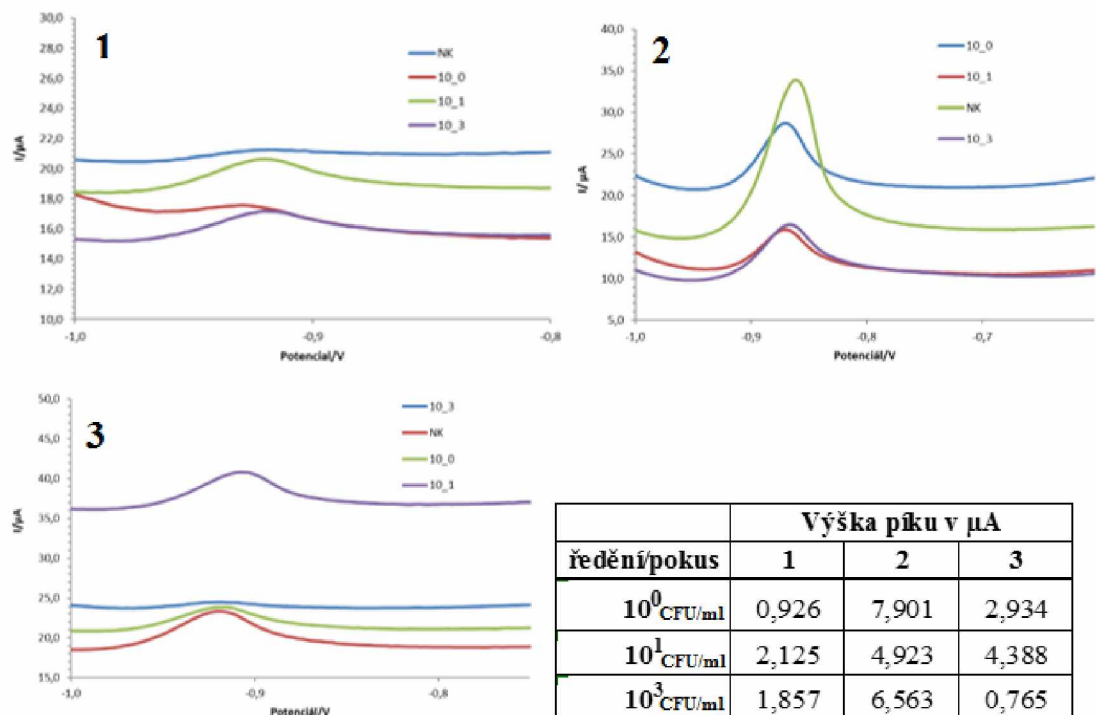
Tabulka 9 Jednotlivé postupy sestavení imunosenzoru pro detekci *Salmonella* Typhimurium

Postup	1	2	3
Množství imunosorbentu	100 µg	100 µg	100 µg
Použité ředění suspenze (CFU/ml)	10 ⁰ , 10 ¹ , 10 ³	10 ⁰ , 10 ¹ , 10 ³	10 ⁰ , 10 ¹ , 10 ³
1. krok	Imunosorbent + bakteriální suspenze (1 H, lab. teplota)	bakteriální suspenze + konjugát (30 min., lab. teplota)	Imunosorbent + bakteriální suspenze + konjugát (1 H, lab. teplota)
2. krok	+ konjugát (30 min., lab. teplota)	+ imunosorbent (1 H, lab. teplota)	-

Tyto postupy byly použity stejné jak pro tvorbu imunosenzoru s použitím konjugátu s SiNPs-CdTe QDs, kdy výsledky měření jsou uvedeny na obrázku 40, tak pro konjugáty s Ds-CdTe QDs, uvedené na obrázku 4.



Obrázek 40 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk *Salmonella Typhimurium*, konjugát SiNPs-CdTe QDs, elektrody Dropsens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků byly odčítány při potenciálu -0,85 V, 1) postup č. 1, 2) postup č.2, 3) postup č. 3, které jsou popsány v tabulce 8



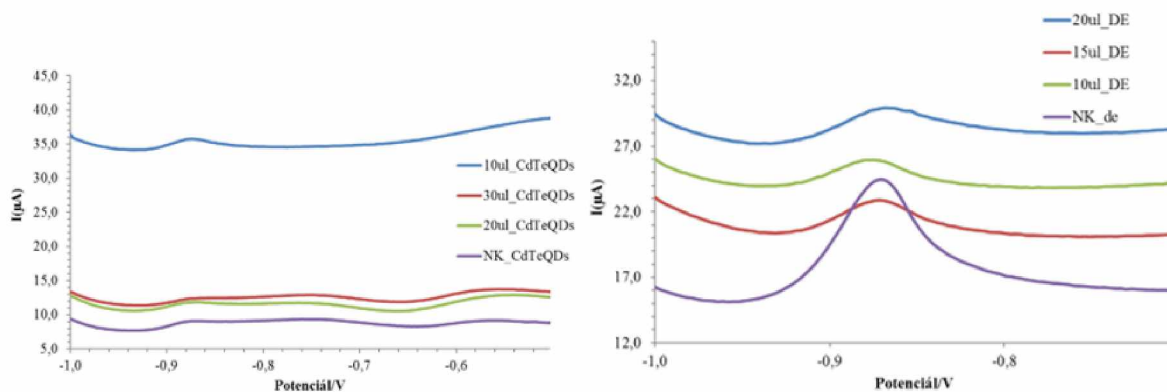
Obrázek 41 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk *Salmonella Typhimurium*, konjugát Ds-CdTe QDs, elektrody Dropsens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků byly odčítány při potenciálu -0,85 V, 1) postup č. 1, 2) postup č.2, 3) postup č. 3, které jsou popsány v tabulce 8

Výsledky byly obdobné, jak za použití konjugátů s SiNPs-CdTe QDs i Ds-CdTe QDs. I přesto, že u pokusu dvě jsou proudové odezvy vyšší v porovnání s ostatními, a to jak v případě použitého konjugátu s SiNPs-CdTe QDs tak Ds-CdTe QDs, rostoucí proudová odezva s rostoucím množstvím buněk pozorována nebyla. Tento experiment nijak zvlášť nepřispěl k vyřešení předešlých problémů, a tak nadále byl používán postup 3.

4.5.6 Imunosenzor pro detekci *Salmonella* spp. s využitím různého množství konjugátu

Další z možností bylo vyzkoušet, zdali je množství použitého konjugátu opravdu optimální pro detekci komplexu. V prvních experimentech byly elektrochemicky kontrolovány pouze samotné protilátky pro konjugaci s elektroaktivní značkou, kdy nám výsledky poskytly pouze informaci, že i po konjugaci značka poskytne signál, ale ne informaci o tom, zda u protilátek není ovlivněna schopnost vazby na antigen. Proto bylo použito 100 μg imunosorbentu, ředění 10^1 CFU/ml bakteriální suspenze *Salmonella* Typhimurium a byly použity konjugáty s SiNPs-CdTe QDs a Ds-CdTe QDs. Testované množství konjugátu v případě SiNPs-CdTe QDs bylo 10, 15 a 20 μl , pro Ds-CdTe QDs to bylo 5, 10, 20, 30 μl .

Výsledky měření potvrdily, že doposud používaná množství konjugátů jsou optimální, tedy 30 μl SiNPs-CdTe QDs a 15 μl Ds-CdTe QDs (viz. obrázek 42).



objem značky	výška píku μA
10 μl	1,464
20 μl	1,27
30 μl	1,201

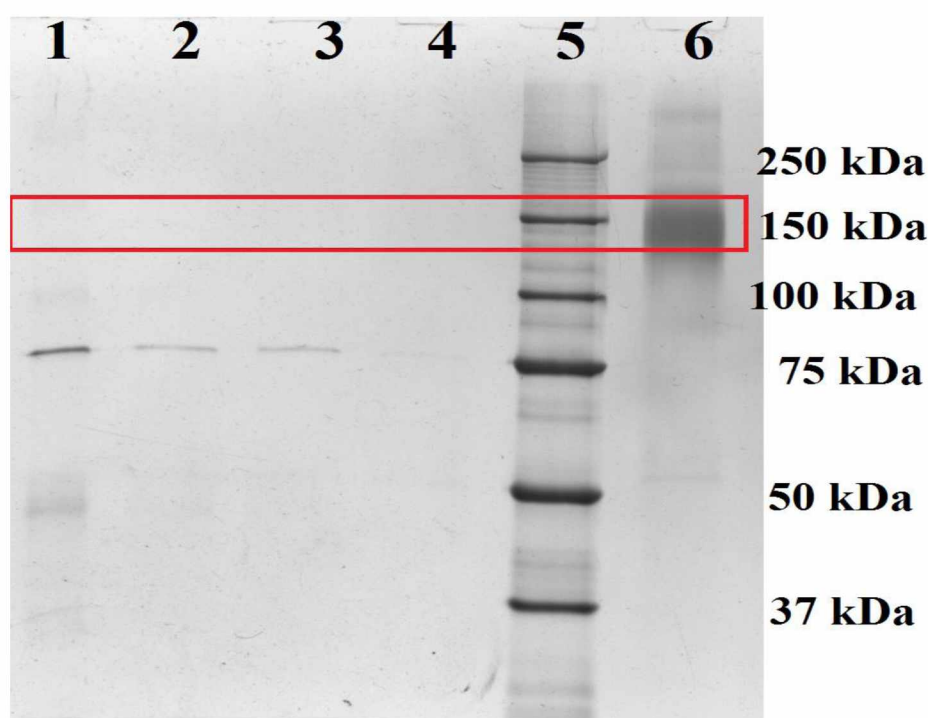
objem značky	Výška píku μA
10 μl	1,994
15 μl	2,595
20 μl	2,438

Obrázek 42 Voltamogramy měření imunokomplexu za použití různého množství konjugátů při detekci *Salmonella* Typhimurium, elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, 10, 20, 30 μl pro SiNPs-CdTe QDs, 5, 10, 20 μl Ds-CdTe QDs

4.6 Příprava magnetických nosičů anti-*Campylobacter jejuni*

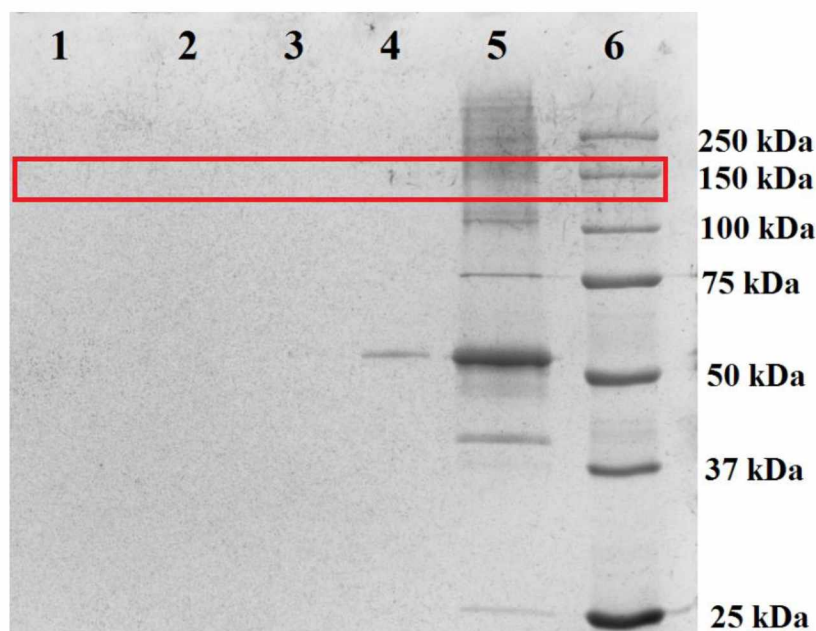
Druhou bakterií, která byla vybrána pro detekci, byl *Campylobacter jejuni*. Pro detekci byly použity optimalizované postupy, které byly použity v případě bakterie *Salmonella* Typhimurium.

Pro přípravu imunisorbentu s protilátkami anti-*Campylobacter jejuni* byla také použita karbodiimidová metoda, a podle postupu uvedeného v kapitole 3. 2. bylo použito 7,5 mg EDC a 1,25 mg sulfo-NHS na 1 mg částic. Účinnost imobilizace byla také ověřena SDS-PAGE analýzou frakcí před a po imobilizaci a promývacích frakcí (viz. obrázek 43). Účinnost imobilizace byla vyhodnocena denzitometricky a dosahovala 89 %.



Obrázek 43 SDS-PAGE analýza pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti-*Campylobacter jejuni* na magnetické částice, 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra. 1- frakce po imobilizaci, 2-1. promývací frakce MES pufrem, 3-2. promývací frakce MES pufrem, 4- promývací frakce MES pufrem s 0,1 M NaCl. 5- standard molekulových hmotností (10-250 kDa), 6- původní vzorek protilátek před imobilizací

Byly použity i monoklonální myší protilátky anti-*Campylobacter jejuni* od firmy Thermo scientific, které byly zakoupeny. Jak je již vidět na obrázku 44, protilátky jsou částečně rozpadlé na těžké řetězce, nicméně imobilizace na magnetické částice byla také úspěšná.



Obrázek 44 SDS-PAGE analýza pro ověření účinnosti imobilizace protilátek anti-*Campylobacter jejuni* (Thermo Scientific) na magnetické částice, 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra. 1- frakce po imobilizaci, 2-1. promývací frakce MES pufrem, 3-2. promývací frakce MES pufrem, 4- promývací frakce MES pufrem s 0,1 M NaCl. 5- původní vzorek protilátek před imobilizací, 6- standard molekulových hmotností (10-250 kDa)

4.7 Ověření účinnosti záchytu buněk *Campylobacter jejuni* s využitím připraveného imunosorbentu

Zda je připravený imunosorbent s primárními polyklonálními protilátkami anti-*Campylobacter jejuni* (BioRad) účinný pro záchyt bakteriálních buněk z připravené suspenze *Campylobacter jejuni* se ověřovalo následovně. Z výchozí bakteriální suspenze se zákalem 2 podle McFarlanda (odpovídá 1×10^8 CFU/ml) byla připravena ředění 10^3 - 10^1 CFU/ml. Pro ověření záchytu bylo použito 250 μ g imunosorbentu, ke kterému byl přidán 1 ml bakteriální suspenze příslušného ředění a po inkubaci následovalo vyočkování částic s vychytanými buňkami, vazebné frakce a dvou promývacích frakcí na Columbia agar. Po kultivaci (48 h, 42 °C, anaerobní prostředí) byla procentuálně vyjádřena účinnost záchytu (viz. tabulka 10). Experiment byl proveden třikrát. Výsledky ukazují, že nejvyšší účinnost záchytu je při ředění 10^1 a 10^2 CFU/ml. V případě ředění 10^3 CFU/ml pravděpodobně došlo již k převýšení kapacity nosiče. Již při těchto kontrolách v některých případech docházelo k tomu, že více kolonií narostlo ve vazebných a promývacích frakcích, což by nasvědčovalo tomu, že ve srovnání s imunosorbenty s anti-*Salmonella* spp. protilátkami, je připravený imunosorbent méně účinný.

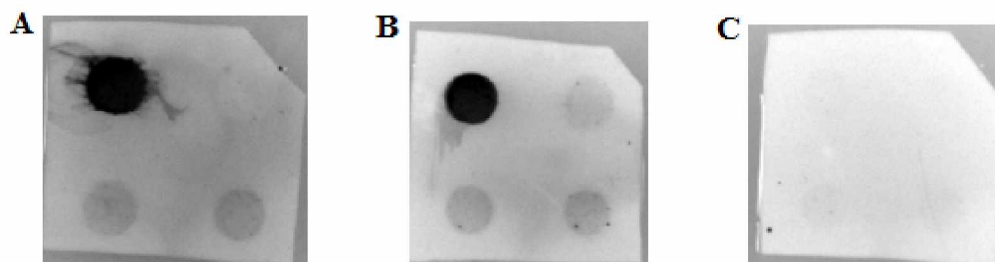
Tabulka 10 Vyhodnocení účinnosti záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* pomocí imunosorbentu. Výsledky jsou vždy v procentech po jednotlivých ředění. Výsledná účinnost je sumou vyočkovaných frakcí částic, vazebné frakce a dvou promývacích, vztahena k původním suspenzím

Ředění	Záchyt (%) jednotlivých pokusů		
	1	2	3
10 ¹	100	66	26
10 ²	72	53	104
10 ³	23	15	32

Ověření záchytu bakterií pomocí imunosorbentu s novými protilátkami (monoklonální protilátka Thermo scientific, Prod MA 1-35036 0,2 mg/ml) ukázalo, že imunosorbent není účinný a po kultivaci byl pozorován nárůst kolonií pouze ve vazebné frakci a promývacích frakcích.

Na základě těchto výsledků byla provedena DotBlot analýza podle postupu 3.4. Tato metoda slouží k potvrzení, zda dané protilátky vykazují afinitu k danému antigenu. Pro srovnání byla DotBlot analýza provedena i pro používané polyklonální protilátky anti-*Salmonella* spp. (BioRad) a anti-*Campylobacter jejuni* (BioRad). Principem je dávkování antigenu (3 µl bakteriální suspenze 10⁸ CFU/ml ve 100 µl PBS pufru) na membránu umístěnou v aplikační aparatuře, kde antigen vytvoří zóny v podobě kruhových zón. Vedle toho byla současně se vzorkem nadávkována negativní kontrola v podobě proteinu, se kterým testované protilátky nereagují a fosfátový pufr jako negativní kontrola prostředí. Následuje blokáce membrány pomocí roztoku hovězího albuminu (BSA), aby se eliminovala nespecifická sorpce. Po promytí následuje inkubace s testovanou protilátkou. Poté je membrána promyta a inkubována se sekundární protilátkou značenou enzymem křenuvou peroxidázou (ředěná 1:1000), která je specifická proti testované protilátce. Po inkubaci a důkladném promytí se celý komplex vizualizoval kolorimetricky s použitím OPTI-4CN kitu (BioRad).

anti- <i>Salmonella</i> spp. (polyklonální (BioRad))		anti- <i>Campylobacter jejuni</i> (polyklonální (BioRad))		anti- <i>Campylobacter jejuni</i> (monoklonální (ThermoScientific))	
100 µl vzorku <i>Salmonella</i> Typhimurium	Prázdná jamka	100 µl vzorku <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	Prázdná jamka	100 µl vzorku <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	Prázdná jamka
3 µg BSA	Fosfátový pufr 10 mM	3 µg BSA	Fosfátový pufr 10 mM	3 µg BSA	Fosfátový pufr 10 mM



Obrázek 45 DotBlot analýza pro ověření afinity testovaných protilátek k danému antigenu (tabulka nad obrázkem odpovídá vždy pořadí dávkovaných vzorků na membráně), A) testované protilátky anti-*Salmonella* spp.(polyklonální, BioRad) B) testované monoklonální protilátky anti-*Campylobacter jejuni* (BioRad) C) testované monoklonální protilátky anti-*Campylobacter jejuni* (ThermoScientific)

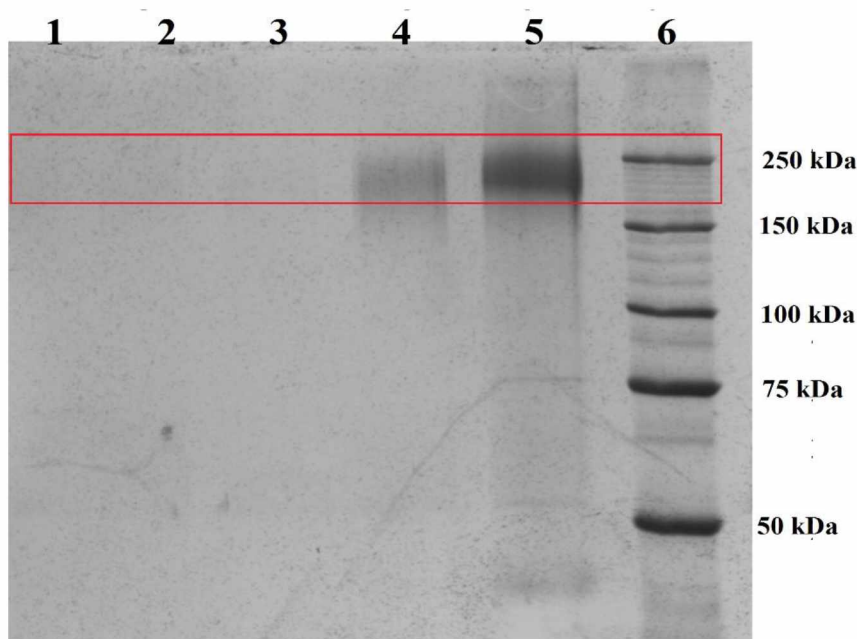
Výsledek DotBlot analýzy potvrdil výsledek kultivační metody pro ověření zachytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* s využitím monoklonálních protilátek anti-*Campylobacter jejuni* (ThermoScientific). Na obrázku 45C není viditelný spot. To znamená, že se na antigen nenavázaly žádné protilátky, a tak nedošlo následně k vazbě sekundárních protilátek. Proto v dalších experimentech byly používány pouze protilátky polyklonální. Na obrázku 45A a 45B jsou spoty viditelné a byla tedy potvrzena jejich reaktivita s danými bakteriálními buňkami.

4.8 Příprava značených protilátek anti-*Campylobacter jejuni*

Pro detekci bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* byly, stejně jako v případě *Salmonella* Typhimurium, vybrány protilátky značené kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi nebo zlaté nanočástice v kombinaci se silika nanočásticemi (viz. tabulka 7 v kapitole 4.4). Postup jejich přípravy byl shodný jako v případě anti-*Salmonella* spp. značených protilátek, tedy karbodiimidovou metodou (viz. kapitola 3.6). Pro kontrolu účinnosti přípravy značených protilátek byla opět použita SDS-PAGE analýza, pro elektrochemické ověření, zda připravený konjugát poskytuje signál, square wave anodická/katodická rozpouštěcí voltametrie na elektrodách DropSens C-110 (C/C/Ag-AgCl).

4.8.1 SDS-PAGE analýza pro kontrolu značených protilátek

SDS-PAGE analýza byla provedena na 10 % polyakrylamidovém dělicím gelu a 5 % zaostřovacím, který byl po separaci barven roztokem amoniakálního stříbra. Na gel bylo vždy dávkováno 10 μ l vzorku. Účinnost konjugace SiNPs-CdTe QDs s anti-*Campylobacter jejuni* byla cca 90 %.



Obrázek 46 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro stanovení účinnosti konjugace protilátek anti-*Campylobacter jejuni* s SiNPs-CdTe QDs, 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvené roztoku amoniakálního stříbra. 1- promývací frakce, 2- promývací frakce, 3- promývací frakce, 4- vazebná frakce, 5- původní vzorek, 6- standard molekulové hmotnosti (10-250 kDa)

V případě konjugace protilátek s SiNPs-PbS QDs a SiNPs-AuNPs byla účinnost srovnatelná (data nejsou uvedena).

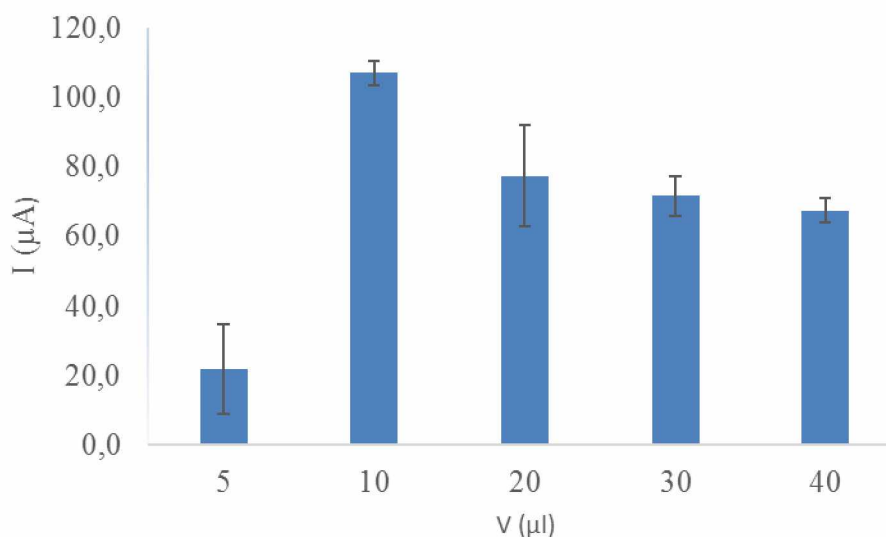
4.8.2 Elektrochemická detekce připravených značených protilátek

I v případě bakterie *Campylobacter jejuni*, bylo potřeba ověřit, zda připravené konjugáty poskytují elektrochemickou odezvu a následně najít optimální množství konjugátu, který bude použit pro detekci vzniklého imunokomplexu.

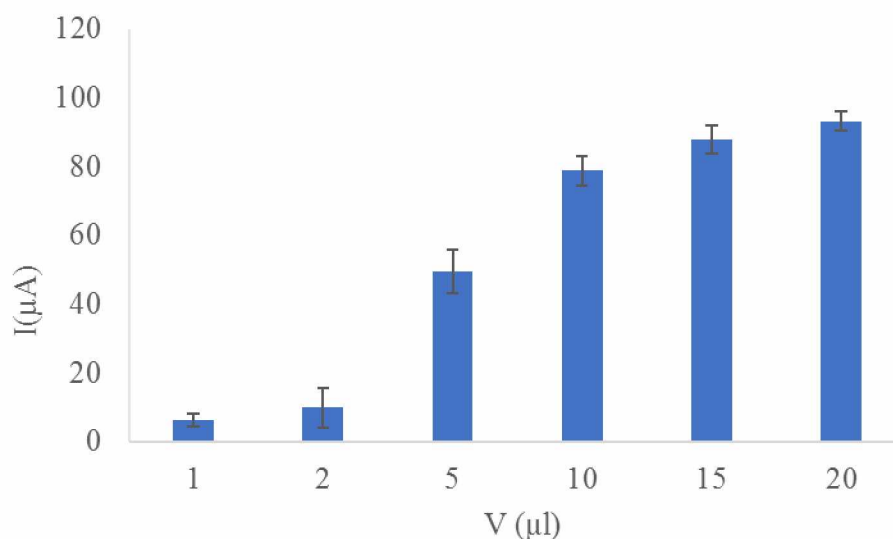
Konjugáty byly proměřeny na elektrodách DropSens C-110 (Španělsko) a měřeny metodou square wave anodické/katodické rozpouštěcí voltametrie. Celý experiment probíhal stejně jako v případě *Salmonella* Typhimurium a bylo i tak hodnoceno (kapitola 4.4.2)

Na obrázku 47—50 jsou uvedeny získané výsledky kdy v případě konjugátu s SiNPs-CdTe QDs bylo jako optimální množství konjugátu poskytující dostatečnou proudovou

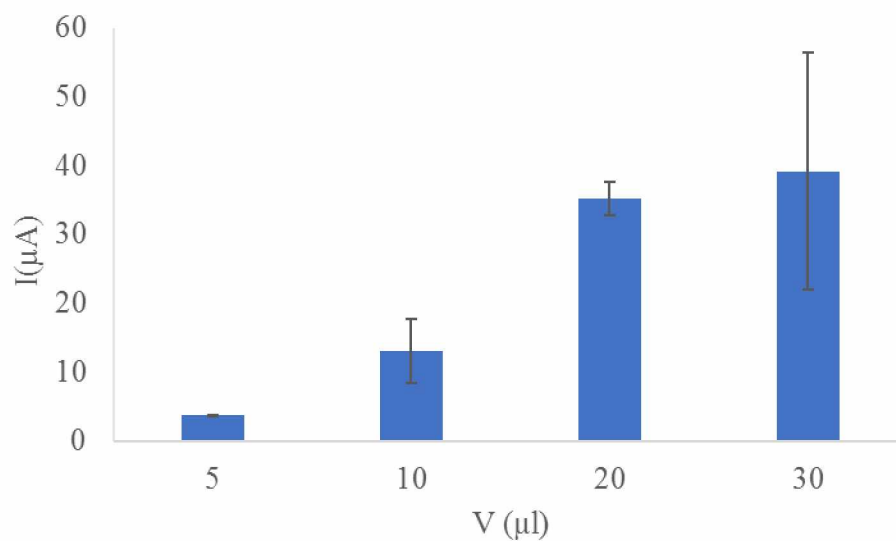
odezvu 10 μl , stejně jako u konjugátu s Ds-CdTe QDs (viz. obrázek 47, 48). Testovány byly dále konjugáty s SiNPs-PbS QDs (viz. obrázek 49) a SiNPs-AuNPs (viz. obrázek 50). Po vyhodnocení bylo jako optimální množství s dostatečnou odezvou vybráno 10 μl i v případě těchto konjugátů.



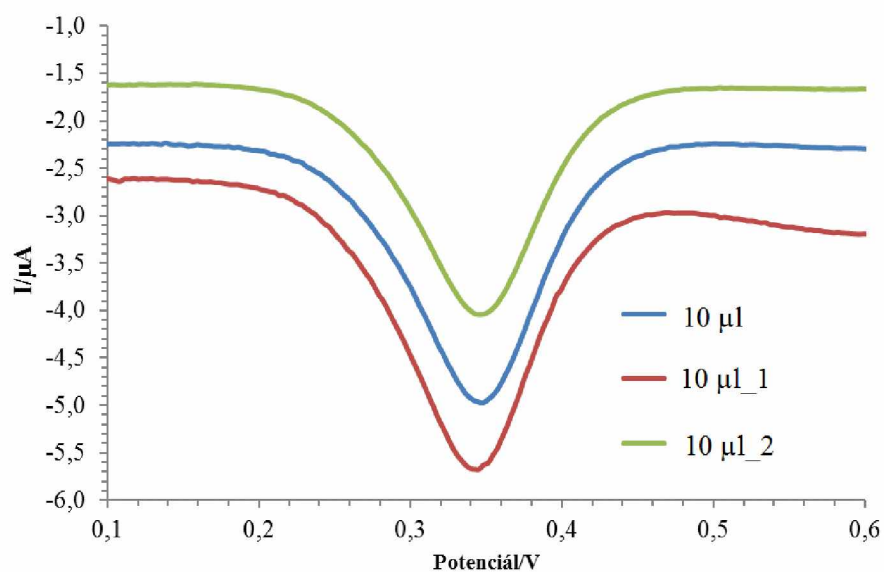
Obrázek 47 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Campylobacter jejuni. s SiNPs-CdTe QDs měřeno na elektrodách DropSens C 110 s in situ vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb), (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,8 V (průměrné hodnoty ze tří měření)



Obrázek 48 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Campylobacter jejuni. s Ds-CdTe QDs měřeno na elektrodách DropSens C 110 s in situ vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb), (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,8 V (průměrné hodnoty ze tří měření)



Obrázek 49 Závislosti proudové odezvy na množství použitého objemu konjugátu – anti-Campylobacter jejuni. s SiNPs-PbS QDs měřeno na elektrodách DropSens C 110 s in situ vytvořeným bismutovým filmem (500 ppb), (dávkové množství na elektrodu 100 μl), detekční metoda SWASV, odečítáno při potenciálu -0,5 V (průměrné hodnoty ze tří měření)



Obrázek 50 Voltamogram proudové odezvy značených protilátek SiNPs-AuNPs, elektrody DropSens C-110 (dávkové množství 100 μl), SWCSV, proudové odezvy odečítány při potenciálu 0,35 V (průměrné hodnoty)

Při měření konjugátů s SiNPs-AuNPs byly pozorovány také velké rozdíly proudových hodnot.

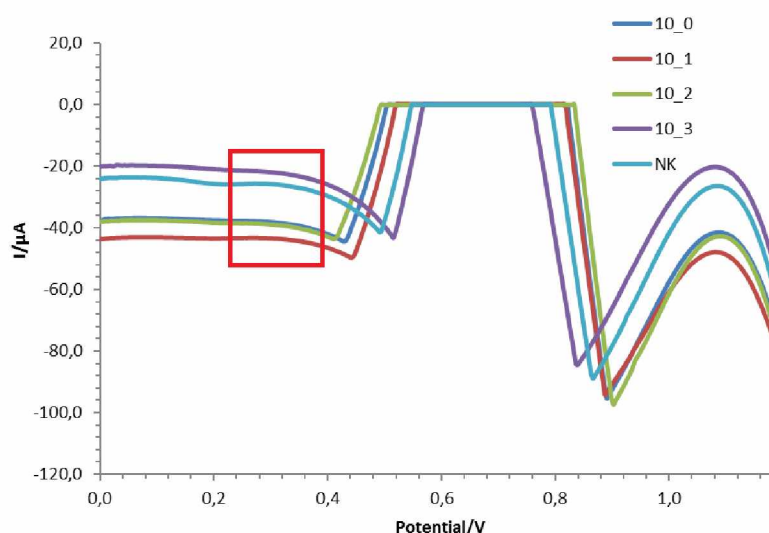
4.9 Sestavení celého imunosenzoru pro detekci *Campylobacter jejuni*

Podmínky a postupy při sestavení imunosenzoru pro detekci *Campylobacter jejuni* vycházely z výsledků získaných pro bakterii *Salmonella Typhimurium*. Celý systém měření byl založený na stejném principu a můžeme ho vidět na obrázku 23 (strana 61).

Nejprve bylo používáno množství imunosorbentu 250 μg . K tomuto množství imunosorbentu byl vždy přidán 1 ml bakteriální suspenze *Campylobacter jejuni* o příslušném ředění a současně optimální množství konjugátu, což v případě *Campylobacter jejuni* bylo vždy 10 μl . Po inkubaci a uvolnění iontů tvořících jádro elektroaktivní značky v kyselém prostředí. Vzorky byly analyzovány pomocí SWASV/SWCSV na elektrodách DropSens-C110 (Španělsko).

4.9.1 Elektrochemická detekce komplexu *Campylobacter jejuni* s SiNPs-AuNPs

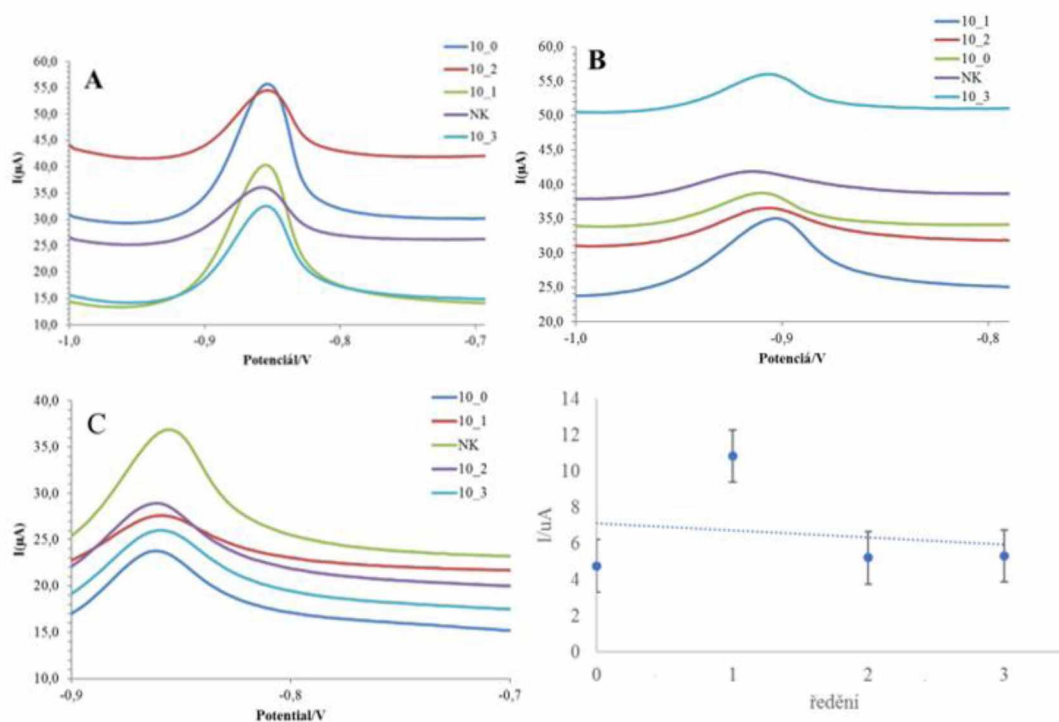
Z obrázku 51 je patrné, že při sestavení celého systému za použití konjugátu s SiNPs-AuNPs nebyl získán charakteristický pik pro ionty zlata, který je měřen při potenciálu 0,35 V, stejně jako v případě detekce bakterií *Salmonella Typhimurium*. Proto nebyly konjugáty SiNPs-AuNPs ani pro detekci *Campylobacter jejuni* dále používány.



Obrázek 51 Voltamogram square wave katodické rozpouštěcí voltametrie, elektroda DropSens C-110, charakteristický pik pro zlaté nanočástice se odečítá při potenciálu 0,35 V.

4.9.2 Elektrochemická detekce komplexu *Campylobacter jejuni* s SiNPs-CdTe QDs

Při detekci bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* s konjugáty s kvantovými tečkami byla použita metoda SWASV. Při měření docházelo k posunu potenciálového maxima pro uvolnění Cd(II) při sestavení celého systému. Proto byly odezvy odečítány při potenciálu -0,85 V.



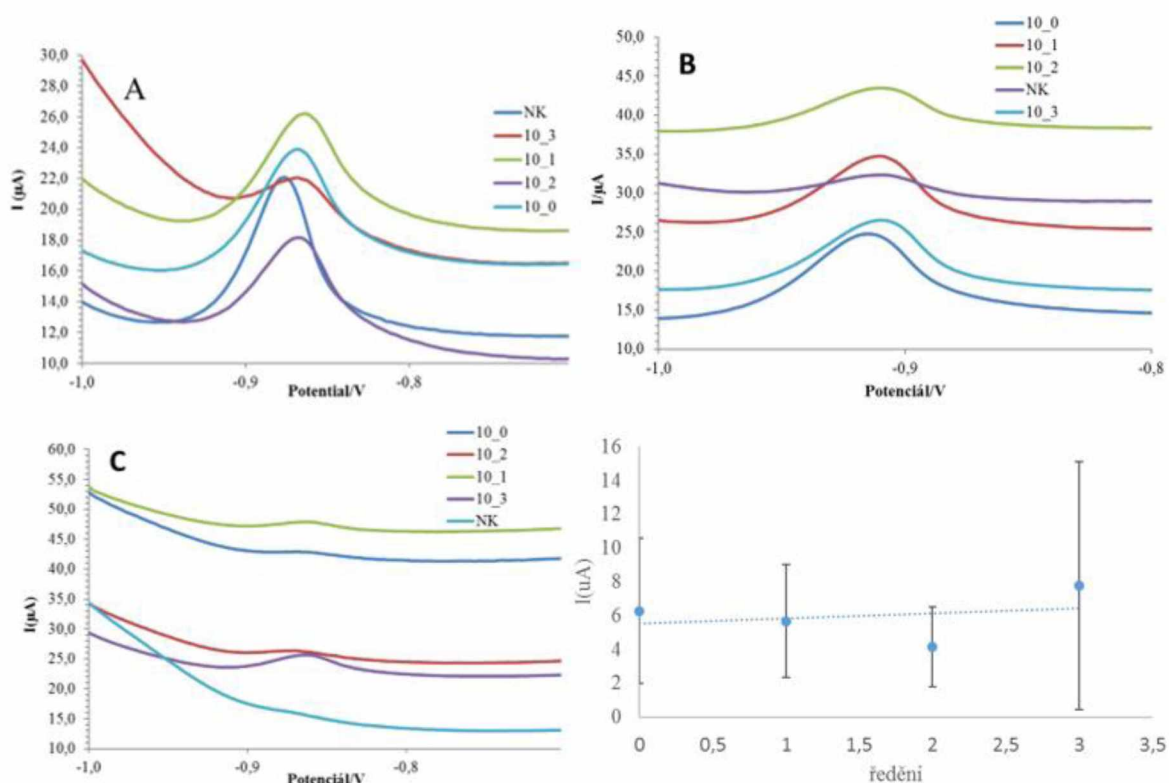
Obrázek 52 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie *Campylobacter jejuni* s konjugátem SiNPs-CdTe QDs; elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, odezvy odečítány při potenciálu -0,85 V, A) voltamogram prvního měření B) voltamogram druhého měření C) voltamogram třetího měření D) závislost proudové hodnoty na ředění

Kromě posunu potenciálového maxima, byly pozorovány vysoké proudové odezvy v případě negativních kontrol, které místo bakteriální buňky obsahovaly pouze pufr. Bylo již zmíněno, že to mohla způsobovat vysoká sorpce konjugátu na samotný imunosorbent. S tímto problémem jsme se potýkali i v případě bakterie *Salmonella* Typhimurium, a proto jsme i zde zavedli blokaci imunosorbentu před záchytem bakteriálních buněk. Použité ředění 10⁰-10³ CFU/ml bylo pro ověření vyočkováno na Columbia agar a inkubováno, abychom si ověřili, zda dané ředění korespondovali počtu nárůstu kolonií na misce. Přestože počty buněk na miskách odpovídaly, rozdíly v proudových odezvách danému ředění neodpovídalo. Docházelo pravděpodobně k přesycení imunosorbentu v případě obsahu vyššího počtu buněk a křivka nemá vzestupný trend se stoupajícím počtem buněk, jak jsme předpokládali.

4.9.3 Elektrochemická detekce komplexu *Campylobacter jejuni* s Ds-CdTe QDs

Ani v případě použití konjugátu s Ds-CdTe QDs, měřeno SWASV na elektrodách DropSens C-110 nebyl trend dle předpokladu stoupající. Můžeme však pozorovat (viz. obrázek 53) že ředění 10^3 CFU/ml má vyšší odezvu než předchozí nižší ředění. A však, v případě že jsme porovnali nárůst bakterie na misce, na které byla pro kontrolu vyočkováána ředění původní suspenze, kde se nárůst pohyboval okolo 900 kolonií, což znamená v řádech 10^2 CFU/ml, je tento nárůst proudu možný. U elektrochemické detekce totiž nezáleží na stáří kultury, proto na miskách jsme se mohli pohybovat v nižších počtech a elektrochemicky buňky přesto detegovat.

Tudíž dalším předpokladem je, že detekci komplexu může ovlivnit i stáří buňky.

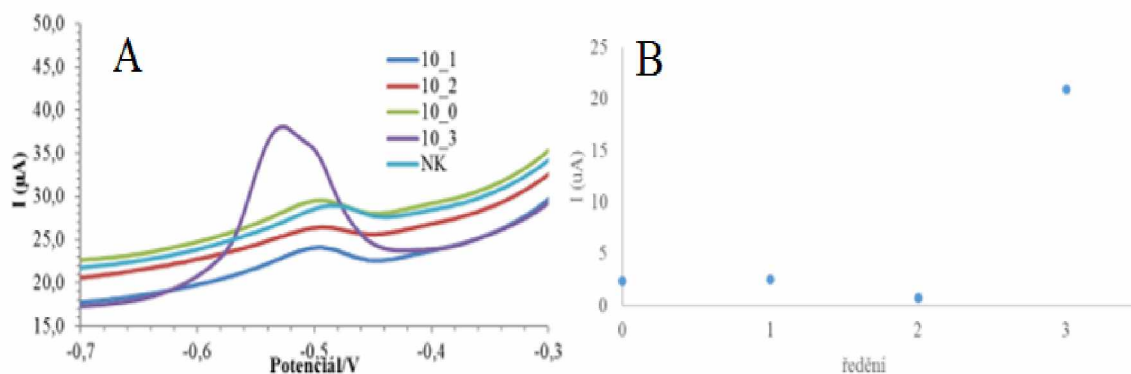


Obrázek 53 Výsledky jednotlivých měření při sestavení kompletního imunosenzoru pro detekci bakterie *Campylobacter jejuni* s konjugátem Ds-CdTe QDs; elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, odezvy odečítány při potenciálu $-0,85$ V, A) voltamogram prvního měření B) voltamogram druhého měření C) voltamogram třetího měření D) závislost proudové hodnoty na ředění

Dále byl na základě těchto poznatků postup přípravy imunosenzoru modifikován stejnými kroky jako v případě *Salmonella* Typhimurium.

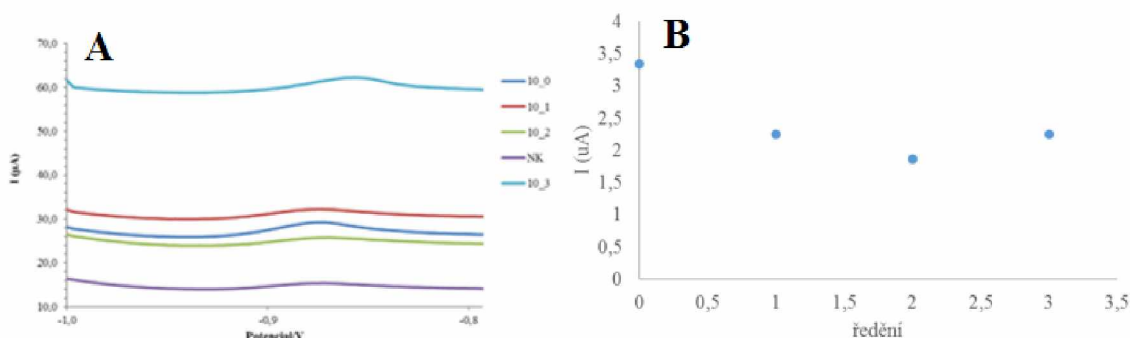
4.9.4 Imunosenzor pro detekci *Campylobacter jejuni* s použitím menšího množství nosiče a konjugátů s SiNPs-CdTe QDs, Ds-CdTe QDs a SiNPs-PbS QDs

Pro další experiment bylo použito 100 μg imunosorbentu. Ředění bakteriální suspenze bylo ponecháno 10^0 - 10^3 CFU/ml. Měření však byla z časových důvodů provedena pouze jednou. Na obrázku 54 můžeme jso uvideny výsledky, kde můžeme pozorovat velký nárůst odezvy při měření 10^3 CFU/ml. Ve srovnání s kontrolním ředěním odpovídaly počty kolonií na misce ředění 10^3 CFU/ml. Nižší ředění však poskytovaly téměř stejné proudové odezvy.



Obrázek 54 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci *Campylobacter jejuni* s menším množstvím imunosorbentu; A) SWASV voltamogram měření celého systému se *Campylobacter jejuni* s konjugátem s SiNPs-PbS QDs; množství použitého imunosorbentu 100 μg , elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků odečítány při potenciálu - 0,5 V B) závislost proudové hodnoty na ředění suspenze bakteriálních buněk

Při dalším experimentu, za použití jiného konjugátu, a to s SiNPs-CdTe QDs je trend mírně klesající (viz. obrázek 55).



Obrázek 55 Výsledky měření imunokomplexu pro detekci *Campylobacter jejuni* s menším množstvím imunosorbentu; A) SWASV voltamogram měření celého systému se *Campylobacter jejuni* s konjugátem s SiNPs-CdTe QDs; množství použitého imunosorbentu 100 μg , elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků odečítány při potenciálu - 0,5 V B) závislost proudové hodnoty na ředění suspenze bakteriálních buněk

Pro tento experiment byly použity i konjugáty s Ds-CdTe QDs, ale v tomto případě nebyly získány charakteristické píky pro Cd(II) vůbec (data neuvedena).

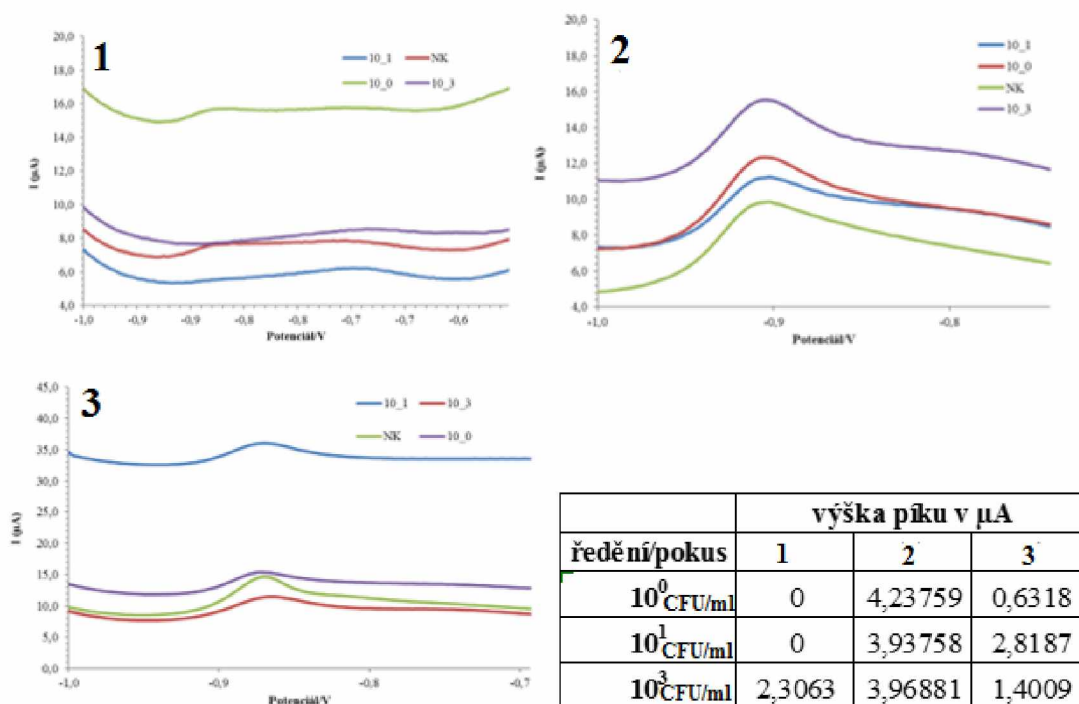
4.9.5 Imunosenzor pro detekci *Campylobacter jejuni* za použití tří různých postupů sestavení imunosenzoru

Pro tento experiment, jehož uspořádání a postup byly stejné jako v případě pokusu u *Salmonella Typhimurium* (viz. tabulka 8, str. 67) bylo použito vždy 100 µg imunosorbentu a ředění 10^0 , 10^1 , 10^3 CFU/ml a konjugátů s SiNPs-CdTe QDs (viz. obrázek 56) a Ds-CdTe QDs (viz. obrázek 57).

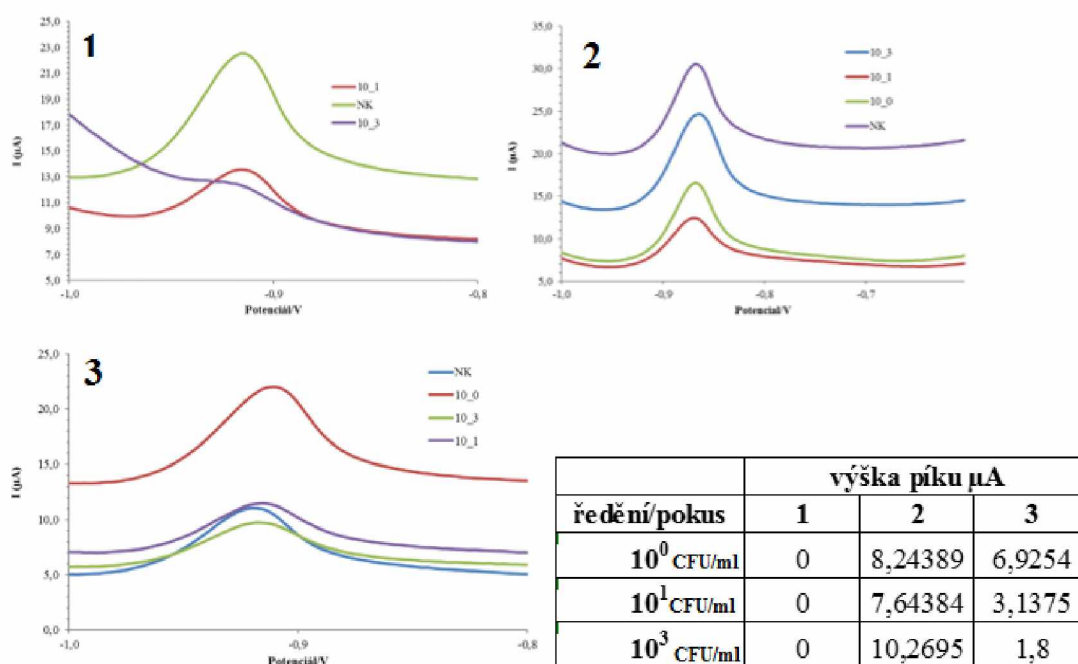
Postup číslo 1 byl proveden tak, že imunosorbent se nejprve inkuboval s bakteriální suspenzí o příslušném ředění a teprve poté byl přidán konjugát a 30 minut inkubován celý komplex. Na základě výsledků tohoto měření což je vidět i na voltogramu A jsme vyhodnotili, že nedošlo k vazbě konjugátu.

Postup číslo 2 byl založen nejprve na inkubaci bakteriální suspenze daného ředění (30 minut) s konjugátem, poté byla reakční směs přidána k imunosorbentu. V tomto případě došlo částečně k vytěsnění konjugátu imunosorbentem, ale zároveň systém poskytl nejvyšší proudové odezvy. Proudové odezvy však nevykazují stoupající trend v závislosti na rostoucím množství bakteriálních buněk ve vzorku.

V pokusu číslo 3 se postupovalo jako při prvních experimentech, což znamená současné smíchání imunosorbentu, bakteriální suspenze a značených protilátek s následnou inkubací.



Obrázek 56 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni*, konjugát SiNPs-CdTe QDs, elektrody Dropsens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků byly odčítány při potenciálu -0,85 V, 1) postup č. 1, 2) postup č.2, 3) postup č. 3, které jsou popsány v tabulce 8

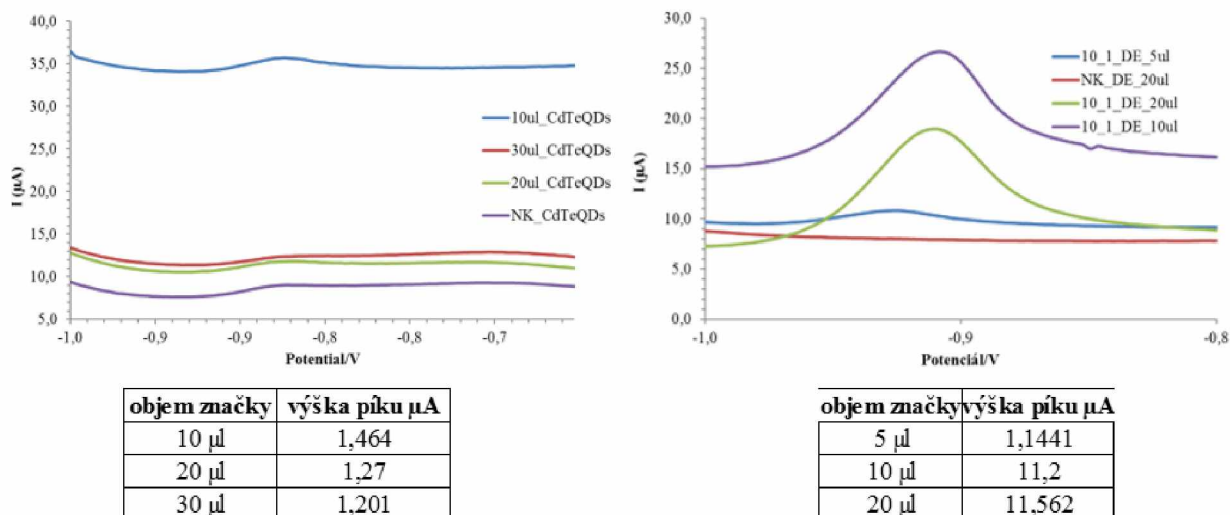


Obrázek 57 Výsledné voltamogramy jednotlivých způsobů vazby bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni*, konjugát Ds-CdTe QDs, elektrody Dropsens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, výšky píků byly odčítány při potenciálu -0,85 V, 1) postup č. 1, 2) postup č.2, 3) postup č. 3, které jsou popsány v tabulce 8

Tyto experimenty ukázaly, že v případě bakterií záleží na uspořádání celého systému a pořadí přidávaných reagensů. Výsledky byly srovnatelné jak v případě SiNPs-CdTe QDs, tak Ds-CdTe QDs.

4.9.5 Imunosenzor pro detekci *Campylobacter jejuni* s využitím různého množství konjugátu

I pro detekci bakterie *Campylobacter jejuni* bylo testováno, zda bylo zvoleno správné množství konjugátu v uspořádání celého komplexu. Proto bylo použito při stejném ředění (10^1 CFU/ml) jiné množství konjugátu. Byly použity konjugáty s SiNPs-CdTe QDs a Ds-CdTe QDs a byly testovány objemy 10,15,20 μ l pro SiNPs-CdTe QDs a 5, 10, 20, 30 μ l Ds-CdTe QDs.



Obrázek 58 Voltamogramy měření imunokomplexu *Campylobacter jejuni* za použití různého množství konjugátů při detekci *Campylobacter jejuni*, elektrody DropSens C-110, tvořen in situ bismutový film (500 ppb), SWASV, 10, 20, 30 μ l pro SiNPs-CdTe QDs, 5,10,20 μ l Ds-CdTe QDs

Tento pokus potvrdil (viz. obrázek 58), že zvolené množství konjugátu v obou případech byl optimální, tedy 10 μ l.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sestavit systém, který by byl využitelný jako rychlá, screeningová metoda pro detekci bakteriálních buněk *Salmonella* Typhimurium a *Campylobacter jejuni* jako potencionálních kontaminantů potravin. Tento systém se zakládal na principu heterogenní sendvičové imunoanalýzy. Práce byla složená z několika dílčích kroků, kterými byly příprava magnetických částic s kovalentně imobilizovanými specifickými protilátkami (imunosorbentu), který v daném systému slouží pro snadný a efektivní záchyt bakteriálních buněk ze vzorku. Pro jeho přípravu byly zvoleny magnetické částice ProMag 0,746 μm nebo 0,87 μm . Na magnetický nosič byly imobilizovány polyklonální protilátky anti-*Salmonella* spp. a anti-*Campylobacter jejuni* od firmy BioRad. Účinnost imobilizace protilátek na magnetický nosič byla ověřována pomocí SDS-PAGE analýzy a pro všechny protilátky byla účinnost vazby karbodiimidovou metodou 80 % a vyšší.

Dalším dílčím krokem byla příprava konjugátů, tedy protilátek značených vhodnou značkou, v našem případě elektroaktivními nanočásticemi (AuNPs, CdTe QDs a PbS QDs). Pro zvýšení citlivosti a snadnou přípravu byly kombinovány se silika nanočásticemi nebo polymerními dendrony. Pro značení protilátek byly v první řadě vybrány silika nanočástice s kvantovými tečkami a zlatými nanočásticemi. Při optimalizacích postupů byly vyzkoušeny pro značení protilátek i silika nanočástice s olovnatými tečkami nebo dendrony s kvantovými tečkami. Pro značení protilátek byla použita karbodiimidová metoda. Pro elektrochemickou detekci bylo využito square wave anodické/katodické voltametrie. Měřeno bylo na jednorázových uhlíkových tištěných elektrodách DropSens C-110 (Španělsko)(C/C/Ag-AgCl). Byla měřena proudová odezva iontů kovů uvolněných v kyselém prostředí z použité elektroaktivní značky, použité pro značení protilátek.

Pomocí kultivační metody bylo prokázáno, že připravené imunosorbenty vychytávají bakteriální buňky. Dále bylo připraveno a otestováno několik typů konjugátů, které až na konjugáty s SiNPs-AuNPs, poskytovaly dostatečné proudové odezvy při elektrochemické detekci, jedná se o konjugáty s SiNPs-CdTe QDs, SiNPs-PbS QDs a Ds-CdTeQDs. V rámci práce se však neprokázalo, že by byl systém při sestavení celého komplexu reprodukovatelný, dále nebyl pozorován rostoucí trend s rostoucí koncentrací buněk ve vzorku, který by umožňoval kvantifikaci. Výsledky ukázaly, že v případě bakteriálních buněk je výsledný signál značně závislý na pořadí přidávaných reagentů. Tato práce

přinesla řadu poznatků, které budou využity v další práci v této oblasti. Pro zlepšení bude třeba hledat nejvhodnější uspořádání celého systému. Další možností je modifikace přípravy imunosorbentů či konjugátů.

6. ZDROJE

- [1] JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J., Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách. 1996. Praha, Ústav zemědělských a potravinářských informací, 115 s. ISBN 80-85120-49-6.
- [2] ČSN EN ISO 6579-1. Mikrobiologie potravinového řetězce_ Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu Salmonella-část 1: Průkaz bakterií rodu Salmonella, 2017, 68 s. 560088
- [3] ČSN EN ISO 10272-1. Mikrobiologie potravinového řetězce- Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií rodu Campylobacter_ část 2: Technika počítání kolonií. Březen 2018, 56 0126
- [4] ČSN ISO 4831. Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika nejvýše pravděpodobného počtu, 2010, 560086
- [5] ČSN EN ISO 6888-1. Mikrobiologie potravin a krmiv-Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (Staphylococcus aureus a další druhy) - část 1: Technika s použitím agarové půdy podle B-P. Prosinec 1999, 56 0089
- [6] ČSN EN ISO 11290-1. Mikrobiologie potravinového řetězce_ horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Listeria monocytogenes a Listeria spp.- část 1: Metoda průkazu, 2018, 56 0093
- [7] ČSN EN ISO 7932, Mikrobiologie potravin-Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního Bacillus cereus-Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, 2005, 560092
- [8] YANG, L. BASHIR, R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. Biotechnology Advances. 2008, **26**(2), 135–150. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.10.003.
- [9] WANG, Y., YE, Z., YING, Y. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. Sensors. 2012, **12**(3), 3449–3471. doi:10.3390/s120303449.
- [10] ARORA, P., SINDHU, A. DILBAGHI, N., CHAUDHURY, A. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. Biosensors and Bioelectronics. 2011, **28**(1), 1–12. doi:10.1016/j.bios.2011.06.002.
- [11] VINAYAKA, A., NGO, T. A., KANT, K., ENGELSMANN, P., DAVE, V. P., SHAHBAZI, M., WOLFF, A., BANG, D. Rapid detection of Salmonella enterica

- in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, **129**, 224–230. doi:10.1016/j.bios.2018.09.078.
- [12] OLSEN, J.E, S AABO, W HILL, S NOTERMANS, K WERNARS, P.E GRANUM, T POPOVIC, H.N RASMUSSEN, Ø OLSVIK. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 1995, **28(1)**, 1–78. doi:10.1016/0168-1605(94)00159-4.
- [13] PANG, B., ZHAO, Ch., L. LI, SONG, X., XU, K., WANG, J., LIU, Y., FU, K., BAO, H., SONG, D., MENG, X., QU, X., ZHANG, Z., LI, J. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection. *Analytical Biochemistry*. 2018, **542**, 58–62. doi:10.1016/j.ab.2017.11.010.
- [14] LEQUIN, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005, **51(12)**, 2415–2418. doi:10.1373/clinchem.2005.051532.
- [15] AYDIN, S A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015, **72**, 4–15. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
- [16] LAW, J., AB MUTALIB, N., CHAN, K., LEE, L. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **5** [vid. 2018-11-22]. doi:10.3389/fmicb.2014.00770.
- [17] YU, M., JEONG, H., PARK, S., KIM, Y., KWON, H., KIM, E., SI, L., YU, K.M., ROBLES, N.J, HAN, H. J., CHOI, K. Evaluation of two different enzyme-linked immunosorbent assay for severe fever with thrombocytopenia syndrome virus diagnosis. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2018, **7(1)**, 82. doi:10.7774/cevr.2018.7.1.82.
- [18] CORADINI, M. G. L., MAIA, D. S. V., IGLESIAS, M. A., HAUBERT, L., LOPES, G. V., DA SILVA, D. A. L., NERO L. A., DA SILVA, W. P. Occurrence and characterization of *Listeria monocytogenes* from beef jerky processing line. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, **56(1)**, 436–442. doi:10.1007/s13197-018-3505-3.
- [19] RODRIGUES, M. J., MARTINS, K., GARCIA, D., S. M. F. FERREIRA, S. M. F., GONÇALVES, S. C., MENDES, S., M. F. L. LEMOS, M. F. L. Using the

- mini-VIDAS® Easy Salmonella protocol to assess contamination in transitional and coastal waters. *Archives of Microbiology*. 2016, **198**(5), 483–487. doi:10.1007/s00203-016-1211-y.
- [20] WANG, Hua, Vikas S. GILL, Chorng-Ming CHENG, Narjol GONZALEZ-ESCALONA, Kari A. IRVIN, Jie ZHENG, Rebecca L. BELL, Andrew P. JACOBSON a Thomas S. HAMMACK. Evaluation and comparison of rapid methods for the detection of Salmonella in naturally contaminated pine nuts using different pre enrichment media. *Food Microbiology*. 2015, **46**, doi:10.1016/j.fm.2014.06.028
- [21] VALIENTE MORO, C., S. DESLOIRE, C. VERNZOY-ROZAND, C. CHAUVE a L. ZENNER. Comparison of the VIDAS ♦ system, FTA ♦ filter-based PCR and culture on SM ID for detecting Salmonella in *Dermanyssus gallinae*. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, **44**(4), 431–436. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02119.x.
- [22] ISLAM, M. Aminul, et al. Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal faeces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system. *International journal of food microbiology*, 2006, 109.1-2: 151-156.
- [23] PCR, qPCR & Amplification Technologies | NEB [online]. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://international.neb.com/products/pcr-qpcr-and-amplification-technologies/pcr-qpcr-and-amplification-technologies>
- [24] FIALOVÁ, E., ZDEŇKOVÁ, K., DEMNEROVÁ, K. Digitální PCR a její porovnání s PCR I. a II. generace. *Bioprospect: bulletin biotechnologických společností v České republice a Slovenské republice*. 2017, **27**(4), 91–94.
- [25] MALORNY, B., TASSIOS, P. T., RÅDSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, **83**(1), 39–48. doi:10.1016/S0168-1605(02)00322-7.
- [26] ADASZEK, Ł., DZIĘGIEL, B., MAZUREK, L., WINIARCZYK, S. Zastosowanie techniki PCR w badaniach bakteriologicznych. *Zycie Weterynaryjne*, 2018, 4.
- [27] MORTARI, A., LORENZELLI, L. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, **60**, 8–21. doi:10.1016/j.bios.2014.03.063.

- [28] VELUSAMY, V., ARSHAK, K., KOROSTYNSKA, O., OLIWA, K., ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*. 2010, **28**(2), 232–254. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.
- [29] LI, S., IPSITA, HE LI. *Biosensor nanomaterials*. 2011. Wiley-VCH, ISBN 978-3-527-32841-3.
- [30] SCOTT, A. O. *Biosensor for food analysis*. 1998. Woodhead Publishing, ISBN 0-85404-750-6.
- [31] LEONARD, P., HEARTY, S., BRENNAN, J., DUNNE, L., QUINN, J., CHAKRABORTY T., O’KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, **32**(1), 3–13. doi:10.1016/S0141-0229(02)00232-6.
- [32] LIÉBANA, S., BRANDÃO, D., ALEGRET, S., PIVIDORI, M. Electrochemical immunosensors, genosensors and phagosensors for Salmonella detection. *Anal. Methods*. 2014, **6**(22), 8858–8873. doi:10.1039/C4AY01373E, 1759-9679.
- [33] MISHRA, G., BARFIDOKHT, A., TEHRANI, F., MISHRA, R. Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. *Foods*. 2018, **7**(9), 141. doi:10.3390/foods7090141.
- [34] PÉREZ-LÓPEZ, B., MERKOÇI, A. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2011, **22**(11), doi:10.1016/j.tifs.2011.04.001.
- [35] YU, J., SU, J., ZHANG, J., WEI, X., GUO, A., CdTe/CdS quantum dot-labeled fluorescent immunochromatography test strips for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. *RSC Advances*. 2017, **7**(29), 17819–17823. doi:10.1039/C7RA00821J.
- [36] JAMIESON, T., BAKHSHI, R., PETROVA, D., POCOCK, R., IMANI, M., SEIFALIAN, A. M. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*. 2007, **28**(31), doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.014.
- [37] PEČOVÁ, M., et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chem. Listy*, 2011, 105.7: 524-530.
- [38] ZHONG, M., YANG, L., YANG, H., CHENG, Ch., DENG, W., TAN, Y., XIE, Q., YAO, S. An electrochemical immunobiosensor for ultrasensitive detection of Escherichia coli O157:H7 using CdS quantum dots-encapsulated metal-organic

- frameworks as signal-amplifying tags. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, **126**, 493–500. doi:10.1016/j.bios.2018.11.001.
- [39] MOCAN, T., MATEA, C., POP, T., MOSTEANU, O., BUZOIANU, A., PUIA, C., IANCU, C., MOCAN, L. Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017, **15**(1). doi:10.1186/s12951-017-0260-y.
- [40] HASSAN, A., DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A., MERKOÇI, A. Highly sensitive and rapid determination of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and water using electrocatalytic gold nanoparticle tags. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, **67**, doi:10.1016/j.bios.2014.09.019.
- [41] SILVA, N. F. D., MAGALHÃES, J. M. C. S., BARROSO, M. F., OLIVA-TELES, T., FREIRE, C., DELERUE-MATOS, C. In situ formation of gold nanoparticles in polymer inclusion membrane: Application as platform in a label-free potentiometric immunosensor for *Salmonella typhimurium* detection. *Talanta*. 2018, **194**, 134–142. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.024.
- [42] OH, S. Y., HEO, N. S., SHUKLA, S., CHO, H., VILIAN, A. T. E., KIM, J., LEE, S. Y., HAN, K., YOO, S. M., HUH, Y. S. Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of *Salmonella typhimurium* in pork meat. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 10130. doi:10.1038/s41598-017-10188-2
- [43] *International Journal of Advance Research and Innovation*. 2016, **4**(1), 7.
- [44] DOYLE, M. P., BUCHANAN, R. L. *Food microbiology*. 4th vyd. Herndon: ASM Press, 2012. ISBN 978-1-55581-626-1.
- [45] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key publishing, 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [46] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1996. 1. ISBN ISBN 80-967064-1-1.
- [47] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia potravín: princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých*

zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd., Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.

- [48] Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry [online]. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://vetweb.cz/identifikace-bakterii-mlacneho-kvaseni-v-mase-balenem-v-podminkach-ochranne-atmosfery/>
- [49] AKRAMI-MOHAJERI, F., DERAKHSHAN, Z., FERRANTE, M., HAMIDIYAN, N., SOLEYMANI, M., CONTI, G., TAFTI, R.. The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). *Food and Chemical Toxicology*. 2018, **114**, 141–144. oi:10.1016/j.fct.2018.02.006.
- [50] GELBÍČOVÁ, T., KARPÍŠKOVÁ, R., DEMNEROVÁ, K. Mléko a prostředí mlékárenské výroby: zdroje a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. B.m.: Mlékárenské listy. 14. červenec 2011. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/128_s._xii-xv.pdf
- [51] Bezpečnost potravin A-Z. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76713.aspx>
- [52] HAGENS, S., J. LOESSNER, M. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, **76**(3), 513–519. doi:10.1007/s00253-007-1031-8.
- [53] OLIVER, S.P., JAYARAO, B.M., ALMEIDA, R.A. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2005, **2**(2), 115–129., 1556-7125. doi:10.1089/fpd.2005.2.115
- [54] *Escherichia coli*. Dostupné z: <https://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/top-10-germs-smartphone2.htm>
- [55] INSPEKCE, all: Státní zemědělská a potravinářská. Mikrobiální původci alimentárních onemocnění. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/mikrobialni-puvodci-alimentarnich-onemocneni.aspx?q=Y2hudW09Ng%3D%3D>
- [56] *Staphylococcus aureus*. Dostupné z: <https://www.ecolab.com/expertise-and-innovation/resources/microbial-risks/staph-aureus-foodborne>
- [57] GRANUM, P. E., LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, **157**(2), 223–228. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x

- [58] Bacillus cereus - an overview | ScienceDirect Topics. [vid. 2018-11-22].
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/bacillus-cereus>
- [59] Salmonellosis | pathology | Britannica.com. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/salmonellosis>
- [60] Salmonella data now at your fingertips. [vid. 2018-11-22] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/media/releases/2014/p0326-salmonella-data.html>
- [61] JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. Patogens and toxins in foods: challenges and interventions. Washington DC: ASM Press, 2009. ISBN 978-1-55581-459-5.
- [62] Rizika konzumace syrového kravského mléka. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://vetweb.cz/rizika-konzumace-syroveho-kravskeho-mleka/>
- [63] BHARDWAJ, J., DEVARAKONDA, S., KUMAR, S., JANG, J. Development of a paper-based electrochemical immunosensor using an antibody-single walled carbon nanotubes bio-conjugate modified electrode for label-free detection of foodborne pathogens. Sensors and Actuators B: Chemical 2017, **253**, 115–123. doi:10.1016/j.snb.2017.06.108.
- [64] PEREIRA, S. A., ALVES, A., FERREIRA, V., TEIXEIRA, P. C. M. The Impact of Environmental Stresses in the Virulence Traits of Listeria monocytogenes Relevant to Food Safety. In: Monde Alfred NYILA, ed. Listeria Monocytogenes. B.m.: InTech, 2018 [vid. 2018-11-22]. doi:10.5772/intechopen.76287
- [65] REDA, W. W., ABDEL-MOEIN, K., HEGAZI, A., MOHAMED, Y., ABDEL-RAZIK, K. Listeria monocytogenes: An emerging food-borne pathogen and its public health implications. The Journal of Infection in Developing Countries. 2016, **10**(02), 149. doi:10.3855/jidc.6616, 2036-6590.
- [66] Listeria monocytogenes. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <httpswww.safefood.euFood-safetyFood-PoisoningListeria-monocytogenes.aspx>
- [67] MODI, S., BRAHMBHATT, M. N., CHATUR, Y. A., NAYAK, J. B., Prevalence of Campylobacter species in milk and milk products, their virulence gene profile and anti-bio gram. Veterinary World. 2015, **8**(1), 1–8. doi:10.14202/vetworld.2015.1-8.
- [68] Kamylobakteri6za. Státní veterinární správa. 30. listopad 2017 [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zivocisne-produkty/kamylobakterioza/>

- [69] *Campylobacter jejuni*. Dostupné z: https://www.hygiene-in-practice.com/pathogen/campylobacter-jejuni-coli_en/
- [70] WHO | *Escherichia coli* infections. WHO. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ecoli/en/
- [71] Facts about *Escherichia coli*. European Centre for Disease Prevention and Control. [vid. 2018-11-22]. Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/facts>
- [72] *Bacillus cereus* obrázek. [vid. 2018-11-22] Dostupné z: <http://blog.microbiologynetwork.com/343/bacara-medium-for-bacillus-cereus-group-recovery-and-detection/>
- [73] HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate Techniques*. B.m.: Academic Press, 2013. 3 rd Edition. ISBN 978-0-12-382239-0.
- [74] SRBOVA, J., KRULISOVA, P., HOLUBOVA, L., PEREIRO, I., BENDALI, A., HAMIOT, A., PODZEMNA, V., MACAK, M., DUPUY, B., DESCROIX, S., J VIOVY, J., BILKOVA, Z. Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed. *ELECTROPHORESIS*. 2018, **39**(3), 526–533. doi:10.1002/elps.201700257