

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vývoj elektrochemického imunosenzoru pro rychlý průkaz *Campylobacter jejuni* v potravinách

Diplomová práce

2020

Bc. Andrea Švecová

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Švecová**
Osobní číslo: **C18443**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Vývoj elektrochemického imunosenzoru pro rychlý průkaz *Campylobacter jejuni* v potravinách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Z dostupné odborné literatury zpracujte literární rešerši kombinující informace o bakterii *Campylobacter jejuni* a možnostech jejího průkazu pomocí elektrochemických biosenzorů, se zaměřením na imunosenzory využívající dvou typů protilátek, jedné pro záchyt bakterií ze vzorku, a druhé, značené kvantovými tečkami nebo zlatými nanočásticemi.

Experimentální část:

1. Připravte magnetické částice s imobilizovanými protilátkami pro účinný záchyt bakteriálních buněk ze vzorku. Optimalizujte podmínky záchytu.
2. Ověřte účinnost záchytu kultivační metodou.
3. Připravte protilátky značené kvantovými tečkami nebo zlatými nanočásticemi, ověřte účinnosti značení pomocí SDS-PAGE, elektrochemicky pomocí square-wave anodické/katodické rozpouštěcí voltametrie. Sestavte imunosenzor s elektrochemickou detekcí bakterií zachycených ze vzorku. V případě funkčnosti systému ho otestujte se vzorky mléka uměle kontaminovanými bakterií *Campylobacter jejuni*.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Andrea Švecová

Poděkování

Děkuji všem, kteří mi při tvorbě a zpracování této diplomové práce byli nápomocni, zejména mé vedoucí diplomové práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. a konzultantce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení práce, za pozitivní přístup a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Milanu Vlčkovi, CSc. a Ing. Tomášovi Mikyskovi, Ph. D. za pomoc při SEM analýze. Velké poděkování patří i mé rodině a přítelovi, kteří mi svojí podporou pomohli ke zdárnému dokončení diplomové práce.

V Pardubicích dne

ANOTACE

Práce je věnována vývoji elektrochemického imunosenzoru pro průkaz bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni*. Systém využívá primární protilátky, imobilizované na magnetických částicích, pro izolaci bakteriálních buněk, a sekundární protilátky značené kvantovými tečkami (QDs), které umožňují elektrochemickou detekci. Pro stanovení byly použity jednorázové tištěné tříelektrodové senzory umožňující analýzu malých objemů. Detekční metodou byla square wave anodická, resp. katodická rozpouštěcí voltametrie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Campylobacter jejuni, magnetické částice, kvantové tečky, zlaté nanočástice, dendrony, elektrochemický imunosenzor

TITLE

Development of electrochemical immunosensor for detection of *Campylobacter jejuni* in food

ANNOTATION

The work is devoted to the development of an electrochemical immunosensor for the detection of *Campylobacter jejuni*. The system uses primary antibodies, immobilized on magnetic particles, to isolate bacterial cells, and secondary antibodies labeled with quantum dots (QDs), which allow electrochemical detection. Disposable screen-printed three-electrode sensors enabling small volume analysis were used for the determination. The detection method was square wave anodic/cathodic dissolution voltammetry.

KEYWORDS

Campylobacter jejuni, magnetic particles, quantum dots, gold nanoparticles, dendrons, electrochemical immunosensor

Obsah

ÚVOD.....	15
1 <i>Campylobacter jejuni</i>	16
1.1 Taxonomie	16
1.2 Morfologie	17
1.3 Biochemické vlastnosti	18
1.3.1 Růstové podmínky <i>Campylobacter jejuni</i>	18
1.3.2 Vliv atmosféry na růst <i>Campylobacter jejuni</i>	18
1.3.3 Vliv teploty na růst <i>Campylobacter jejuni</i>	18
1.3.4 Vliv pH a organických/anorganických kyselin na růst <i>Campylobacter jejuni</i> ...	19
1.3.5 Vliv vodní aktivity, dezinfekčních prostředků a záření na růst <i>Campylobacter jejuni</i>	19
1.4 Výskyt v potravinách	19
1.4.1 Drůbeží maso, játra a vepřové maso	20
1.4.2 Mléko	20
1.5 Onemocnění kampylobakterií	21
1.5.1 Patogenita a patogeneze	22
1.5.2 Prognóza	23
1.5.3 Léčba	23
1.5.4 Komplikace	23
1.6 Průkaz bakterií rodu <i>Campylobacter</i>	24
1.6.1 Metody identifikace a charakterizace	25
1.7 Polymerázová řetězová reakce	25
1.8 Imunochemické metody	26
1.9 Nové způsoby stanovení	27
2 Biosenzory	28

2.1	Rozdělení podle fyzikálně-chemického převodníku.....	29
2.1.1	Optické biosenzory	29
2.1.2	Kalorimetrické biosenzory	29
2.1.3	Piezoelektrické biosenzory	30
2.1.4	Elektrochemické biosenzory	30
2.1.4.1	Potenciometrické biosenzory	30
2.1.4.2	Vodivostní biosenzory	31
2.1.4.3	Amperometrické a voltametrické biosenzory	31
2.2	Rozdělení podle biologické složky	33
2.2.1	Biokatalytické biosenzory	33
2.2.2	DNA biosenzory	33
2.2.3	Biomimetické biosenzory	33
2.2.4	Imunosenzory.....	34
2.3	Biosenzory s magnetickými částicemi	34
2.4	Značení protilátek pomocí nanočástic.....	37
2.4.1	Magnetické částice značené zlatými nanočásticemi	37
2.4.2	Značení pomocí kvantových teček	38
2.5	Tištěné senzory	39
2.5.1	Modifikace elektrod bizmutovým filmem	41
2.6	Příklady imunosenzorů pro stanovení bakterií.....	43
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
3.1	Přístroje a pomůcky	46
3.2	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	48
3.2.1	Barvení gelů roztokem amoniakálního stříbra.....	50
3.3	Dot-Blot analýza	51
3.4	Imobilizace protilátek na magnetické částice neorientovanou vazbou.....	53
3.5	Imobilizace protilátek na magnetické částice orientovanou vazbou.....	54

3.6	Příprava Columbia agaru a fyziologického roztoku	55
3.7	Záchyt a vyočkování <i>Campylobacter jejuni</i>	56
3.8	Příprava vzorků s bakteriemi na SEM	58
3.9	Značení protilátek kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi	59
3.10	Sestavení imunokomplexu pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	60
3.11	Elektrochemická detekce	61
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	63
4.1	Výběr protilátek pro vývoj systému pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	64
4.2	Příprava imunosorbentu pro záchyt <i>Campylobacter jejuni</i>	67
4.3	Ověření účinnosti záchytu buněk <i>Campylobacter jejuni</i> s využitím připraveného imunosorbentu.....	71
4.4	SEM analýza	76
4.5	Příprava značených protilátek a ověření účinnosti značení	80
4.6	Sestavení imunosenzoru pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	83
	ZÁVĚR	89
	ZDROJE.....	90

Seznam obrázků

Obrázek 1 Zařazení rodu <i>Campylobacter</i>	16
Obrázek 2 Snímek z elektronového mikroskopu - <i>Campylobacter jejuni</i>	17
Obrázek 3 Schéma cest, kterými může dojít k infekci bakteriemi rodu <i>Campylobacter</i>	22
Obrázek 4 Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu <i>Campylobacter</i> spp. – Část 1: Metoda průkazu , ČSN EN ISO 10272-1.....	24
Obrázek 5 Vzhled kolonii bakterie <i>Campylobacter jejuni</i> na Columbia agaru.....	25
Obrázek 6 Rozdělení biosenzorů podle biorekogniční vrstvy a převodníků	28
Obrázek 7 Křivky vkládaných potenciálů na elektrodu v čase.....	32
Obrázek 8 Magnetické částice.....	35
Obrázek 9 Schéma spojení magnetických částic a tištěných senzorů.....	36
Obrázek 10 Princip biosenzoru pro detekci bakterií pomocí protilátek značených zlatými nanočásticemi.....	38
Obrázek 11 Kvantové tečky.....	39
Obrázek 12 Příklad komerčně dostupného tištěného senzoru od firmy Methrohm.....	40
Obrázek 13 Schéma rozpouštěcí voltametrie těžkých kovů s elektrodou s bizmutovým filmem připraveným <i>in situ</i>	42
Obrázek 14 Schéma pipetování vzorků testovaných protilátek a kontrol na membránu.....	52
Obrázek 15 Příprava terčů na SEM.....	58
Obrázek 16 Schéma jednotlivých kroků sestavení imunosenzoru.....	63
Obrázek 17 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření kvality protilátek.....	65
Obrázek 18 Dot-Blot analýza pro ověření afinity testovaných protilátek k danému antigenu za využití <i>Campylobacter jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>) a <i>Campylobacter coli</i> (<i>C. coli</i>).....	66
Obrázek 19 A - Karbodiimidová metoda, B – Jodistanová metoda.....	68
Obrázek 20 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po neorientované imobilizaci protilátek na magnetické částice HEMA.....	70
Obrázek 21 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po orientované imobilizaci protilátek na magnetické částice HEMA.....	70
Obrázek 22 Fotografie ze SEM magnetických částic ProMag (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	76
Obrázek 23 Fotografie ze SEM magnetických částic Dynabeads (orientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	77

Obrázek 24 Fotografie ze SEM magnetických částic Dynabeads (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	77
Obrázek 25 Fotografie ze SEM magnetických částic HEMA (orientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	78
Obrázek 26 Fotografie ze SEM magnetických částic HEMA (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	78
Obrázek 27 Fotografie ze SEM magnetické makroporézní perlové celulózy (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	79
Obrázek 28 Fotografie ze SEM magnetické makroporézní perlové celulózy (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk.....	79
Obrázek 29 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po značení protilátek kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi.....	81
Obrázek 30 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po značení protilátek kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi.....	82
Obrázek 31 SWASV voltamogram měření imunokomplexu pro detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	84
Obrázek 32 SWASV voltamogram měření imunokomplexu po detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	85
Obrázek 33 Závislost proudové odezvy k danému koncentračnímu rozmezí.....	85
Obrázek 34 SWASV voltamogram měření imunokomplexu po detekci <i>Campylobacter jejuni</i>	87
Obrázek 35 Kalibrační závislost odečteného proudu na daném koncentračním rozmezí.....	88

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled dostupných komerčně vyráběných tištěných senzorů s možnými modifikacemi povrchu pracovní elektrody.....	41
Tabulka 2 Množství roztoků pro přípravu gelů pro SDS-PAGE elektroforézu.....	49
Tabulka 3 Frakce pro vyočkování <i>Campylobacter jejuni</i>	57
Tabulka 4 Frakce pro vyočkování <i>Campylobacter jejuni</i>	57
Tabulka 5 Frakce pro vyočkování <i>Campylobacter jejuni</i>	57
Tabulka 6 Podmínky elektrochemické detekce při použití elektrod C110-Metrohm.....	62
Tabulka 7 Typy protilátek.....	64
Tabulka 8 Přehled použitých magnetických částic pro přípravu magnetických nosičů anti- <i>Campylobacter jejuni</i>	69
Tabulka 9 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i> pomocí magnetických částic ProMag s neorientovaně vázanými protilátkami.....	71
Tabulka 10 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i> pomocí magnetických částic ProMag s neorientovaně vázanými protilátkami v BHI bujónu.....	72
Tabulka 11 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i> pomocí magnetických částic Dynabeads s orientovaně vázanými protilátkami v BHI bujónu.....	73
Tabulka 12 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk <i>Campylobacter jejuni</i> pomocí 9 různých imunosorbentů.....	74
Tabulka 13 Procenta účinnosti záchytu srovnané od nejhorších po nejlepší.....	75
Tabulka 14 Kvantové tečky a silika nanočástice.....	80
Tabulka 15 Typy kvantových teček a jejich proudové odezvy.....	83
Tabulka 16 Odečtené proudy při daném potenciálu.....	86
Tabulka 17 Odečtené proudy při daném potenciálu.....	88

Seznam zkratek a značek

Ab	Protilátka (Antibody)
AuNPs	Zlaté nanočástice (Gold nanoparticles)
CFU	Kolonie tvořící jednotky (Colony forming units)
CNT	Uhlíkové nanotrubičky (Carbon nanotubes)
CV	Cyklická voltametrie (Cyclic voltammetry)
ČSN	Česká technická norma (Czech technical norm)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie (Differential pulse voltammetry)
Ds	Dendrony (Dendrons)
ELFA	Enzymová fluorescenční imunoanalýza (Enzyme Fluorescence Immuno Assay)
ELISA	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EN	Evropská norma (European norm)
HRP	Křenuv peroxidáza (Horseradish peroxidase)
IMS	Imunomagnetická separace (Immunomagnetic separation)
ISO	Mezinárodní organizace pro standardizaci (International organization for standardization)
LSV	Lineární voltametrie (Linear voltammetry)
mCCDA	Modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (Modified deoxycholate agar with activated carbon and cefoperazon)
MNP	Magnetické nanočástice (Magnetic nanoparticles)
NC	Nanokanáčky (Nanochannels)

NF-LAPS	Světlem adresovatelný potenciometrický biosenzor s nanovláknny (NanoFiber-Light Addressable Potentiometric sensor)
NRs	Nanorody (Nanorods)
NWs	Nanodrátky (Nanowires)
PCR	Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase chain reaction)
QDs	Kvantové tečky (Quantum dots)
rRNA	Ribosomální RNA (Ribosomal RNA)
SEM	Skenovací elektronový mikroskop (Scanning electron microscopy)
SPEG	Tištěná grafitová elektroda (Screen-printed graphite electrode)
SPR	Metoda s povrchovou plazmovou rezonancí (Surface Plasmon Resonance)
SWASV	Square wave anodická rozpouštěcí voltametrie (Square wave anodic stripping voltammetry)
VIDAS [®]	Automatizovaný imunoanalytický systém (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)

ÚVOD

Cílem diplomové práce bylo sestavení imunosenzoru pro detekci *Campylobacter jejuni* v potravinách. Pro rychlé možnosti stanovení této bakterie, by mohl sloužit elektrochemický imunosenzor. Takové imunosenzory jsou založené na principu izolace bakteriálních buněk ze vzorku s následnou elektrochemickou detekcí. Biosenzory se v současné době využívají v potravinářské analýze, klinické analýze nebo v ochraně životního prostředí. V potravinářství se využívají pro stanovení kontaminace nebo kvality potravin. V klinické oblasti například pro stanovení složek krve a při ochraně životního prostředí pro stanovení množství znečištění.

Teoretická část diplomové práce se zabývá problematikou *Campylobacter jejuni*. Jsou zde popsány biochemické vlastnosti, onemocnění způsobující patogen a podmínky průkazu. Pro udržování zdravotně nezávadných potravin je nutné včas odhalit a eliminovat kontaminace patogeny. K nejrizikovějším potravinám zejména patří syrové a nedostatečně uvažené maso nebo syrové, nepasterizované mléko. Dále do této kategorie náleží chlazené nebo částečně mražené mořské plody, syrové ryby, špatně omytá zelenina a ovoce, potraviny ze syrových nebo nedostatečně tepelně opracovaných vajec. Dále se teoretická část zabývá problematikou biosenzorů. Biosenzory jsou zde rozděleny a také jsou zde uvedeny konkrétní příklady detekce patogenů.

Praktická část diplomové práce se zabývá konstrukcí imunosenzoru pro detekci *Campylobacter jejuni*. Pro sestavení imunosenzoru byly použity různé komerčně dostupné druhy magnetických částic a různé značené protilátky. Na magnetické částice byly navázány protilátky proti *Campylobacter jejuni* a použity pro záchyt bakteriálních buněk ze vzorku. Pro detekci byly využity dva druhy značených protilátek. Jednalo se o kvantové tečky (CdTe a PbS) v kombinaci se silika nanočásticemi.

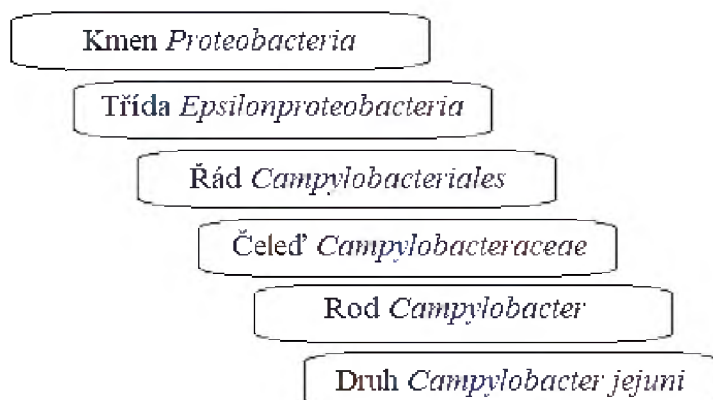
1 *Campylobacter jejuni*

Název *Campylobacter* je odvozen z řeckého slova „kampylos“ (křivý, ohnutý, zakřivený) a slova „baktron“ (tyč, hůl). V roce 1909 byl poprvé izolován a označen jako *Vibrio fetus*, kdy způsoboval potraty u ovcí a skotu. Původně byl popsán jako zvířecí patogen a zařazen do rodu *Vibrio*, jelikož byl původce zánětů střev a dysenterie u skotu a telat. V roce 1947 se prokázala patogenita těchto nových vibrií. *Vibrio fetus* byl vyizolován z krve gravidních žen, které byly postižené hořčnatým onemocněním a u kterých došlo ke spontánnímu potratu. Pacientky byly infikované z mléka krav, ze kterého byl mikroorganismus izolován. O deset let později se v krvi pacienta našel mikroorganismus velice podobný druhu *Vibrio fetus*, ale lišil se biochemickými a antigenními vlastnostmi. Tento nový druh byl pojmenován „related vibrio“ [1,2].

Mikroorganismus byl v 70. letech 20. století zařazen do nového rodu *Campylobacter* z důvodu jeho častého nálezů u dětí trpících průjemovým onemocněním a jeho náročným růstovým podmínkám, které ho odlišovaly od vibrií [1].

1.1 Taxonomie

Véron a Chatelain vypacovali v roce 1973 komplexní taxonomii rodu *Campylobacter* a definovali 4 druhy (*Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter sputorum*). Rod *Campylobacter* se postupně rozšiřoval o nové druhy, a proto se v roce 1991 vytvořila nová čeleď *Campylobacteraceae* (Obrázek 1) [1, 2, 3].



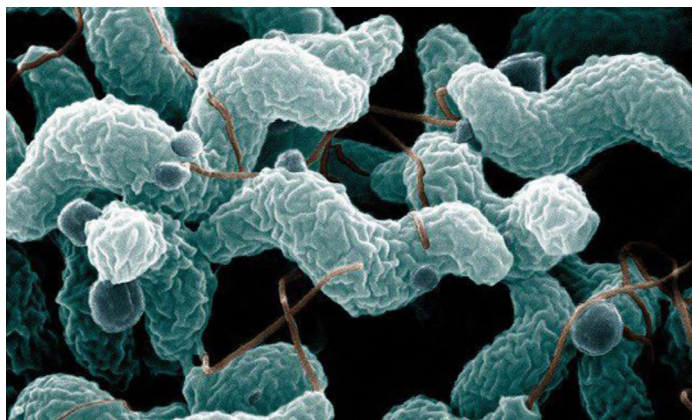
Obrázek 1 Zařazení rodu *Campylobacter*, převzato a upraveno z: [6]

Rod *Campylobacter* zahrnujeme tyto druhy *Campylobacter canadensis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter consicus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter insulaenigrae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter muckalis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter sputorum* a *Campylobacter upsaliensis* [1].

1.2 Morfologie

Campylobacter jejuni je štíhlá, spirální, nesporotvorná gramnegativní tyčinka. Dosahuje průměrně velikosti 0,2 - 0,8 μm a délky 0,5 – 5 μm s polárním bičíkem. Bičík se nachází na jednom či obou koncích. Díky přítomnosti bičíku má bakterie charakteristický tvar písmene S (Obrázek 2) a vyznačuje se charakteristickým vývrtkovitým pohybem. V zástinu je viditelný charakteristický pohyb „komáří hejno“. Pokud se bakterie dostanou do nepříznivých podmínek, mohou vytvářet kokovité formy. Nacházejí se samostatně nebo jako dlouhé spirálovité formy. Netvoří spory. Bakterie ve stavu koků nemohou vytvářet kolonie na kultivačních půdách. Bičíky jsou u *Campylobacter jejuni* považovány za faktor virulence, protože bičíky obsahují flagelin. Díky svému tvaru buňky a pohybu je pro ně snadný průnik hlenem ve střevě hostitele [2, 14, 16].

Podle morfologie dělíme kolonie do 2 typů. Prvním typem jsou kolonie rovné, mukoidní, ploché s mokrým vzhledem. Vytváří shluky nebo jsou ostře ohraničené a vypouklé. Po 18 – 24 hodinové inkubaci jsou kolonie našedlé až průsvitné. Po prodloužené inkubaci 24 – 48 hodin jsou typicky šedé až s nažloutlým nádechem a pravidelnými okraji [1, 3].



Obrázek 2 Snímek z elektronového mikroskopu - *Campylobacter jejuni*, převzato a upraveno z: [4]

1.3 Biochemické vlastnosti

Jedná se o mikroaerofilní, nesporulující, pohyblivé bakterie. energii získávají z metabolismu aminokyselin a dikarboxylových kyselin. Jsou velice málo biochemicky aktivní. Nefermentují ani neoxidují sacharidy, protože jsou chemoorganotrofní mikroorganismy. Jsou kataláza a oxidáza pozitivní bakterie a redukují dusičnany. Nevytváří pigment. Indol a testy na produkci acetoinu a methylčerveně jsou negativní. Hydrolýza tyrosinu, kaseinu, škrobu a želatiny je negativní. *Campylobacter jejuni* má jako jediný pozitivní test na hydrolýzu hippurátu [2,8].

1.3.1 Růstové podmínky *Campylobacter jejuni*

Rod *Campylobacter* je citlivý patogen a ke svému růstu vyžaduje speciálně obohacené půdy a mikroaerofilní prostředí. V potravinách se z těchto důvodů běžně nemnoží, ale přežívá v nich. Odolnost k vnějším podmínkám je docela nízká. V oblasti očkovací čáry můžeme pozorovat plazivý růst. Jsou součástí fyziologické mikroflóry zvířat a jsou přenosné na člověka [8, 9].

1.3.2 Vliv atmosféry na růst *Campylobacter jejuni*

Pro růst *Campylobacter jejuni* vyžaduje mikroaerofilní prostředí, které obsahuje sníženou tenzi kyslíku (5 %) a zvýšenou tenzi oxidu uhličitého (10-15 %). Pokud se v okolní atmosféře vyskytuje nízká teplota a vysoká vodní aktivita je schopen přežít i několik dní, ale pokud se nachází při pokojové teplotě a suchém prostředí, tak do několika hodin umírá [9,13].

1.3.3 Vliv teploty na růst *Campylobacter jejuni*

Jedná se o termofilní bakterii s teplotou růstu okolo 32 – 45°C. Optimální teplota růstu je 42°C. Je velice citlivý na překročení optimální teploty. Jeho růst už je zcela zastaven při 46°C. Přežívá v mléce a ve vodě při 4°C, dále v chlazené a mražené drůbeži. Díky mražení dochází ke snížení počtu *Campylobacter jejuni*, ale ne k jeho úplné eliminaci. Za příznivých podmínek přežívá i několik měsíců. Je velmi citlivý na vysoké teploty a pasterační teploty ho ničí. Dále je citlivý na vyschnutí, kdy za 18 – 24 hodin umírá. Přežívá ve vhodné potravinové matici nebo ve vodě. Jeho schopnost přežít při takových podmínkách je ovlivněna tvorbou biofilmu a přítomností jiných mikroorganismů [2,13].

1.3.4 Vliv pH a organických/anorganických kyselin na růst *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni je citlivý na nízké pH. Limitní hodnotou pH je 4,7. Optimální pH je okolo 6,5 – 7,5. V trávicí soustavě je zničen žaludečními šťávami, pokud není zkonsumován společně s potravinami, které ho chrání. Organické kyseliny jej také usmrcují, nejlepší baktericidní účinky mají, kyselina mléčná a octová. Prostředí s 2 % NaCl kampylobaktery inhibuje [8, 18].

1.3.5 Vliv vodní aktivity, dezinfekčních prostředků a záření na růst *Campylobacter jejuni*

Aktivita vody (a_w) udává množství vody v potravinách. Je definována jako poměr tenze vodních par potravin k tenzi par čisté vody. Správná hodnota vodní aktivity je nutná ke správnému pomnožení a látkovému metabolismu. Hodnota aktivity vody pod hodnotu 0,97 působí na *Campylobacter jejuni* inhibičně. Také je u mikroorganismu zvýšená citlivost na běžné dezinfekční prostředky a chlorované preparáty. *Campylobacter jejuni* patří k citlivým mikroorganismům na ozařování. Murphy a kol. 2006 uvádí, že ke spolehlivému zničení postačuje 1kGy [8, 17, 25].

1.4 Výskyt v potravinách

Nejrizikovější potraviny z hlediska onemocnění kampylobakterií je syrová drůbež, porcované drůbeží maso a polotovary z něj. K méně rizikovým se řadí vepřové a hovězí maso nebo mořské plody a koryši. Dalším možným zdrojem nákazy může být i syrové nepasterizované mléko, voda, zelenina nebo ovoce. Riziková je příprava potravin, jako je například grilování nebo opékání. V domácnosti může docházet ke křížové kontaminaci. Špatným zacházením s potravinami se může *Campylobacter jejuni* dostat na nástroje, nádoby nebo další potraviny [36, 38].

V České republice je promořenost drůbeže touto bakterií vysoká. K sekundární kontaminaci dochází při jatečním zpracování a negativně tím přispívá k pozitivním nálezům u chlazených a mražených brojlerů v obchodních sítích. Bardoň a kol. (2011) uvádí, že pozitivních výsledků u mražených výrobků je 38 % a u chlazených výrobků je 76 %. U vepřového masa je výskyt přibližně 1 – 10 % [36].

1.4.1 Drůbeží maso, játra a vepřové maso

Drůbež byla podle epidemiologických údajů zařazena jako hlavní zdroj kontaminace kampylobaktery. Ke kontaminaci povrchu jater dochází post mortem nebo nastane systémová infekce u živých ptáků. Nejvyšší koncentrace kampylobakterů převládá v drobcech, zejména v játrech. Ke kolonizaci drůbeže dochází pomocí vody, výkalů, krmení, divokých ptáků a hlodavců. *Campylobacter jejuni* u drůbeže vystupuje v roli komenzála a nevyvolává u nich onemocnění. U drůbeže osidluje především dolní část trávicího traktu, a to slepé střevo, tlusté střevo a kloaku [37, 45, 51].

Játrová paštika byla prohlášena jako potenciální zdroj nákazy kampylobakterem. Důkladným vařením dochází k eliminaci rizika onemocnění. Avšak některé potraviny se pouze minimálně vaří, aby u nich došlo k zachování jejich sensorických vlastností a narůžovělého vzhledu. Pro bezpečné provaření je nutná teplota v jádru výrobku 68 – 70°C po dobu 45 minut [42, 43].

Ke kontaminaci jater může také dojít během přípravy. Brojeři jsou uznávaným zdrojem kontaminace při manipulaci, přípravě nebo kontaminaci masa. Tato kontaminace je zodpovědná za až 30 % případů onemocnění kampylobakteriózou [57, 62].

U prasat bylo prokázáno, že jsou rezervoárem *Campylobacter jejuni*. Vepřové produkty tak jsou zdrojem infekce u lidí. Syrová nebo nedostatečně tepelně upravené játra jsou nebezpečná pro zdraví lidí [47, 60].

1.4.2 Mléko

Rizikovým faktorem pro infekci je pití nepasterizovaného mléka. *Campylobacter jejuni* není schopen přežít pasteraci mléka, ale je schopný přežívat v mléce při nízkých teplotách [46, 58].

Ke kontaminaci mléka dochází primárně nebo sekundárně. K primární kontaminaci mléka dochází ze strukových kanálků, z vemene nebo z okolního prostředí. Pokud dojnice nepřichází po dobu dojení do kontaktu například s výkaly. Také záleží na hygienických podmínkách v průběhu odběru, přepravy a dalším zpracování [22, 24].

K sekundární kontaminaci dochází po zmnožení mikroorganismů z primární kontaminace. Čím kratší doba je mezi podojením a zchlazením mléka, tím menší množství mikroorganismů se v mléce bude nacházet [24].

1.5 Onemocnění kampylobakterií

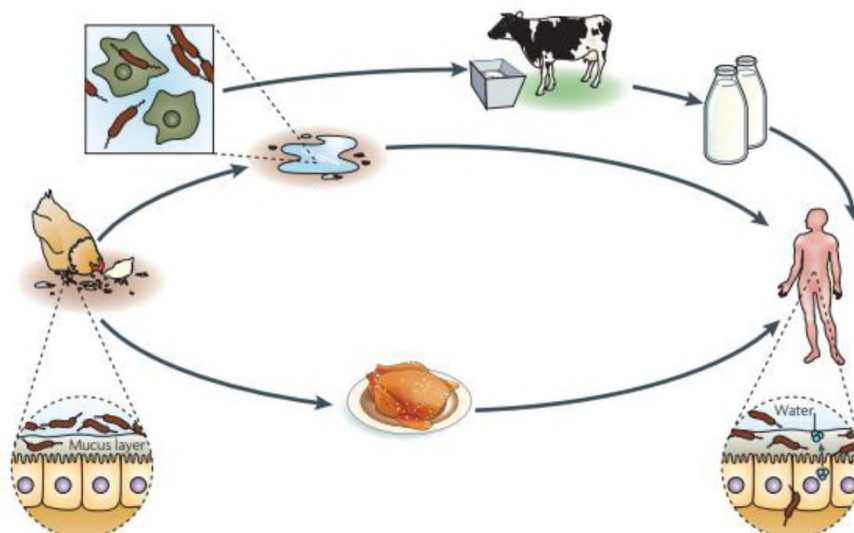
Bakterie rodu *Campylobacter* u člověka mohou vyvolat onemocnění gastrointestinálního traktu zvané kampylobakterií. Každý rok se v České republice touto nemocí nakazí zhruba 23 tisíc obyvatel [24, 25].

Jedná se o akutní průjmová onemocnění doprovázena teplotou, artritidou, meningitidou, sepsí, bolestmi hlavy, břicha, končetin a svalů. U zvířat toto onemocnění může způsobovat potraty. Postihuje především děti nebo jedince s oslabenou imunitou. Pro zdravého člověka je infekční dávka přibližně 500 buněk a inkubační doba je 2 – 5 dní [24, 49].

Bakterie se vyskytují ve střevním traktu domácích i volně žijících teplokrevných zvířat. K infekci člověka těmito bakteriemi může dojít přímo (kontakt se zvířetem) nebo nepřímo kontaminovanou potravou či vodou fekáliemi. Nejčastější zdroj infekce je konzumace nedostatečně tepelně upraveného kuřecího masa nebo potraviny, které jsou určené k přímé spotřebě a byly vystaveny kontaktu se syrovým kuřecím masem. K předjetí riziku kontaktu s kontaminovanou potravou je možné prostřednictvím bezpečné manipulace se syrovým masem, vařením a správnou hygienou v kuchyni. Doporučuje se neomývat koupené chlazené kuřecí maso pod tekoucí vodou, která vytvoří kontaminovaný aerosol, který postříká okolí. Výskyt kampylobakterů v potravinách a u zvířat v České republice sleduje Národní referenční laboratoř pro kampylobaktery na Státním veterinárním ústavu v Olomouci [24, 25, 50].

Po požití kontaminované potraviny bakterie rodu *Campylobacter* pronikají do tenkého střeva, kde dochází k jejich pomnožení. Následně přilnou ke střevní sliznici, kde produkují toxiny, které pronikají do krevního a lymfatického oběhu. U tekutin jako je voda a mléko dochází k rychlému průchodu žaludkem a tím se zvyšuje množství živých buněk, které proniknou až do tenkého střeva, kde se pomnoží [50, 54, 55].

Obrázek 3 popisuje kolonizaci trávicí soustavy především mukózní vrstvy střeva *Campylobacter jejuni*. Infikovat člověka může přímo požitím kontaminované vody nebo konzumací kontaminované potraviny (nepasterizované mléko nebo maso). U člověka napadá střevní epitelovou vrstvu a způsobuje zánět a průjem [24, 56, 65].



Obrázek 3 Schéma cest, kterými může dojít k infekci bakteriemi rodu *Campylobacter*, převzato a upraveno z: [14]

1.5.1 Patogenita a patogeneze

Campylobacter jejuni produkuje řadu faktorů virulence. Ke kolonizaci střeva dochází pomocí pohyblivosti (chemotaxe) a produkce adhezivních proteinů. Adhezin PEB1 je povrchový antigen, který umožňuje bakterii adherovat k buňkám a kolonizovat střeva. Pro přežití uvnitř vakuol epiteliálních buněk slouží produkce katalázy a superoxiddismutázy, které inaktivují volné radikály kyslíku. *Campylobacter jejuni* je schopný získávat železo z transferinu a laktoferinu v séru a sliznicích hostitele. Hlavním toxinem je CDT. CDT toxin je geneticky příbuzný s bakteriálními proteinovými toxiny. Narušuje epiteliální klky a narušuje absorpci střeva a vzniká průjem. CDT toxin se skládá z DdtA, CdtB a CdtC. Dále *Campylobacter jejuni* produkuje enterotoxin podobný choleře, hepatotoxin a Shiga toxin [1, 9, 15].

Díky potravinám, které snadno procházejí žaludkem, proniká do střeva vyšší množství živých buněk, které se zde množí a způsobují patologické změny. *Campylobacter jejuni* vyhledává střevní krypty vyplněné mucinem, protože má pozitivní chemotaxi k mucinu. Mucin je zdrojem energie pro jejich růst. Ze začátku se kolonizuje tenké střevo, a to zejména jejunum a ileum. Infekce se pak dále šíří do tlustého střeva a konečníku. Dochází zde k přilnutí bakterií k epiteliální střevní buňce, po průniku do vakuol se množí a produkuje CDT toxin. Dochází ke vzniku zánětu a průjmům, které jsou spojené se ztrátou tekutin. Onemocnění může končit i úmrtím u osob s oslabenou imunitou, např. u osob s onkologickým onemocněním, onemocněním jater nebo s AIDS [11, 13, 25].

1.5.2 Prognóza

Kampylobakterióza je onemocnění nepříjemné, ale u běžných pacientů ohrožuje život vzácně. Onemocnění během jednoho týdne odezní a symptomy rychle ustupují. Ale pokud se toto onemocnění objeví u těhotných žen, může dojít k potratu nebo porodu mrtvého plodu. U pacientů s podvýživou nebo v rozvojových zemích je prognóza vážná [1, 3, 10].

1.5.3 Léčba

K léčbě této infekce není nutná hospitalizace v nemocnici, pokud však nemají pacienti těžký průjem se silnou dehydratací, zvracením a nedostatečným příjmem potravy. Při hospitalizaci je nutné pacientovi dodat potřebné tekutiny a zahájit protiprůjmovou dietu, která omezuje tuky a mléčné výrobky. Také je možné podávat probiotika. U těžkých případů se podávají antibiotika. Kampylobakter je citlivý na různá antibiotika [12, 19].

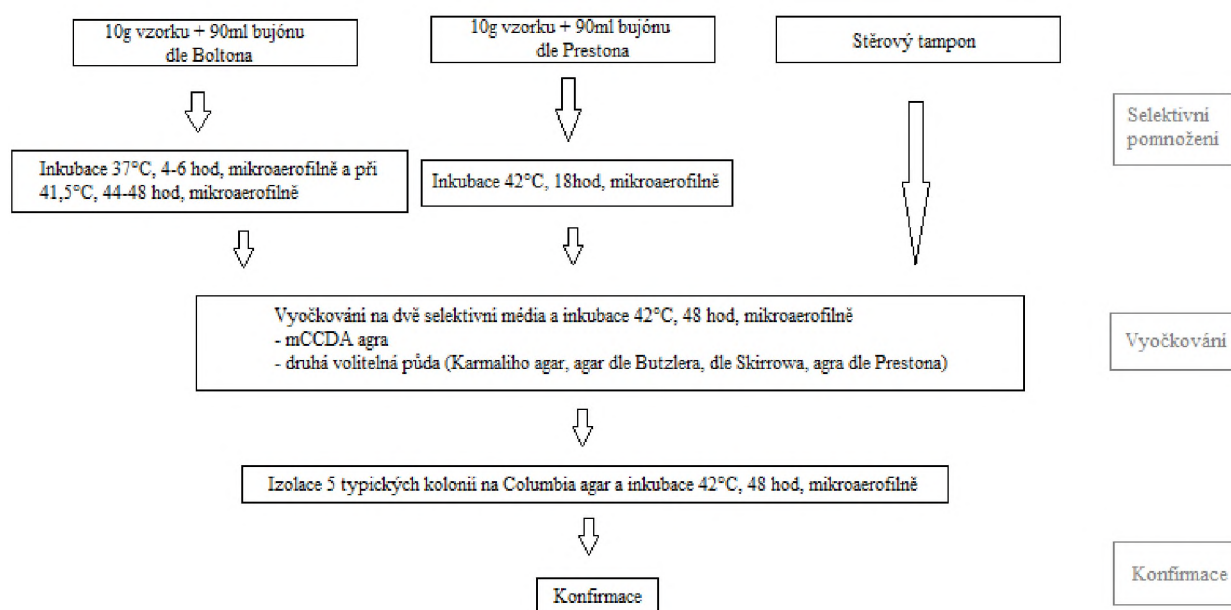
Vhodnou volbou jsou například makrolidy, doxycyclin, tetracykliny nebo chloramfenikol. Použití fluorochinolonu při kampylobakterióze není zcela vhodné, protože zde snadno vzniká rezistence. Fluorochinolony jsou účinná antibiotika se širokým spektrem účinnosti. K rezistenci dochází mutací genů, které řídí replikaci a segregaci chromozomální DNA [19, 21].

1.5.4 Komplikace

V krajních případech může kampylobakterióza způsobit rozvoj tzv. reaktivní artritidy nebo tzv. Guillain-Barrého syndromu. Tento syndrom neboli polyradikuloneuritida je akutní zánětlivé postižení periferních nervů, které způsobuje svalovou obrnu různého rozsahu. Toto onemocnění se projevuje po 9 – 26 dnech od infekce. Vyžaduje rychlou terapeutickou intervenci. Reaktivní artritida vzniká u geneticky disponovaných jedinců v časovém odstupu po infekci, která proběhla v jiné části organismu. K dalším komplikacím patří postinfekční následky, dehydratace nebo rozvoj sepse s následným postižením různých orgánů. Komplikace nastávají především u novorozenců, kojenců, jedinců s imunodeficitem a starších lidí s cirhózou nebo diabetem. U novorozenců může docházet k meningitidě, pneumonii, hnisavé artritidě nebo dermatitidě [2, 3, 45, 63].

1.6 Průkaz bakterií rodu *Campylobacter*

K průkazu bakterií rodu *Campylobacter* se využívá norma ČSN EN ISO 10272-1, ve které jsou uvedena speciálně botahá živná media, která obsahují selektivní složky. Nutričně bohatá média musí obsahovat suplementy zachycující O₂ (hemin, koňská krev, aktivní uhlí) a antibiotika k inhibici kontaminující mikroflóry (cefoperazon, vankomycin, trimetoprim a cykloheximid). Kultivace probíhá v mikroaerofilním prostředí, která obsahuje 5 % O₂, 10 % CO₂ a dostatečnou vlhkost. K průkazu bakterií dochází ve třech krocích. Prvním krokem je pomnožení v tekuté selektivní půdě (bujón dle Boltona a bujón dle Prestona). Bujón dle Boltona se používá při nízkém obsahu doprovodné mikroflóry, bujón dle Prestona při vysokém obsahu doprovodné mikroflóry a stěrový tampón. Druhým krokem je vyočkování na povrch dvou selektivních kultivačních médií – mCCDA (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem) a druhá volitelná půda (Karmaliho agar nebo například Butzlerův agar). Třetí krok je konfirmace, kde se zkoumají typické kolonie (biochemické testy, pohyb) (Obrázek 4) [30, 44, 53].



Obrázek 4 Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Campylobacter* spp. – Část 1: Metoda průkazu, ČSN EN ISO 10272-1 [30]

1.6.1 Metody identifikace a charakterizace

Norma ČSN ISO 10272-1 požaduje k identifikaci a charakterizaci kampylobakterů následující fenotypové a biochemické vlastnosti, vyhodnocení morfologie, pohyblivost, růst při 25°C za mikroaerofilních podmínek, růst při 41,5°C za aerobních podmínek, průkaz cytochromoxidázy a katalázy, citlivost růstu mikroorganismů k cefalotoxinu a kyselině nalidixové, schopnost hydrolyzovat hippurát a indoxylacetát. Na obrázku 5 vidíme suspektní kolonie na Columbia agaru (mikroaerofilní kultivace při 42°C a 48 hod) [28, 53].



Obrázek 5 Vzhled kolonií bakterie *Campylobacter jejuni* na Columbia agaru, foto autor

Hydrolyza hippurátu je určena pro stanovení schopnosti *Campylobacter jejuni* hydrolyzovat hippurát. Pro test se využívá komerčně dostupná souprava HIPPURATetest. *Campylobacter jejuni* má pozitivní hydrolyzu hippurátu a vzniká tak modrofialové zbarvení [28, 52].

1.7 Polymerázová řetězová reakce

Molekulárně biologické metody jsou založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR). V dnešní době jsou hojně využívány pro detekci kampylobakterů v různých vzorcích. Podle různé oblasti genomu stanovujeme specifitu. Pokud identifikujeme jen na úrovni rodu, využíváme úsek 16S rRNA. Pro identifikaci druhu využíváme specifické geny. Principem PCR je multiplikace krátkého fragmentu bakteriálního genomu. Vzniklý produkt je odseparován a za pomoci elektroforézy je vizualizován. Pro detekci *Campylobacter jejuni* se využívají amplikony genu HipO pro hippurikasu nebo mapA pro membránový protein A [39, 53].

Platts-Mills a kol. (2014) porovnávali metody PCR a EIA pro stanovení bakterií rodu *Campylobacter* ve stolici. Citlivost a specifita pro EIA metodu byla 97,6 % a pro PCR metodu 98 %. Studie navrhuje využití PCR metody pro stanovení bakterií, protože si zachovává vysokou citlivost [68].

Kamei a kol. (2014) vyvinuli PCR-RFLP test, který využívá cdt toxin pro detekci *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* a *C. upsaliensis*. Citlivost a specifita testu byla 100 % s výjimkou *C. hyointestinalis* (88 %). Výsledky testů ukazují, že PCR-RFLP test je vhodný pro detekci a diferenciaci sedmi druhů *Campylobacter* [67].

Kabir a kol. (2019) zkoumali citlivost PCR metody cílenou na detekci 23S rRNA, ceuE, Lexa, hipO, mapA, ask a cdt genů *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Citlivost PCR testů byla 85,2-100 % pro *Campylobacter jejuni* a 97-100 % pro *Campylobacter coli* [66].

1.8 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založené na reakci antigenu (bakteriální buňky) s protilátkou. Imunochemické metody jsou rozšířené v klinické biochemii, ve veterinární medicíně a v analýze potravin. Výhodou imunochemických metod je jednoduchost, rychlost, nízké náklady, detekce bakterií v poměrně komplexní matrici a testování velkých počtů vzorků najednou. K nevýhodám imunochemických metod patří časová náročnost přípravy specifických protilátek (dlouhé inkubace) a jejich náročnost na přístrojová vybavení. Pro stanovení mikroorganismů se využívají monoklonální protilátky nebo polyklonální protilátky. Monoklonální protilátky jsou specifické pro virulentní proteiny a polyklonální protilátky jsou specifické pro celé buňky nebo proti bičíkům [7]. V praxi mohou sloužit pro záchyt patogenů ze vzorku magnetické částice, které jsou pokryté protilátkami, jejichž detekce může být potvrzena kultivací nebo využitím PCR se specifickými primery [7, 53].

1.9 Nové způsoby stanovení

K novým metodám stanovení patří nová selektivní média pro *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* z potravin. Patří sem CampyFood ID agar nebo *Campylobacter jejuni/Campylobacter coli* Chromogenic Planting medium [50].

K rychlé detekci slouží i latexové aglutinační testy (např. SCIMEDXCAMPY), které jsou využívány pro stanovení *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Campylobacter lari*. Lze využít i automatizované systémy, např. VIDAS[®] (Vitek Immuno Diagnostic Assay System) – pro stanovení z potravin, RIDASCREEN[®] *Campylobacter* – pro stanovení klinických vzorků a RIDA[®]GENE – pro stanovení bakteriální stolice. Tyto metody však musí být potvrzeny dalšími metodami [50, 69].

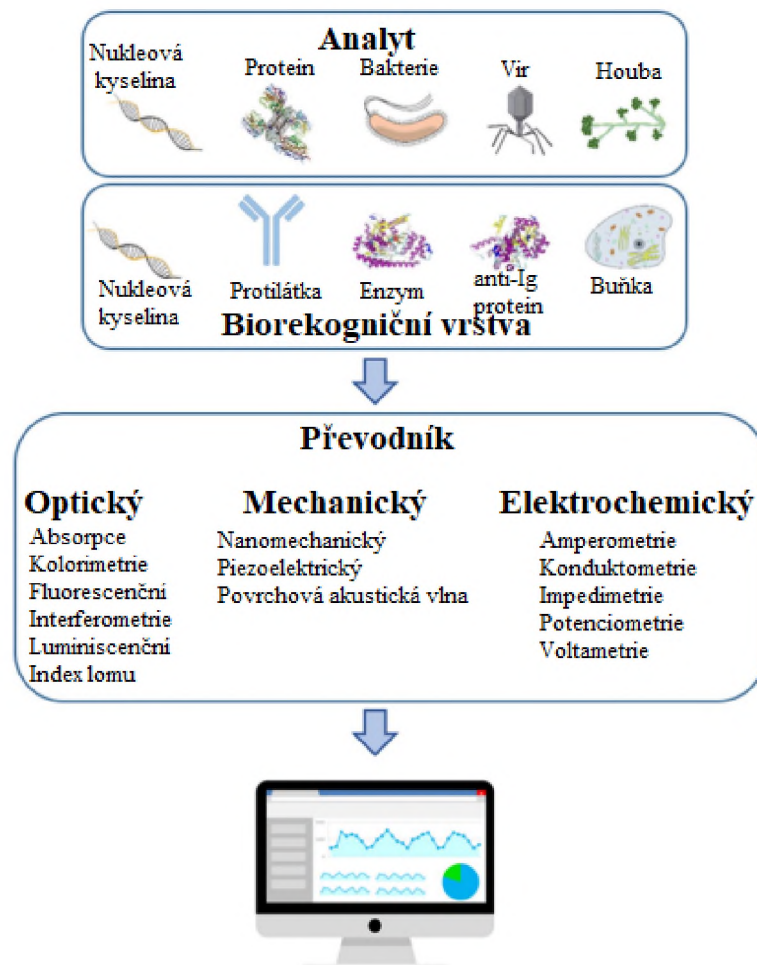
Systém VIDAS[®] je založený na principu ELFA (enzymová fluorescenční analýza). Jedná se o komerčně dostupný automatizovaný imunoanalytický systém, který je založen na principu fluorescenční imunoanalýzy (ELFA). Systém VIDAS[®] využívá reagenčního proužku a plastové trubičky, na kterou jsou navázány protilátky. Tato metoda byla využita například pro stanovení *Campylobacter jejuni* v mletém hovězím mase, v čerstvé zelenině, v chlazených a mražených těl brojlerů [50, 69, 70].

RIDASCREEN[®] *Campylobacter* je enzymatický imunotest pro kvalitativní identifikaci antigenů *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Tento test využívá monoklonální protilátky pro sendvičovou ELISA metodu. Tato metoda slouží k vyšetření vzorků stolice [50, 69, 70].

RIDA[®]GENE – pro stanovení bakteriální stolice založené na principu Multiplex PCR v reálném čase. Jedná se o citlivou detekci tří nejdůležitějších bakterií způsobujících průjem (*Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* a *Y. enterocolitica*). Izolované specifické fragmenty pro dané bakterie jsou detekovány sondami hydrolýzy, které jsou na jednom konci značené zhášečem a na druhém konci fluorescenčním reportérovým barvivem (fluorofor). Fluorescenční signál je detekován optickou jednotkou PCR v reálném čase [35, 50].

2 Biosenzory

Biosenzor je zařízení obsahující rozpoznávací biologickou část (např. receptor, enzym, DNA, protilátka, buňka, tkáň, organela) v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem (Obrázek 6). Jedná se o analytický přístroj, který přeměňuje biologickou odpověď na elektrický signál, který je úměrný koncentraci sledovaného analytu. Biologická složka biosenzoru rozpoznává stanovovaný analyt v komplexním vzorku a fyzikálně-chemický převodník je zodpovědný za převod na signál elektrický [79, 129].



Obrázek 6 Rozdělení biosenzorů podle biorekogniční vrstvy a převodníků, převzato a upraveno z: [136]

V současné době jsou biosenzory využívány v potravinářském průmyslu především ke stanovení vitamínů, detekci bakteriální kontaminace a sacharidů. Přináší zlepšení citlivosti a selektivity při detekci potravinových kontaminantů [33]. Dále se biosenzory využívají v oblasti environmentálních a klinických aplikací [6, 75, 146]. Biosenzor by měl být robustní, specifický, reprodukovatelný, odolný vůči tepelným změnám nebo změně pH a iontových sil. Jedná se o rychlou, spolehlivou a efektivní detekci. Za ideální senzor považujeme takový biosenzor, který poskytuje odezvu v „reálném čase“ [75, 76, 78].

Biosenzory můžeme rozdělit podle fyzikálně-chemických převodníků nebo podle biologické složky [79, 129].

2.1 Rozdělení podle fyzikálně-chemického převodníku

Podle fyzikálně-chemického převodníku dělíme biosenzory na optické, kalorimetrické, piezoelektrické a elektrochemické. Převodníkem u kalorimetrického biosenzoru je tepelný vstup/výstup při reakci, u optického biosenzoru je to světlo produkované během reakce a například u piezoelektrického biosenzoru je to změna afinitní interakce výchozí látky a produktů [79].

2.1.1 Optické biosenzory

Optické biosenzory jsou založeny na principu interakce světelného záření s chemickými látkami. Měří se intenzita absorpce nebo emise světelného záření, která vzniká při biochemické reakci na povrchu biosenzoru. Prostřednictvím optického vlákna jsou světelné vlny vedeny ke vhodnému detektoru. Zdrojem světla jsou výbojky, lampy, lasery nebo diody [129, 130].

2.1.2 Kalorimetrické biosenzory

Kalorimetrické biosenzory využívají změn teplot během enzymatických reakcí. Jelikož nelze přesně určit, kolik tepla se uvolnilo (část tepla se spotřebuje zářením, vedením apod.), má tento biosenzor omezení. Dále je nutné sledovat teplotu v rozlišení $0,0001^{\circ}\text{C}$ a to vyžaduje náročné přístrojové vybavení [131].

2.1.3 Piezoelektrické biosenzory

Piezoelektrický jev vzniká při mechanickém tlaku na povrchu různých krystalů (křemen, turmalín). Každý krystal má přirozenou vibrační frekvenci. Pokud je piezoelektrický, vibrací vzniká oscilující elektrické pole o stejné frekvenci, ale pokud je piezoelektrický krystal zapojen do oscilujícího obvodu, začne vibrovat. Stabilní vibrace však nastává při přirozené rezonanční frekvenci, kdy je umožněn efektivní přenos energie a elektrického pole. Potažením povrchu krystalu vhodnou vrstvou bioelementu lze dosáhnout lepší specifčnosti. Adsorpcí analytu na povrch krystalu dojde ke změně rezonanční frekvence krystalu, která je úměrná hmotnosti navázané látky [123, 129].

2.1.4 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory mohou být využity pro analýzu komplexních vzorků. Získaly na oblibě díky nízkým pořizovacím a provozním nákladům, možné miniaturizaci a časové nenáročnosti. Nevýhodou je možné znečištění povrchu elektrod vlivem adsorpce složek ze vzorku. Elektrochemické biosenzory vyžadují přítomnost elektroaktivní složky ve vzorku. U biosenzorů se jedná o přítomnost specifické značky, elektroaktivního substrátu nebo substrátu, který je v průběhu enzymatické reakce hydrolyzován na elektroaktivní produkt. Elektrochemické biosenzory dělíme na potenciometrické, amperometrické, voltametrické a vodivostní [79, 103, 104].

2.1.4.1 Potenciometrické biosenzory

Potenciometrické biosenzory jsou založeny na principu snímání změn potenciálu mezi pracovní a referentní elektrodou. K měření potenciálu dochází při redukcí nebo oxidaci látky v analyzovaném vzorku. Pracovní elektroda mění svůj potenciál i při malých změnách koncentrace analytu, zatímco potenciál referentní elektrody je konstantní po celou dobu měření. Potenciometrické biosenzory se používají pro detekci patogenů, ale patří mezi méně používané. Pro mikrobiální detekci je vhodný pouze LAPS – light addressable potentiometric sensor (světlo adresovatelný potenciometrický senzor). LAPS senzor je založený na FET – field effect transistor (pole tranzistoru). Skládá se ze silikonového polovodičového senzoru a izolační vrstvy. Ta je v kontaktu s vodným roztokem, kde dochází k imunoreakci. Změny potenciálu jsou detekovány jako rozdíl náboje mezi povrchem izolátoru a FET. LAPS měří střídavý foton proud, který generují světelné zdroje (dioda). Komerčně dostupný LAPS senzor

je například Bio-Detector (Smith Detection, Warrington, UK). Jedná se o osmikanálové zařízení [82, 114].

Takovým příkladem může být NF-LAPS senzor vyvinutý pro detekci *E. coli* popsany ve studii Shaibani a kol. (2016). Jedná se o světlem adresovatelný potenciometrický biosenzor s nanovláknou (NanoFiber-Light Addressable Potentiometric sensor). Mez detekce byla 10^2 CFU/ml. [69].

2.1.4.2 Vodivostní biosenzory

Vodivostní biosenzory jsou založeny na principu snímání změn vodivosti během reakce. Pokud se elektrolyt disociuje na iontové složky v kapalině, tak se z kapaliny stane vodivé médium. Ale když se použije elektrické pole, dochází k migraci iontů. V případě, že se na elektrodu aplikuje potenciál, tak uvnitř elektrolytu vzniká elektrické pole. V elektickém poli se záporné náboje pohybují směrem k anodám a kladné náboje směrem ke katodám. Vznikající proud v elektrolytu je způsoben pohybem iontů k elektrodám [82, 85].

Využití vodivostních biosenzorů pro detekci mikroorganismů jsou založené na principu snímání vodivostních změn, které nastanou v médiu metabolickou aktivitou mikroorganismů. Na uvedeném principu pracuje i komerční zařízení Malthus 2000 (Malthus Instruments, Crawley, UK). Toto zařízení může být použito pro měření rostoucí mikrobiální populace. Tímto zařízením byla stanovena například parazitická houba *Ichthyophonus hoferi* nebo bakterie *Erwinia carotovora* [114].

Muhammad-Tahir a kol. (2006) vyvinuli vodivostní biosenzor pro detekci patogenů v čerstvých produktech, jako jsou například jahody. Detekovali *E. coli* O157:H7 a *Salmonella spp.* Citlivost detekce byla přibližně $7,9 \times 10^1$ CFU/ml [116].

2.1.4.3 Amperometrické a voltametrické biosenzory

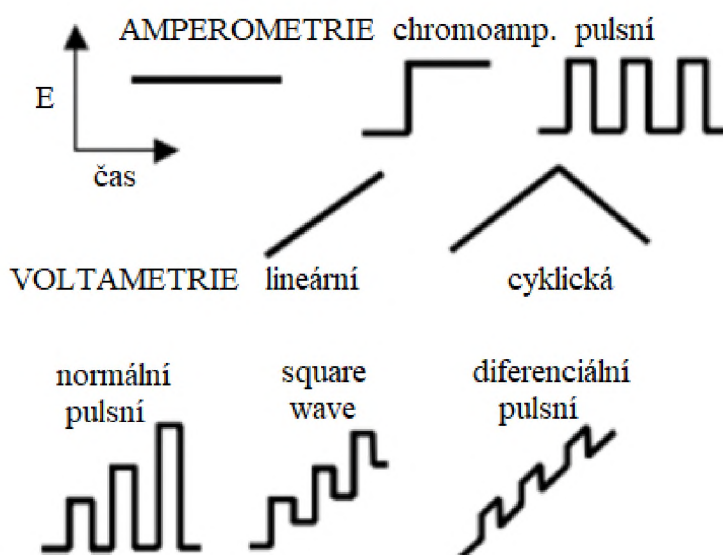
Amperometrické biosenzory jsou používané nejčastěji, protože to jsou nejjednodušší elektrochemické transdukční techniky. Elektrochemický článek se skládá z referenční elektrody a pracovní elektrody, která je vyrobena z uhlíku, platiny nebo zlata. Principem amperometrické detekce je měření proudu, který je generován, buď reakcí katalyzovanou enzymy nebo bioafinitní reakce na povrchu pracovní elektrody. Velikost proudu prošlého

systemem za určitý čas udává náboj. Tento náboj odpovídá molárnímu množství látky, která se přemění na elektrodě. Výhodou amperometrických biosenzorů je, že jsou malé a mohou se přenášet a používat je v terénu [82, 85].

Za pomoci amperometrického biosenzoru byl například stanoven *Staphylococcus aureus* ve vzorcích masa a mléka, kdy byl biosenzor schopen detekovat 10^3 CFU/ml. Komerční zařízení Midas Pro (Biosensori SpA, Miláno, Itálie) je schopné detegovat mikroorganismy za pomoci amperometrického biosenzoru [114].

Alexander a kol. (2016) detegovali *Salmonella* Typhimurium z mléka amperometrickým biosenzorem za pomoci polyklonální protilátky. Použili zlatou elektrodu [116].

U voltametrických měření se sleduje závislost proudu na potenciálu pracovní elektrody a měřený proud je úměrný koncentraci stanovované látky. K nejčastějším voltametrickým technikám ve spojení s biosenzory patří lineární (LSV) nebo cyklická voltametrie (CV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV), square wave voltametrie (SWV) (Obrázek 7). Všechny tyto typy jsou vhodné pro detekci širokého rozsahu koncentrací [82, 85, 105].



Obrázek 7 Křivky vkládaných potenciálů na elektrodu v čase

2.2 Rozdělení podle biologické složky

Podle biologické složky dělíme biosenzory na biokatalytické senzory, imunosenzory, DNA senzory a biomimetické senzory. Bioreceptory jsou důležité pro specifitu biosenzorových technologií. Jsou zodpovědné za vazbu stanovovaného analytu na senzor [79].

2.2.1 Biokatalytické biosenzory

Biokatalytické systémy obsahují bioelement, který přeměňuje analyt chemickými reakcemi. Mohou obsahovat enzym, celé buňky, mikroorganismy (bakterie, plísně, kvasinky). Enzymové biosenzory využívají čistěných enzymů, které umožňují zvýšení selektivity. Všechny enzymové senzory jsou schopné fungovat po immobilizaci enzymu na jakýkoliv převodník. Nejčastěji používané enzymy jsou oxidázy a dehydrogenázy, které jsou komerčně dostupné. Na rozdíl od mikrobiálních a tkáňových elektrod je enzym ve svém přirozeném prostředí a odpadá nutnost izolovat ho složitými čistícími kroky. Cena těchto biosenzorů je nízká, nevýhodou je dlouhá doba odezvy a nízká selektivita. Biokatalytické biosenzory se uplatňují zejména při detekci organických sloučenin vstřebávaných mikroorganismy, monitorování změn při respiraci během metabolismu a v analýze potravin, na základě biologické spotřeby kyslíku (BSK) [131,132].

2.2.2 DNA biosenzory

DNA senzory obsahují sekvenci jednoho polynukleotidového řetězce immobilizovanou na pevný nosič. Pokud DNA senzor ponoříme do vzorku s neznámou DNA nebo RNA, nastane hybridizace s neznámou nukleovou kyselinou párováním komplementárních bází, kdy dochází k detekci a identifikaci vzorků. Tyto senzory se využívají v analýze potravin, detekci dědičných chorob a genetických modifikací. Jsou také nejcitlivější metodou pro stanovení mikroorganismů jako *Listeria* sp., *Salmonella* sp. nebo *Staphylococcus aureus*. Pro stanovení bakterií je nutná předúprava vzorku – lyzovat bakterie [133].

2.2.3 Biomimetické biosenzory

Biomimetický senzor v podstatě kopíruje výše uvedené typy s tím rozdílem, že jako bioelement obsahuje umělé receptory. Výhodou je jejich vyšší stabilita, nižší cena a selektivita. Mohou to být oligosacharidy, oligopeptidy, aptaméry, ribozomy, imprinty, synzomy nebo peptidové nukleové kyseliny [134].

2.2.4 Imunosenzory

Imunosenzory řadíme mezi biosenzory, kde jejich biorekogniční část využívá specifické protilátky, případně antigeny, k tvorbě biospecifických párů. Dochází tak ke kombinaci imunochemické reakce s vhodným fyzikálně-chemickým převodníkem. Výhodou imunosenzorů je vysoká specifita [79,129].

Imunosenzory dělíme na přímé a nepřímé. Přímé imunosenzory detegují fyzikální změny během vzniku imunokomplexu a nepřímé imunosenzory využívají signál, který generuje značka po tvorbě imunokomplexu. Výhodou přímého imunosenzoru je rychlost, ale mohou nastat problémy s účinnou imobilizací protilátek, sterickým přístupem analytu k vazebným místům protilátky, s křížovou reaktivitou a s nespecifickou sorpcí. Nepřímé imunosenzory měří až výslednou sekundární interakci, ne primární imunoreakci. U nepřímého stanovení je nutné zahrnout inkubační a promývací kroky [79, 80].

U běžného imunoanalytického stanovení, je možné pracovat v režimu homogenního a heterogenního uspořádání. Homogenní uspořádání nevyžaduje separační kroky a jedná se o rychlejší metodu s nižšími detekčními limity než u heterogenního uspořádání. U heterogenního uspořádání je nutné odstranění nezreagovaných analytů a reagensů, díky čemuž dochází k prodloužení doby analýz. Většina imunosenzorů využívá heterogenní uspořádání. Vzhledem k citlivosti a miniaturizaci takových zařízení se využívají v biomedicínské oblasti [103, 133].

Imunosenzory využívají nejčastěji takové převodníky, které jsou založené na monitorování přenosu elektronů (elektrochemické – amperometrický, potenciometrický, vodivostní), fotonů, změně rezonanční frekvence piezoelektrického krystalu (piezoelektrické) nebo změně optických vlastností (optické – fluorescenční, luminiscenční) [79, 133].

I když se optické imunosenzory řadí mezi citlivá zařízení, tak jejich nevýhodou je delší doba celého stanovení a náročnější požadavky na instrumentaci. Spojují princip imunoanalýzy např. s povrchovou plazmovou rezonancí (SPR), při které se zaznamenává změna indexu lomu po reakci antigenu s protilátkou [80, 129].

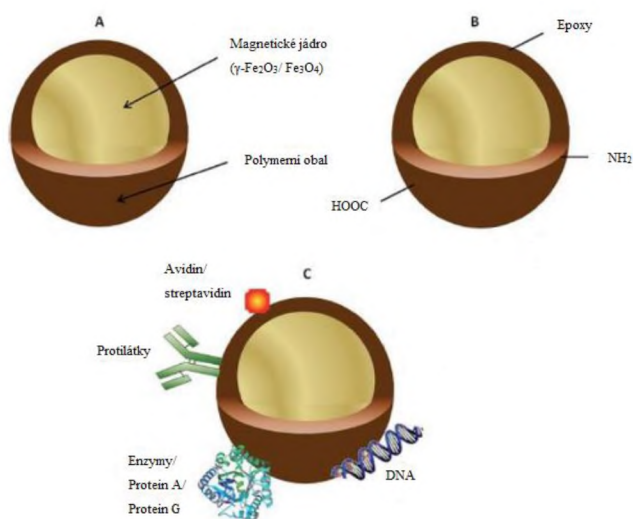
2.3 Biosenzory s magnetickými částicemi

Jedná se o alternativní možnost fixace biorekogniční vrstvy na elektrodu (například na tištěnou elektrodu nebo na povrch magnetických částic). Řada publikovaných vědeckých prací potvrzuje zvyšující zájem o využití magnetických částic ve spojení s elektrochemickou

detekcí. Výhodou magnetických částic je snadná manipulace a separace od vlastního vzorku, vysoká aktivita navázaných enzymů nebo protilátek, možnost miniaturizace a opakovaného použití. Citlivá elektrochemická detekce umožňuje stanovení nízkých koncentrací stanovovaného analytu [90, 122].

Při přípravě biosenzoru s magnetickými částicemi je základem úspěšná imobilizace biomolekuly. V posledních letech roste zájem o rozvoj biosenzoru s nanočásticemi, díky nízké toxicitě, silnému paramagnetismu, dobré biokompatibilitě a jednoduché přípravě. Užití magnetických částic jako vazebný základ a spojovací článek mezi analytem a značkou byl poprvé popsán ve studii Wang a kol. (2005) [89, 123].

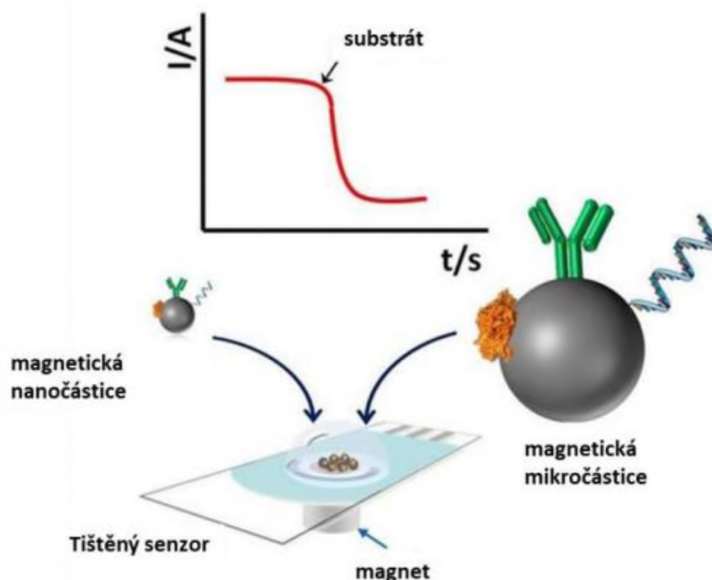
Magnetické částice (MNP) jsou vhodným materiálem pro použití pro záchyt buněk, díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem. Díky působení vnějšího magnetického pole vykazují magnetické částice magnetické vlastnosti, které po odstranění magnetického pole ztrácejí. Musí obsahovat magnetický materiál, který je často pokryt ještě tenkou vrstvou polymeru. Polymery obsahují funkční skupiny, které jsou nutné například pro imobilizaci protilátek pro záchyt bakteriálních buněk (Obrázek 8) [89, 90].



Obrázek 8 Magnetické částice: nemodifikované částice (A), s aktivními funkčními skupinami (B) a konjugované s biologickými molekulami (C), převzato a upraveno z: [89]

V současné době jsou magnetické částice komerčně dostupné v široké škále materiálů, velikostí a funkčních skupin (Dynabeads[®], Chemicell, ProMag[®], SeraMag[™], atd.). Na magnetické částice mohou být navázány specifické protilátky, na které se zachytí a izolují cílové patogeny. K nejčastějším materiálům k přípravě magnetických nosičů se využívají

oxidy železa, maghemit, magnetit a jejich směsi. Dále se mohou použít různé typy feritů ve formě magnetických kapalin nebo prášků. Magnetické částice můžeme využít k izolaci, ale taky ke zkoncentrování analytu do požadovaného objemu. V oblasti biosenzorů mohou být magnetické částice kombinovány s elektrodami. Tato kombinace řeší problém s pasivací elektrody a omezuje vliv interferujících látek (Obrázek 9) [89, 90].



Obrázek 9 Schéma spojení magnetických částic a tištěných senzorů, převzato a upraveno z: [111]

Shams a kol. (2019) využili metodu pro stanovení *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* pomocí zlatých nanočástic ve vzorcích stolice. Z 283 hodnocených vzorků bylo biosenzorem detekováno 44 pozitivních vzorků na *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Mez detekce byla 10^2 CFU/ml. Tato metoda vykazovala vyšší citlivost než PCR [118].

Práce Wilson a kol. (2019) využili citlivý, rychlý a levný test pro detekci *E. coli*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella Typhimurium* v pitné vodě a jablečné šťávě. Test byl založen na měření elektrické impedanční spektroskopie pomocí elektrod spojených s magnetickými nanočásticemi. Metoda detekovala *E. coli* v koncentraci 1 CFU/ml v pitné vodě a 3,5 CFU/ml v jablečné šťávě bez předešlé úpravy vzorku [121].

Jansaento a kol. (2016) využili pro detekci DNA bakterií *Campylobacter* magnetické nanočástice pojené s PCR a kolorimetrickou detekcí. Magnetické nanočástice usnadnily separaci a koncentraci DNA v matrici vzorku. Tato technika byla použita pro detekci bakterií

na kuřecí kůži. V experimentu byla dosažena vysoká specifita a citlivost reakce 100 fg DNA/PCR [120].

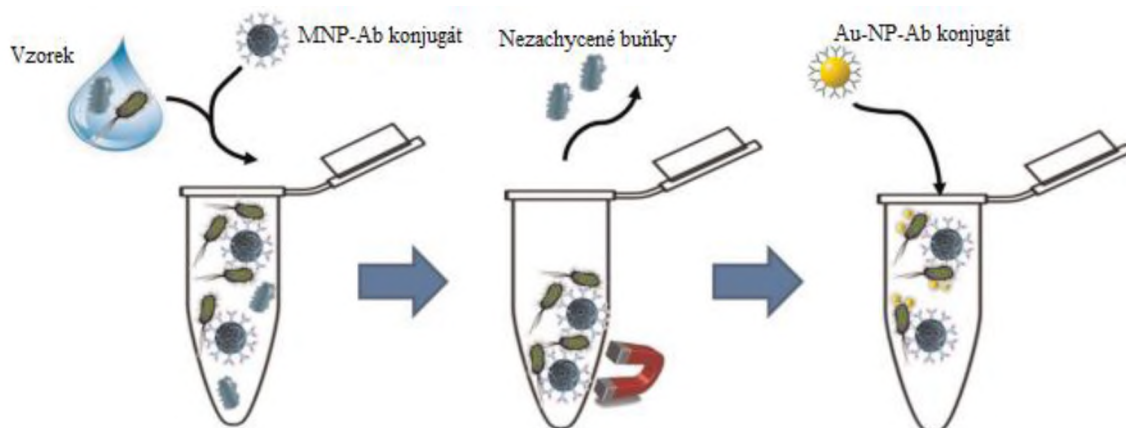
V článku Li a kol. (2013) využili metodu založenou na multiplexní PCR a magnetických nanočásticích pro detekci čtyř hlavních potravinových patogenů (*E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera* a *Campylobacter jejuni*). Metoda využila magnetické nanočástice potažené streptavidinem (SA-MNP). Mikročip rozlišoval všechny 4 patogeny s detekční citlivostí až do 316 CFU/ml [122].

2.4 Značení protilátek pomocí nanočástic

Protilátky se značí enzymy a jako alternativa jsou v poslední době nanomateriály včetně kovových nanočástic. Nanočástice jsou na svůj povrch schopny navázat velké množství biomolekul a díky tomu mohou zvyšovat odezvu biosenzoru. Nanočástice se mohou lišit materiálem, tvarem nebo porozitou. Mohou být chemicky rozpuštěny, aby docházelo k uvolnění iontů, které se stanovují elektrochemicky pomocí amperometrických či voltametrických technik [89, 90].

2.4.1 Magnetické částice značené zlatými nanočásticemi

Zlaté nanočástice (AuNPs) mají nízkou toxicitu, dobré optické a elektrochemické vlastnosti. Jejich příprava je jednoduchá. Jedná se o stabilní materiál pro kovalentní vazbu biomolekul. Zlaté nanočástice rychle přenáší elektrony mezi stanovovanou molekulou a elektrodou a eliminují nevýhody spojené s difúzí molekul k elektrodě. Po rozpuštění v kyselém prostředí dochází k uvolnění iontů zlata, které jsou měřeny rozpouštěcí voltametří. Na obrázku 10 je znázorněn princip detekce bakterií *E. coli* pomocí protilátek značených zlatými nanočásticemi [147]. V prvním kroku dochází k navázání bakterií na magnetické částice, na kterých je naimobilizována protilátka proti dané bakterii. V druhém kroku se přidávají protilátky značené zlatými nanočásticemi a celý komplex se elektrochemicky detekuje na elektrodách [94, 95].



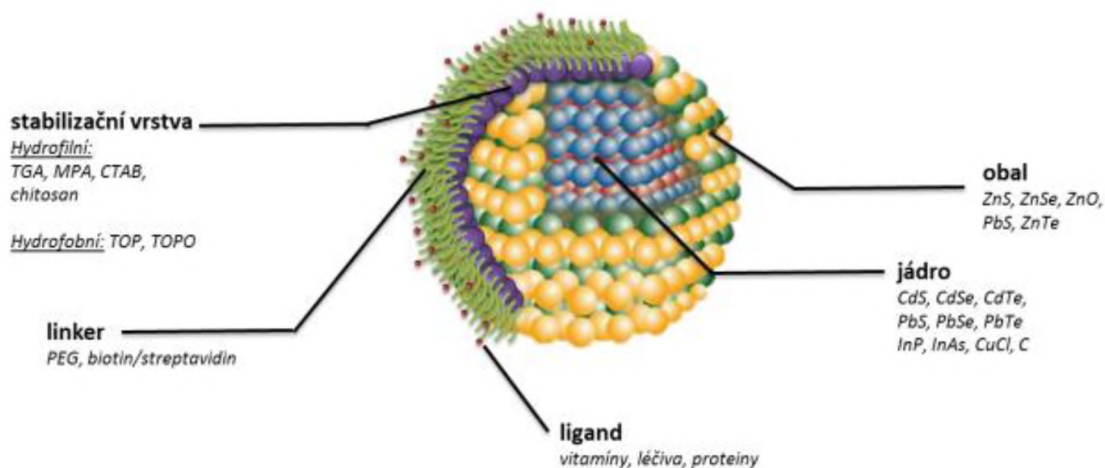
Obrázek 10 Princip biosenzoru pro detekci bakterií pomocí protilátek značených zlatými nanočásticemi, převzato a upraveno z: [147]

Silva a kol. (2019) využili zlaté nanočástice pro stanovení bakteriální buňky *Salmonella* Typhimurium v jablečném džusu. Komplex byl tvořen na PVC membráně pokryté AuNPs, která byla součástí elektrody. Limit detekce potenciometrického biosenzoru byl 6 CFU/ml [124].

Oh a kol. (2017) využili zlaté nanočástice při stanovení *Salmonella* Typhimurium ve vepřovém mase, kde limit detekce byl 10^4 CFU/ml. Zlaté nanočástice byly součástí snímacího čipu, kde tvořily monovrstvu. Detekce probíhala na principu povrchové plasmové rezonance [125].

2.4.2 Značení pomocí kvantových teček

Kvantové tečky (QDs) jsou polovodičové nanokrystaly. Jsou syntetizovány z anorganických polovodičových materiálů (selenid nebo tellurid kadmia, fosfid india, sulfid olova). Kvantové tečky mohou být potaženy inertní nebo biokompatibilní vrstvou (Obrázek 11), která nemění jejich optické vlastnosti. Jejich velikost se pohybuje okolo 2-10 nm a mají vysokou účinnost přenosu elektronů. Elektrochemická detekce kvantových teček je založena na principu jejich rozpuštění v kyselém prostředí, uvolnění iontů prvku a monitorování jejich signálu. Koncentrace analytu je přímo úměrná množství uvolněných iontů. Kvantové tečky jsou snadno rozpouštěny v kyselém prostředí. Uvolněné ionty kadmia jsou měřeny potenciometricky pomocí iontově-selektivní elektrody. Lze je využít pro širokou škálu analytů a pro multiplexor analýzy. K dalším výhodám patří jejich stabilita a krátký čas detekce [96, 97].



Obrázek 11 Kvantové tečky, převzato a upraveno z: [74]

Xue a kol. (2018) využila nový fluorescenční biosenzor pro rychlou detekci. Systém využíval magnetické nanočástice pro záchyt bakterií, kvantové tečky pro detekci bakterií a přenosný optický systém pro kvantitativní detekci. Navržený biosenzor byl schopen detekovat 14 CFU/ml [126].

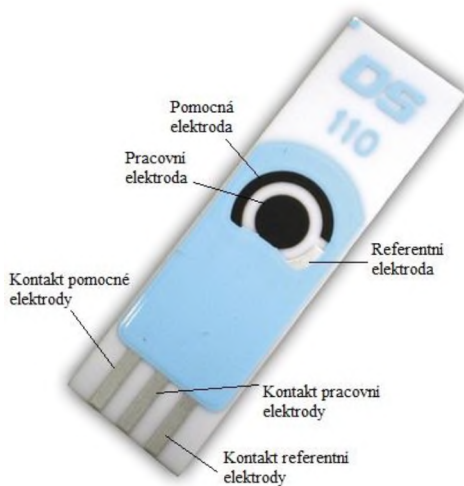
Schopností detegovat současně více patogenů se zabývala studie Vijian a kol. (2016). Studie využila vysoce citlivý a specifický elektrochemický biosenzor pro detekci *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp. a *Shigella* sp. s využitím kvantových teček. Elektrochemická detekce byla provedena pomocí SWASV (square wave anodická rozpouštěcí voltametrie) a píky byly odečítány pro PbS při -0,5 V, pro CdS při -0,75 V a pro ZnS při -1,1 V [127].

2.5 Tištěné senzory

Nejčastěji se vyskytují tříelektrodové, tj. složené z pracovní, referentní a pomocné elektrody. K výhodám tištěných senzorů patří možnost jednoduché přípravy ve velkém množství, což snižuje náklady na výrobu. Jsou připravovány buď přímo v laboratořích, nebo je dnes již široká škála komerčně dostupných. Jelikož se jedná o jednorázové senzory, odpadá problém spojený s kontaminací povrchu pracovní elektrody biologickým materiálem nebo reagensy z předchozích měření [85, 86].

Senzory jsou vyráběny tištěním inkoustů na různé povrchy, jako je například keramika, plast nebo papír. Vyrábí se v různých velikostech, tvarech a uspořádání (Obrázek 12). Výběr inkoustu ovlivňuje parametry analýzy pro stanovení analytu. Pracovní elektrody jsou tvořené

zejména z uhlíku nebo inertního kovu (platina, zlato). Volba vhodného materiálu elektrod má vliv na citlivost, a je zásadní z hlediska použité metody a konfigurace imunosenzoru, na který má vliv také použitá značka protilátky [85, 86].



Obrázek 12 Příklad komerčně dostupného tištěného senzoru od firmy Methrohm, převzato a upraveno z: [72]

Tištěné senzory jsou dnes komerčně dostupné v celé řadě modifikací povrchu pracovní elektrody. Modifikovat lze příkladem přidáním uhlíkových nanomateriálů (uhlíkové nanotříbky, grafen) nebo metalických nanočástic (Au a Ag nanočástice) a magnetických částic. Modifikace senzoru má za cíl zlepšit parametry analýzy. Pro rychlejší přenos elektronů nebo zvětšení specifického povrchu elektrody lze povrch modifikovat biologickou vrstvou nebo mediátorem. Dále lze aplikovat vrstvu vyloučeného kovu (rtuťový, bizmutový, zlatý film nebo měděný film apod.) (Tabulka 1). Tyto modifikace podporují vlastní detekci a zvyšují citlivost výsledného biosenzoru [85, 86].

Tabulka 1 Přehled dostupných komerčně vyráběných tištěných senzorů s možnými modifikacemi povrchu pracovní elektrody (zdroj <https://www.palmsens.com/> a <http://www.dropsens.com/>)

Výrobce	Země	Modifikace povrchu pracovní elektrody
BVT Technologies	ČR	enzymy (AChE, GOx)
Gwent	Anglie	bismutový film
ItalSens	Nizozemsko	rtuťový film
Metrohm	Švýcarsko	Bi ₂ O ₃ , NiO streptavidin polyanilin CdSe kvantové tečky

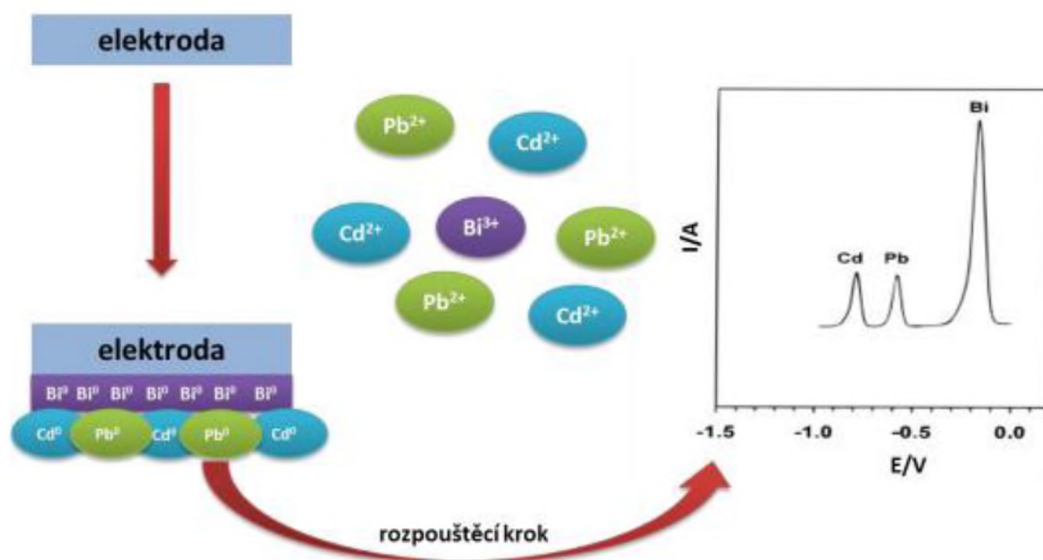
2.5.1 Modifikace elektrod bismutovým filmem

Mezi často používané modifikace elektrod se řadí rtuťový film pro svoje velmi citlivé stanovení kovových iontů pomocí anodické rozpouštěcí volumetrie. V posledních letech je však diskutována potenciální toxicita kovové rtuti a jejich solí. Vzhledem k její toxicitě a respektu k životnímu prostředí byla vyhledána alternativa rtuti s podobnými vlastnosti. Wang a kol.(2000) využili modifikaci elektrod bismutovým filmem [108].

Bismutové elektrody jsou využívány ve spojení s anodickou rozpouštěcí voltametrií (ASV), adsorptivní (katodickou) rozpouštěcí voltametrií (AdSV) nebo rozpouštěcí potenciometrií. Kromě bismutových elektrod lze vytvořit bismutový film na povrchu elektrod pomocí galvanického pokovení. Bismut snadno vytváří slitiny s olovem, kadmíem, zinkem, thaliem nebo indiem, představuje tak alternativu ke rtuťovým elektrodám [108, 109].

Výhodou elektrod s bismutovým filmem je inertnost k atmosférickému kyslíku a poskytování piků s vyšším rozlišením. Nevýhodou je, že bismut patří k méně ušlechtilým kovům. Díky tomu lze pomocí elektrod s bismutovým filmem stanovit jen omezené množství iontů [109, 110].

Metody přípravy bizmutového filmu jsou „*in situ*“ a „*ex situ*“ na vodivém materiálu (pastová elektroda nebo uhlíkový inkoust). U přípravy bizmutového filmu „*in situ*“ se jedná o vyloučení filmu přímo ze stanovovaného roztoku přidavkem Bi^{3+} (Obrázek 13). Tvorba filmu je zajištěna depozicí při rozpouštěcí analýze při dostatečně negativním potenciálu, při kterém je zajištěna i redukce analyzovaných iontů. Takto připravený film slouží pouze k jednorázovému stanovení, protože dochází při rozpouštění k jeho odstranění z elektrodového povrchu [108, 110].



Obrázek 13 Schéma rozpouštěcí voltametrie těžkých kovů s elektrodou s bizmutovým filmem připraveným *in situ*; převzato a upraveno a upraveno z: [110]

Metoda „*ex situ*“ je založena na galvanické aplikaci bizmutového filmu na elektrodový materiál a následném ponoření do měřeného roztoku. Tato metoda probíhá v kyselém prostředí, protože při vyšším pH podléhá bizmut hydrolyze. Tento způsob se využívá, pokud není možná příprava „*in situ*“ filmu [109, 110].

2.6 Příklady imunosenzorů pro stanovení bakterií

Silva a kol. (2019) využili jednorázový papírový potenciometrický imunosenzor pro detekci *Salmonella* Typhimurium. Papírová proužková elektroda byla použita pro imobilizaci protilátek a pro vzorkování. Byl zde uchycen polyamidoaminový dendrimer a pro posouzení účinnosti imunosenzoru byla použita elektrochemická impedanční spektroskopie. Systém byl schopen detekovat 5 buněk/mL [135].

Leva-bueno a kol. (2020) využili impedimetrický imunosenzor pro detekci *E. coli* O157:H7. K detekci bylo použito IDAM. Protilátky proti *E. coli* byly konjugované na magnetických nanočásticích pomocí biotin-streptavidinové vazby. Ke stanovení byla využita impedimetrická detekce. Systém byl schopen detekovat koncentrace až $1,2 \times 10^3$ CFU/ml ve vzorcích mletého hovězího masa a $1,6 \times 10^2$ CFU/ml z čisté kultury. Dále je zde využita elektroda s redukováným grafenoxidovým papírem (rGOP) modifikovaná zlatými nanočásticemi pro detekci *E. coli* O157:H7 v okurkách a mletém hovězím mase. Ve studii se dále zabývají imunosenzory pro detekci *S. Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* a *Staphylococcus aureus* [136].

Jampasa a kol. (2019) využili elektrochemický imunosenzor založený na značené monoklonální anti-LipL32 protilátce pro detekci leptospirózy. Senzor se skládal ze dvou protilátek specifických pro LipL32 (neznačené primární protilátky pro záchyt a sekundární značené zlatem pro elektrochemickou detekci). Protilátka byla imobilizována na tištěnou grafitovou elektrodu (SPGE). Pro detekci byla použita diferenciální pulzní voltametrie (DPV). Linearita mezi koncentrací LipL32 a měřeným proudem byla v rozmezí 1-100 ng/ml [137].

Silva a kol. (2020) využili elektrochemický imunosenzor pro detekci *Listeria monocytogenes*. Pro senzor byla použita monoklonální a polyklonální protilátka, která rozpoznávala protein p60 *Listerie monocytogenes*. Proteiny p60 byly použity jako sendvičové imunopáry. Reakce byla detekována pomocí sekundární značené protilátky konjugovanou alkalickou fosfatázou za použití směsi 3-indoxylfosfát/ ionty stříbra. Signál byl detekován voltametrickým stripováním enzymaticky deponovaného stříbra. Imunosenzor dosáhl limitu detekce a kvantifikace 1,5 ng/mL [138].

Bu a kol. (2019) využili imunoanalýzu za použití nanočástic platiny a ručního vodíkového detektoru pro detekci *E. coli* O157:H7. Využití nanočástic platiny jako vysoce účinného katalyzátoru pro hydrolyzu komplexu amoniak-boran za vzniku plynného vodíku. Magnetické kuličky zde oddělovaly sendvičové struktury. Generovaný vodík byl detekován pomocí elektrochemické metody. Detekční limit byl 10 CFU/ml [139].

Wang a kol. (2020) využili homogenní imunosenzor na bázi magnetických perliček pro detekci *E. coli* O157:H7. Homogenní elektrochemický impedanční systém byl na bázi korálků využívajících interdigitované zlaté elektrody. Detekční limit byl 10^2 CFU/ml [141].

Cai a kol. (2019) využily mikrofluidní imunosenzor pro detekci *Salmonella* Typhimurium pomocí imunomagnetické separace. Magnetické nanočástice byly modifikovány monoklonálními protilátkami proti *Salmonella*. Následoval záchyt bakterií a konjugace s polystyrenovými mikrokuličkami modifikovanými polyklonálními protilátkami a kataláza za vytvoření sendviče (MNP-bakterie-Polysteryn-kataláza). Kataláza na koplexech katalyzuje rozklad peroxidu vodíku za vzniku kyslíku. Generovaný kyslíkový plyn zvyšuje tlak v čipu a tlačí indikační roztok červeného barviva, aby se pohyboval podél kanálku k neuzavřenému výstupu. Měříme vzdálenost červeného barviva. Senzor detekuje 150 CFU/ml [142].

Luna-Moreno a kol. (2019) využili k detekci *Pseudocercospora fijiensis* metodu SRP. Pro imunosenzor byla využita polyklonální protilátka (anti-HF1), která byla imobilizována na zlatem potaženém čipu pomocí monovrstvy alkanethiolů. Limit detekce byl 11,7 $\mu\text{g/ml}$ [143].

Dehghani a kol. (2020) využili nový fluorescenční imunosenzor s využitím oxidu grafenu a kvantové tečky grafenu pro detekci *Campylobacter jejuni* ve vzorcích drůběžích jater. Byl sestaven na základě interakce polyklonální protilátky konjugované s grafenovou kvantovou tečkou. Mez detekce byla 10 CFU/ml [145].

Che a kol. (2001) využili enzymatický imunotest spojený s enzymovou elektrodou modifikovanou tyrosinázou pro detekci *Campylobacter jejuni*. Pro izolaci buněk byla využita imunomagnetická separace (IMS). Detekční limit byl $2,1 \times 10^4$ CFU/ml [140].

Masdor a kol. (2016) využili imunosenzor pro detekci potravinového patogenu *Campylobacter jejuni* s využitím sensorové platformy z křemenné krystalové mikrobance (QCM). Pro záchyt bakterií byly využity polyklonální králičí protilátky a pro detekci zlaté nanočástice. Senzor detekoval 150 CFU/ml [144].

Sapsford a kol. (2004) využili sendvičový imunotest pro detekci druhů *Campylobacter* a *Shigella*. Limit detekce pro *Shigella dysenteriae* byl $4,9 \times 10^4$ CFU/ml a pro *Campylobacter jejuni* byl $9,7 \times 10^2$ CFU/ml [148].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Vortex (Grant-bio, Cambrige, Velká Británie)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Magnetický separátor Dynal – MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- Rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Potenciostat EmStat Blue a MultiEmStat4 + software PSTrace (PalmSens, Houten, Nizozemí)
- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou (C/C/Ag/AgCl, OHT-000, Orion High Technology, Madrid, Španělsko)
- Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc™ XRS+ System s ImageLab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Automatické mikropipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrozkuřavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrostříkačka (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)
- Zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Aparatura Dot-blot (SciePlast Ltd., Cambridge, Velká Británie)
- Immum-Blot™ PVDF membrána (0,2 μm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Membránová vývěva N022AN (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Německo)
- Odsolovací kolonky AMICON Ultra-0,5 ml, 100 K (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts)

- Dot-Blot DHM 96 unit (Scie-plas, Cambrige, Anglie) – 96 dots, 3 mm průměr
- Termoblok Grand Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- Skleněné zkumavky a jednorázové plastové pomůcky (L-hokejky, očkovací Petriho misky) (VWR International s.r.o.)
- Termostat ST 5.PO1-EKO, (Polsko)
- Sterimat 5104.2 (BMT Medical technology s.r.o., Česká republika)
- Parní sterilizátor - Sterilab® (BMT Medical technology s.r.o., Česká republika)
- Laminární box (Trigon-plus s.r.o., Česká republika)
- Denzitometr McFarland (Biosan Ltd., Riga, Lotyšsko)
- Třepačka vortex typ V-1 plus (Biosan Ltd., Riga, Lotyšsko)
- Skenovací elektronový mikroskop (SEM) JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko)
- Skenovací elektronový mikroskop (SEM) TESCAN VEGA3 SBU, vybavený EDX sondou Bruker XFlash Detector 410-M (TESCAN, a.s., ČR)

3.2 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Použité chemikálie:

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina chlorovodíková, HCl (Penta, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Brno, Česká republika)
- N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin, TEMED (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™, standards: 10-250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Glutaraldehyd 50 % roztok (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Vzorkový roztok Laemmli Sample Buffer, roztok G (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Roztok A: 30 % směs akrylamidu a bisakrylamidu
- Roztok B: 1,5M Tris-HCl pufr pH 8,8
- Roztok C: 1,0M Tris-HCl pufr pH 6,8
- Roztok D: 10 % roztok SDS
- Roztok E: 10 % roztok persíranu amonného (100 mg/ml) - (byl připraven čerstvý)
- Roztok G: 100mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4 % SDS, 20 % glycerolem a 0,2 % bromfenolovou modří
- Elektrodový pufr: 0,025M Tris, 0,192M glycin s 0,1 % SDS pH 8,3 – 8,6

Postup:

Nejprve byla sestavena aparatura. Skla byla vyčištěna destilovanou vodou a lihem a poté byla upevněna do stojánku. 10 % dělicí gel byl připraven smícháním destilované vody, roztoků A, B, D, TEMED a E podle tabulky 2. Dělicí gel byl nadávkován mezi skla, převrstven vodou, aby nedošlo k vyschnutí gelu. Během 20-30 minut došlo k polymeraci. Po polymeraci dělicího gelu byla filtračním papírem odsáta destilovaná voda. Následně byl připraven 5 %

zaostřovací gel smícháním destilované vody, roztoků A, C, D, TEMED a E podle tabulky 2. Zaostřovací gel byl nadávkován mezi skla a byla do něho vložena šablona pro vytvoření 10-ti nebo 15-ti jamek. Gel během 15 minut zpolymeroval. Po polymeraci zaostřovacího gelu byla vyjmuta šablona a jamky byly propláchnuty elektrodoým pufrem.

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

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

Připravený gel byl vyjmut ze stojánku a přemístěn do držáku a elektroforetické vany. Skla byla umístěna tak, aby kratší sklo mířilo do středu držáku. Do elektroforetické vany byl nalit elektrodoý pufř po rysku a do prostoru mezi skla tak, aby byly jamky převrstveny elektrodoým pufrem.

Vzorky byly připraveny pro analýzu smíchání se vzorkovým roztokem G v poměru 1:1 (v/v; 10 μ l). Takto připravené vzorky byly inkubovány 3 minuty při teplotě 100°C v termobloku. Do jamek bylo dávkováno vždy 15 μ l vzorku pomocí Hamiltonovy stříkačky. Do jedné jamky byl nadávkován standard molekulových hmotností v objemu 3 μ l.

Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 180 V a proudu 30 mA na jeden gel. Elektroforetické dělení probíhalo přibližně 45 minut, dokud bromfenolová modř vzorkového roztoku nedoputuje k téměř dolnímu okraji skel. Po ukončení separace byly gely přeneseny do Petriho misek, propláchnuty destilovanou vodou a obarveny.

3.2.1 Barvení gelů roztokem amoniakálního stříbra

Použité chemikálie:

- Kyselina octová 99 % (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Ethanol C₂H₆O 96 % (Lachner, Neratovice, ČR)
- Glutaraldehyd 50 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dusičnan stříbrný, AgNO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid amonný, NH₄OH 25 % (Merck, Darmstadt, Německo)
- Hydroxid sodný, NaOH (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Formaldehyd 38 % (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina citrónová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Amoniak, NH₃ 26 – 29 % (Penta, Chrudim, Česká republika)

Použité roztoky:

- Fixační roztok: 5 % kyselina octová + 50 % etanol
- 10 % roztok glutaraldehydu
- Vyvolávací roztok: 0,05 % kyselina citrónová + 0,04 % formaldehyd
- Ustalovací roztok: 5 % kyselina octová
- 9 M NaOH
- 20 % roztok AgNO₃
- Roztok amoniakálního stříbra: 20 % roztok AgNO₃ byl přikapáván k roztoku (10,5 ml destilované vody + 0,7 ml NH₃ + 119,5 μl) až do béžového zákalu. Po vytitrování byl roztok doplněn na objem 50 ml

Postup:

Po elektroforetickém dělení byl gel 2x propláchnut destilovanou vodou a fixován přes noc při 4°C ve fixačním roztoku nebo 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po fixaci byl gel rehydratován v destilované vodě 30 minut při laboratorní teplotě. Dále byl gel inkubován 30 minut v roztoku 10 % glutaraldehydu při laboratorní teplotě. Následně byl gel promyt 6x destilovanou vodou po 10 minutách. Po promytí destilovanou vodou byl gel inkubován 15 minut v roztoku amoniakálního stříbra, který byl připraven těsně před použitím. Po inkubaci byl gel promyt destilovanou vodou a vyvolán ve vyvolávacím roztoku. Po vyvolání byl gel přenesen do ustalovacího roztoku, ve kterém byl skladován i několik hodin.

3.3 Dot-Blot analýza

Použité chemikálie:

- Hovězí sérový albumin (albumin from bovine serum, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Testované protilátky:
 - polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
 - monoklonální myší anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 0,2 mg/ml, Thermo Scientific, USA)
 - sekundární protilátky (konjugát) značené křenovou peroxidázou (anti-myší IgG-HRP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kit pro kolorimetrickou detekci - barvení pomocí chlornaftolu (Opti-4CN™ kit (BioRad, USA), Opti-4CN™ Diluent (10,8 ml redestilované vody + 1,2 ml činidla), Opti-4CN™ Substrate (240 µl/12 ml))
- Suspenze 0,6 McFarlandovy zákalové stupnice bakterie *Campylobacter jejuni* CCM6214v pufru PBS
- Suspenze 0,6 McFarlandovy zákalové stupnice bakterie *Campylobacter coli* CCM6211 v pufru PBS

Použité roztoky:

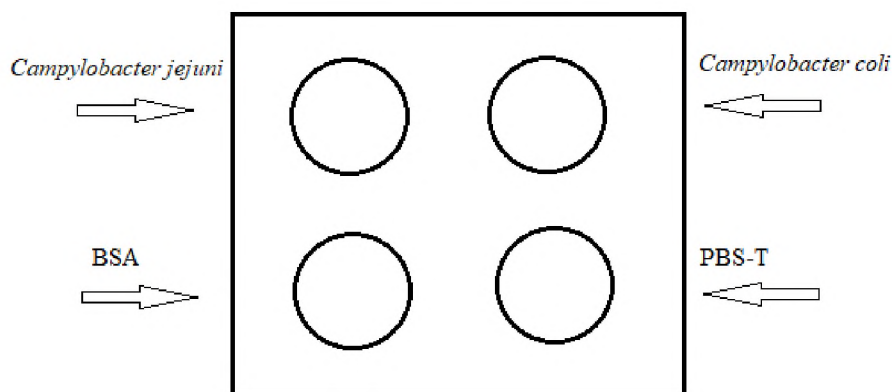
- Ekvilibrační a promývací roztok: PBS-T (0,1 M PBS pH 7,4 s 0,05 % Tween 20)
- Blokovací roztok: 5 % BSA v PBS-T
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25 % BSA v PBS-T
- Roztok pro ředění sekundární značené protilátky: PBS-T
- Negativní kontroly: 3 µg BSA/100 µl PBS-T pufru
10 mM fosfátový pufr pH 7,3 (100 µl)

Použitá membrána a zařízení:

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

Postup:

Membrána byla nejprve smočena ve 100 % metanolu po dobu přibližně 1 minuty. Následně byla umístěna do aparatury, která byla připojena na vakuum. Membrána byla ekvilibrována promytím jamek 100 μ l PBS-T pufrem. Po promytí bylo dávkováno 100 μ l vzorku buněčného lyzátu (3 μ l + 97 μ l PBS pufre) a negativních kontrol podle schéma uvedeného na obr. 16. Po nanesení vzorku následovalo opět promytí jamek 100 μ l PBS-T. Membrána byla vyjmuta z aparatury a po uschnutí rozstříhána na čtverce (obrázek 14), které byly přeneseny do dělené Petriho misky. Následovala hodinová inkubace v blokovacím roztoku (1ml/jamku) na třepačce při laboratorní teplotě. Po blokaci následovalo promytí PBS-T pufrem (3x 1 ml). Následovala inkubace s roztokem testovaných protilátek (ředění 1:1000) 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta PBS-T pufrem 3x rychle a 3x s 5 minutovou inkubací (vždy 1 ml). Následně byl přidán roztok sekundárních protilátek (ředění 1:1000) a membrána byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepačce. Po promytí (3x rychle a 3x s 5 minutovou inkubací, vždy 1 ml) PBS-T pufrem byl přidán substrátový roztok a po 30 minutách byla reakce ukončena převedením membrány do destilované vody.



Obrázek 14 Schéma pipetování vzorků testovaných protilátek a kontrol na membránu

3.4 Imobilizace protilátek na magnetické částice neorientovanou vazbou

Použité chemikálie:

- Magnetické částice:
 - ProMag – COOH (0,746 μm , ProMag, Warrington, PA, USA)
 - Chemical – COOH (1 μm , Chemicell, Německo)
 - Dynabeads – COOH (2,8 μm , Invitrogen, Norsko)
 - HEMA - COOH (4,4 μm , ÚMCH AV ČR, ČR)
 - Makroporézní perlová celulóza (80-100 μm , Iontosort, ČR)
- Polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- 2-(N-Morfolino)ethansulfonová kyselina ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$, MES) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- Sodná sůl N-hydroxysulfosuccinimidu (Sulfo-NHS, $\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- 0,1 M MES pufr pH 5,0
- 0,1 M PBS pufr pH 7,4

Postup:

Pro imobilizaci protilátek byl použit 1mg magnetických částic. Částice byly 4x promyty 0,1 M MES pufr (1 ml) za pomoci magnetického separátoru. Poté byl přidán roztok EDC (7,5 mg/300 μl MES pufru) a sulfo-NHS (1,25 mg/300 μl MES pufru). Objem byl doplněn na 1ml MES pufr a probíhala inkubace 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly částice promyty 2x 1 ml 0,1 M MES pufr a byly přidány protilátky (40 μg v 1 ml 0,1 M MES pufru). Probíhala inkubace při 4°C na rotátoru přes noc.

Po inkubaci byly částice s imobilizovanými protilátkami promyty 2x 0,1 M MES pufr, 2x 0,1 M PBS pufr a 2x 0,1 M MES pufr (vždy 1 ml).

Ze vzorku protilátek před imobilizací, po imobilizaci a z promývacích frakcí bylo odebráno 10 μl pro ověření účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE.

3.5 Imobilizace protilátek na magnetické částice orientovanou vazbou

Použité chemikálie:

- Magnetické částice:
 - Chemicel - hydrazid (1 μm , Chemicell, Německo)
 - Dynabeads - amin (2,8 μm , Invitrogen, Norsko)
 - HEMA - hydrazid (4 μm , ÚMCH AV ČR, ČR)
 - Makroporézní perlová celulóza (80-100 μm , Iontosorb, ČR)
- Polyklonální králičí anti-*Campylobacter jejuni* protilátky (IgG, koncentrace 4 mg/ml, BioRad, USA)
- Amicon ultracentrifugační odsolovací kolonky, 100K (Merck Milipore, Massachusetts)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- 0,02 M NaIO₄

Postup:

Pro imobilizaci protilátek metodou orientované vazby byla nejprve oxidována sacharidová část IgG jodistanem sodným za vzniku reaktivních aldehydových skupin. Bylo použito 40 μg protilátek (10 μl ze zásobního roztoku) a byl přidán 0,02 M NaIO₄ (celkový objem 250 μl , 0,02 M NaIO₄ v celkovém reakčním objemu). Protilátky byly inkubovány 30 minut na rotátoru ve tmě. Po oxidaci protilátek byla oxidace zastavena přidavkem 1,5 μl ethylenglykolu. Aktivované protilátky byly odsoleny na Amicon 100K filtrech podle postupu uvedeného výrobcem. Nejprve byl dávkován celý objem na filtr a proběhla centrifugace 10 minut při 13000 rpm. Po centrifugaci byl filtr otočen a umístěn do čisté mikrokumavky. Následovala centrifugace 2 minuty při 3500 rpm. Během inkubace protilátek byl 1 mg magnetických částic promyt 5x 0,1 M fosfátovým pufrem za pomoci magnetického separátoru. Po odsolení byl objem protilátek (cca 15 μl) doplněn na 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7,3 a roztok byl přidán k promytým magnetickým částicím. Imobilizace probíhala při 4°C přes noc na rotátoru.

Po inkubaci byly částice s imobilizovanými protilátkami promyty 3x 0,1 M fosfátovým pufrem, 2x 0,1 M fosfátovým pufrem s 1 M NaCl a 4x 0,1 M fosfátovým pufrem.

Z roztoku protilátek před imobilizací, po imobilizaci a z promývacích frakcí bylo odebráno 10 µl pro ověření účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE.

3.6 Příprava Columbia agaru a fyziologického roztoku

Použité chemikálie:

- Columbia agar- Columbia blood agar base (HiMedia, Indie)
- Destilovaná voda
- NaCl (Penta, Chrudim, ČR)

Postup:

Živná půda byla připravena v souladu s ČSN ISO 10272-1, -2 [30] a Českým lékopisem (půda Q). Půda byla vybrána tak, aby vyhovovala danému mikroorganismu. Bylo odváženo 44 g dehydrovaného přípravku Columbia blood agar base, která byla přidána do 1000 ml destilované vody a byla zahřívána do úplného rozpuštění. Sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a schladnutí média na 45°C bylo asepticky přidáno 50 ml sterilní defibrinované koňské krve. Pak byla takto připravená suspenze nalita do Petriho misek. Po utuhnutí a vychladnutí byly Petriho misky s nalitou půdou skladovány v chladničce při $(5 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C})$ v zavěšené poloze.

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl do 1000 ml. Následně byl roztok sterilizován v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Byl skladován v ledničce.

3.7 Záchyt a vyočkování *Campylobacter jejuni*

Ověření funkčnosti imunosorbentu pomocí záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni*

Použité chemikálie:

- Imunosorbent - magnetické částice s protilátkami (100 μ l suspenze o koncentraci 1 mg/ml)
- Suspenze bakterií: 0,6 a 1,5 McFarlanda odpovídající $1,5 \times 10^8$ buněk/ml
- Columbia agar - Columbia blood agar base (HiMedia, Indie)

Použité roztoky:

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

Postup:

Ze 48 hodinové kultury *Campylobacter jejuni* byl připraven zákal o 0,6 nebo 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice. Následně pomocí desítkového ředění byla připravena řada od 10^8 – 10^0 CFU/ml. Pro izolaci buněk bylo využito koncentrační rozmezí 10^4 – 10^0 CFU/ml. Pro každou koncentraci buněčné suspenze bylo použito 100 μ g imunosorbentu připraveného podle postupu v kapitole (3.3 nebo 3.4). Imunosorbent byl nejprve 3x promyt 0,5 ml PBS-T pufru pomocí magnetického separátoru. Po posledním promytí byl přidán 1 ml buněčné suspenze a následovala inkubace 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky umístěny do magnetického separátoru a byla odebrána vazebná frakce (2). Následně byly částice 2x promyty 1 ml PBS-T pufrům a promývací frakce byly vždy odebrány (3, 4). Poté byly částice ještě 2x promyty 1 ml PBS-T pufru, ale frakce již nebyly odebrány. K takto promytým částicím bylo přidáno 100 μ l PBS-T pufru (1). Frakce 1 – 4 byly vyočkovány na Petriho misky s Columbia agarem podle tabulky 3, 4 a 5.

Tabulka 3 Frakce pro vyočkování *Campylobacter jejuni*

Suspenze 10^0 a 10^1 CFU/ml			
Frakce	Ředění	Počet misek	Objem inokula (μ l)
1 (částice)	bez	2	100
2 (VF)	bez	2	100
3 (Promytí I.)	bez	2	100
4 (Promytí II.)	bez	2	100

Tabulka 4 Frakce pro vyočkování *Campylobacter jejuni*

Suspenze 10^2 a 10^3 CFU/ml			
Frakce	Ředění	Počet misek	Objem inokula (μ l)
1 (částice)	50 μ l frakce + 50 μ l PBS-T	2	100
2 (VF)	50 μ l frakce + 50 μ l PBS-T	2	100
3 (Promytí I.)	50 μ l frakce + 50 μ l PBS-T	2	100
4 (Promytí II.)	bez	2	100

Tabulka 5 Frakce pro vyočkování *Campylobacter jejuni*

Suspenze 10^4 CFU/ml			
Frakce	Ředění	Počet misek	Objem inokula (μ l)
1 (částice)	25 μ l frakce + 75 μ l PBS-T	2	100
2 (VF)	25 μ l frakce + 75 μ l PBS-T	2	100
3 (Promytí I.)	25 μ l frakce + 75 μ l PBS-T	2	100
4 (Promytí II.)	50 μ l frakce + 50 μ l PBS-T	2	100

Pro ověření denzity bylo vyočkováno koncentrační rozmezí 10^2 – 10^4 CFU/ml původní suspenze. Z těchto ředění bylo odebráno 100 μ l a bylo vyočkováno na Columbia agar v dubletu, kultivace 48 hodin při 41,5°C, mikroaerofilně.

3.8 Příprava vzorků s bakteriemi na SEM

Použité chemikálie:

- Magnetické částice s imobilizovanými protilátkami a zachycenými bakteriemi

Použité roztoky:

- Magnetické částice s 0,1 M PBS pufr pH 7,4
- 2,5 % glutaraldehyd
- Ethanol (30 %, 50 %, 70 %, 80 % a 100 %)

Postup:

Ze 48 hodinové kultury *Campylobacter jejuni* byl připraven zákal o 0,6 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice. Odebrané magnetické částice (100 µg) byly 3x promyty 0,5 ml PBS pufru za pomoci magnetického separátoru. Po promytí byl přidán 1 ml buněčné suspenze a následovala inkubace 1 hodinu na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla suspenze magnetických částic s navázanými bakteriemi nanese na terčík, pod který byl přiložen magnet, aby částice byly stále přitahovány k magnetu. Následně byly částice s bakteriemi fixovány 2,5 % glutaraldehydem v PBS pufru po dobu 1 hodiny (Obrázek 15). Po fixaci byly částice promyty PBS puforem a následovala postupná dehydratace po 10 minutách 30 % - 50 % - 70 % - 80 % - 100 % ethanolem. Takto připravené terčíky byly vysušeny přes noc při laboratorní teplotě. Po vysušení byly terčíky napřášený tenkou vrstvou zlata za pomoci zvodnění povrchu vzorku. Po pozlacení vzorku byl analyzován skenovacím elektronovým mikroskopem JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko) a TESCAN VEGA3 SBU (TESCAN, a.s., ČR).



Obrázek 15 Příprava terčíků na SEM, foto autor

3.9 Značení protilátek kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi

Použité chemikálie:

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

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- 0,02 M NaIO₄

Postup:

Pro imobilizaci protilátek byla použita metoda orientované vazby po oxidaci protilátek jodistanem sodným. Před vlastní imobilizací protilátek byly silika nanočástice modifikovány kvantovými tečkami pomocí karbodiimidové metody [88].

Ze zásobního roztoku silika nanočástic (30 mg/2 ml redestilované vody) byly pro značení protilátek odebrány 3 mg nanočástic. Nanočástice byly 5x promyty 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrem. K separaci nanočástic byla použita centrifugace při 5000 rpm, 5 minut. Po promytí bylo přidáno 0,5 mg EDC ve 300 μ l pufru a 50 μ l CdTe QDs (3 μ l PbS QDs) a objem byl doplněn na 1 ml fosfátovým pufrem. Následovala inkubace na rotátoru 1 hodinu při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci byly nanočástice s navázanými QDS promyty 3x 0,1M fosfátovým pufrem, 1x 0,1 M fosfátovým pufrem s 1 M NaCl a 2x 0,1 M fosfátovým pufrem.

K promytným modifikovaným nanočásticím byly přidány protilátky, které byly nejprve oxidovány podle následujícího postupu. 20 μ g protilátek bylo pipetováno do 0,02 M NaIO₄, celkový objem byl 250 μ l. Po inkubaci 30 minut na rotátoru ve tmě při laboratorní teplotě byla oxidace zastavena přidáním 1,5 μ l ethylenglykolu. Oxidované protilátky byly odsoleny na Amicon 100K filtrech podle postupu výrobce. Nejprve byl dávkován celý objem na filtr a centrifugace na 10 minut při 13000 rpm. Po centrifugaci byl filtr otočen a umístěn do čisté mikrozkuřavky. Následovala centrifugace na 2 minuty při 3500 rpm. Po centrifugaci byl

roztok protilátek doplněn na objem 1 ml a byly přidány k nanočásticím modifikovaným kvantovými tečkami (SiNPs-CdTe QDs, SiNPs-PbS QDs). Proběhla inkubace přes noc při 4°C ve tmě. Po inkubaci byla odebrána vazebná frakce a částice byly promyty 3x 0,1 M PB pufrem a promývací frakce byly odebrány. Celkový objem značených protilátek (anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-CdTe QDs}, anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbS QDs}) byl doplněn na 400 µl. Odebrané frakce původního vzorku protilátek před imobilizací, po imobilizaci a promývacích frakcí byly použity na analýzu pomocí SDS-PAGE.

3.10 Sestavení imunokomplexu pro detekci *Campylobacter jejuni*

Použité chemikálie:

- Imunosorbent-magnetické částice s imobilizovanými primárními polyklonálními králičími anti-*Campylobacter jejuni* protilátkami (20 µg/ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3)
- Značené polyklonální protilátky anti-*Campylobacter jejuni* (20 µg/3 mg SiNPs-CdTe QDs, SiNPs-PbS QDs)
- Suspenze bakterií *Campylobacter jejuni*: 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice

Použité roztoky:

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

Postup:

Pro sestavení imunokomplexu byla odebírána taková množství imunosorbentu, které podle dosažené účinnosti imobilizace odpovídalo 40 µg protilátek navázaných na 1 mg částicích (143,3 µl, 380 µl, 1000 µl). Imunosorbent byl promyt 6x 1 ml PBS-T pufru. Po promytí byl přidán 1 ml suspenze *Campylobacter jejuni* o příslušném ředění (10^0 , 10^{-1} a 10^{-2}). Současně byla analyzována negativní kontrola, která byla tvořena imunosorbentem, ke kterému byl místo suspenze *Campylobacter jejuni* přidán jen 1 ml PBS-T pufru. Ihned poté byly přidány značené protilátky anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-CdTe QDs} nebo anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbS QDs} v objemu 40 µl, 60 µl nebo 80 µl. Následovala inkubace 1 hodinu na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vytvořený imunokomplex promyt 4x 1 ml PBS-T pufru, 2x 1 ml PBS-T pufru s 0,5 % BSA a 2x 1 ml PBS-T pufru. Následovala analýza pomocí elektrochemické detekce.

3.11 Elektrochemická detekce

Pro analýzu imunokomplexu byly použity tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou C-110 (DropSens, Španělsko). Elektrochemicky byl monitorován signál kovových iontů, které tvoří jádro QDs, které byly využity pro značení protilátek. Ionty kovů byly z QDs uvolněny inkubací vzorku s 0,1 M HCl po dobu 3 minut. Před vlastní aplikací vzorku na elektrodu byl přidán roztok Bi(III) (500 ppb) pro tvorbu „in situ“ bizmutového filmu. Detekční metodou byla rozpouštěcí anodická square wave volumetrie (SWASV).

Použité chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková (HCl) (35 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Bi(III) Standard for AAS(5 mg/l Bi) (Sigma-Aldrich, St. Louis, 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, uhlíkovou pomocnou a argentchloridovou referenční elektrodou (C/C/Ag/AgCl, C110, Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- Potenciostat MultiEmStat3 (PalmSens, Nizozemí)

Postup:

Ke vzorku magnetických částic s vytvořeným imunokomplexem bylo přidáno 90 μ l 0,1 M HCl a následovala 3 minutová inkubace na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly magnetické částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a k supernatantu bylo přidáno 10 μ l roztoku Bi (III). Následně byl supernatant (100 μ l) nanesen na elektrodu. Vlastní měření probíhalo za podmínek uvedených v tabulce 6.

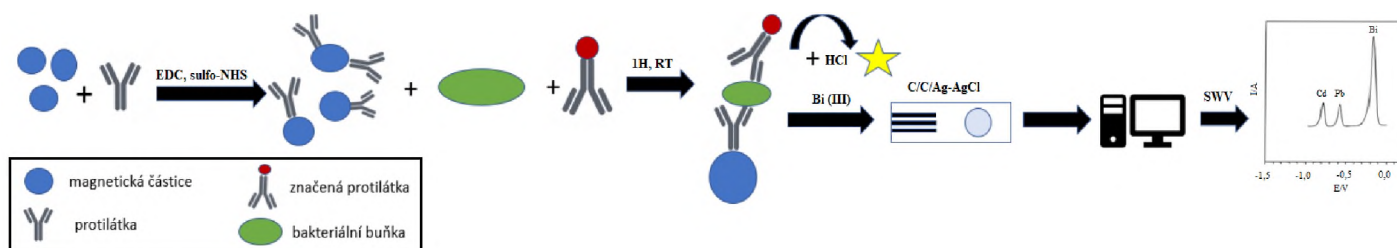
Tabulka 6 Podmínky elektrochemické detekce při použití elektrod C110-Metrohm

SWASV	
t_{eq}	2 s
E_{begin}	-1,0 V
E_{end}	0,0 V
E_{step}	0,003 V
Amplitude	0,02805 V
Frequency	25 Hz

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Diplomová práce byla zaměřena na vývoj imunosenzoru, pomocí něhož by bylo možné detegovat bakteriální buňky *Campylobacter jejuni* ve vzorcích potravin na úrovni celých buněk. Systém detekce je založený na kombinaci imunomagnetické separace a elektrochemické detekce. Základem byla tvorba imunokomplexu mezi bakteriálními buňkami a specifickými protilátkami, které byly navázány na magnetické částice. Současně byly přidány i sekundární značené protilátky, které poskytly výsledný signál. Protilátky byly značené pomocí kvantových teček, konkrétně CdTe QDs nebo PbS QDs. Vytvořený imunokomplex byl detegován elektrochemicky.

V první části experimentální práce bylo nezbytné připravit jednotlivé reakční složky pro sestavení imunokomplexu. Jednalo se o přípravu magnetických nosičů s imobilizovanými specifickými protilátkami proti bakterii *Campylobacter jejuni* a značených protilátek se stejnou specifitou. Pro přípravu značených protilátek bylo využito CdTe nebo PbS kvantových teček (QDs) v kombinaci se silika nanočásticemi (SiNPs). Silika nanočástice a dendrony byly vybrány z důvodu zvýšení proudové odezvy a možnosti větší vazby kvantových teček na jejich povrch. Dále byla ověřena schopnost vázat bakteriální buňky, za pomoci připravených magnetických částic s imobilizovanými protilátkami. Pro ověření schopnosti vazby se použila kultivační metoda. V druhé části experimentální práce byl sestaven celý imunokomplex. Uspořádání celého systému je schematicky znázorněno na Obrázku 16.



Obrázek 16: Schéma jednotlivých kroků sestavení imunosenzoru

Pro elektrochemickou detekci byla využita metoda square wave anodické rozpouštěcí voltametrie (SWASV). Pro analýzu byly využity tištěné elektrody C110 (Metrohm, Švýcarsko) s uhlíkovou pracovní, uhlíkovou pomocnou a argentschloridovou referenční elektrodou (C/C/Ag-Ag-Cl). Pracovní elektroda byla modifikována „*in situ*“ vytvořeným bizmutovým filmem. Práce Murasová a kol. (2020) se zabývala stanovením *Salmonella*

Typhimurium na stejném principu, ale s dendrony, jako naše stanovení *Campylobacter jejuni* [149].

4.1 Výběr protilátek pro vývoj systému pro detekci *Campylobacter jejuni*

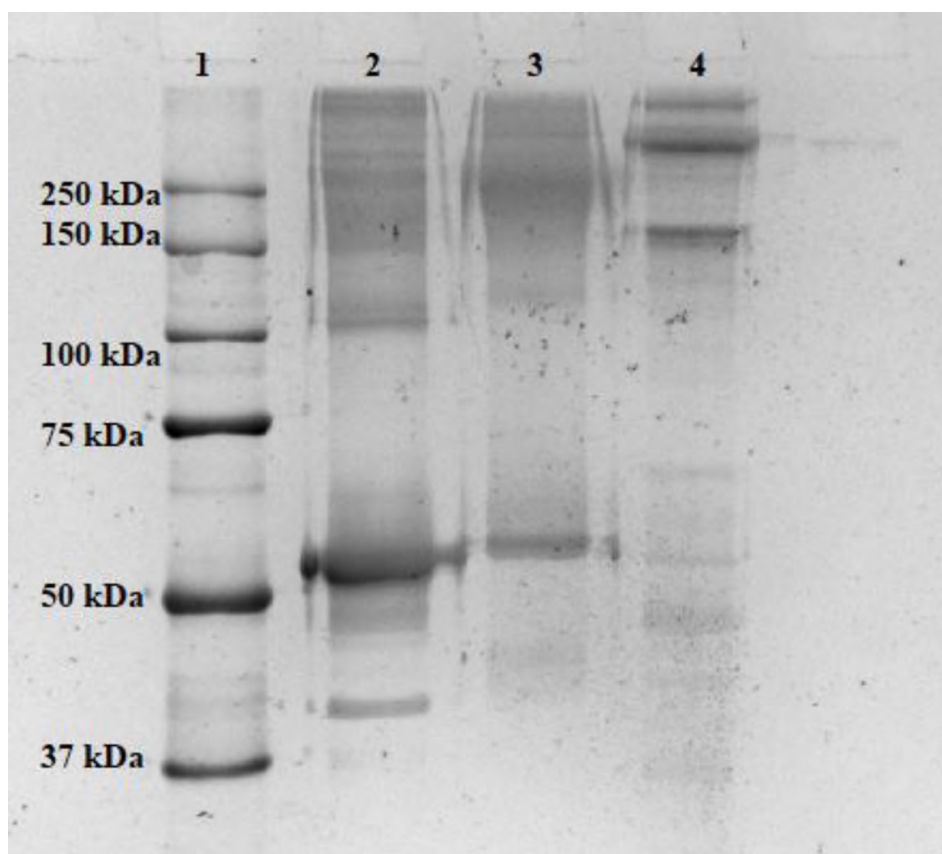
Prvním krokem při vývoji systému byl výběr vhodných protilátek. Byly testovány komerčně dostupné monoklonální a polyklonální protilátky (Tabulka 7).

Tabulka 7 Typy protilátek

Protilátky	Klonalita	Koncentrace	Výrobce	Zdroj	Pozice na obrázku 17
anti-<i>Campylobacter jejuni</i> IgG	Monoklonální	1 mg/ 1 ml	Thermo	myši	2
anti-<i>Campylobacter jejuni</i> IgG	Monoklonální	5,6 mg/ 1 ml	Hytest	myši	3
anti-<i>Campylobacter jejuni</i> IgG	Polyklonální	4 mg/ 1 ml	BioRad	králíčí	4

Byla ověřena kvalita a čistota vybraných protilátek pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) s následným barvením roztokem amoniakálního stříbra. K separaci byl využit 10 % polyakrylamidový gel. K separaci byly do jamek dávkovány protilátky v množství 2 µg/jamku.

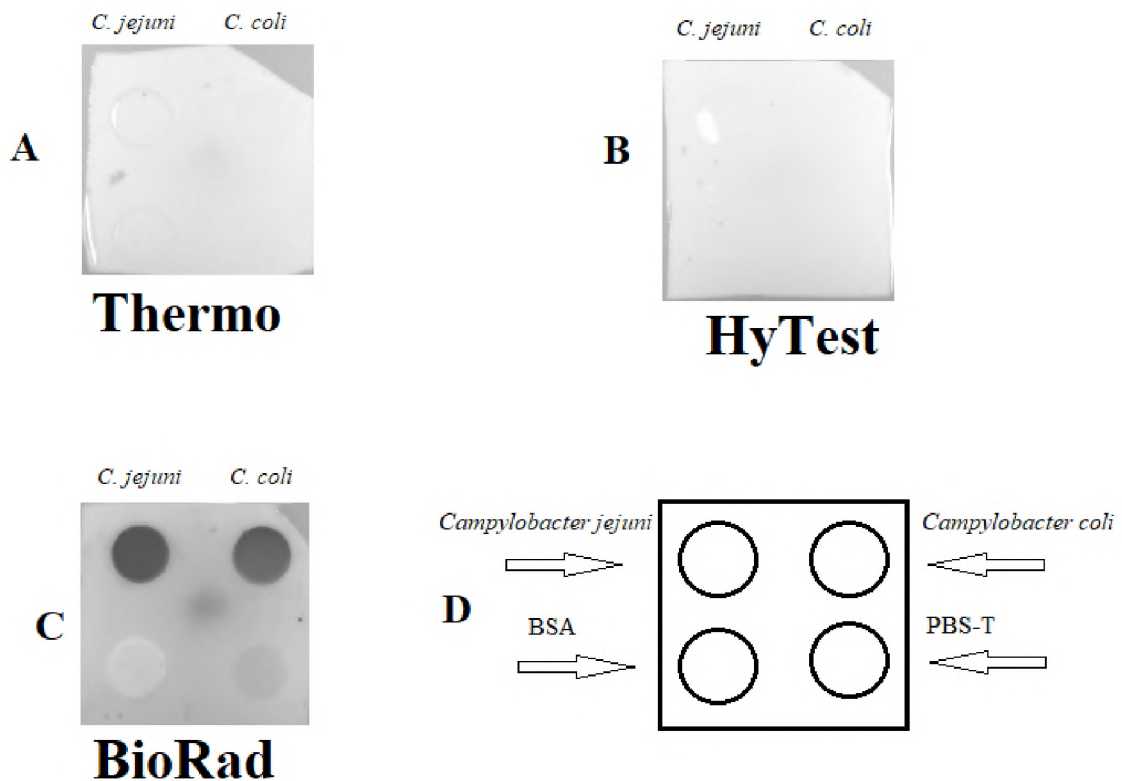
U monoklonálních protilátek anti-*Campylobacter jejuni* od firmy Thermo (pozice 2) a od firmy Hytest (pozice 3) je vidět i proužek odpovídající molekulové hmotnosti těžkých řetězců (50 kDa), což poukazuje na to, že jsou částečně fragmentované a nejsou přítomny pouze celé molekuly IgG. Dále byla provedena Dot-Blot analýza. Tato metoda slouží k potvrzení, zda testované protilátky vykazují afinitu k danému antigenu, tj. zda mohou být využity pro záchyt bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni*.



Obrázek 17 Výsledek SDS-PAGE analýzy pro ověření kvality protilátek. 1- standard molekulových hmotností (10-250 kDa), 2- anti-*Campylobacter jejuni* IgG (monoklonální, Thermo), 3- anti-*Campylobacter jejuni* IgG (monoklonální, Hytest), 4 - anti-*Campylobacter jejuni* IgG (polyklonální, BioRad); 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra, dávkované množství protilátek 2 µg/jamku.

Dot-Blot analýza byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Byly testovány polyklonální i monoklonální protilátky anti-*Campylobacter jejuni* a také anti-*Campylobacter coli*. Bakteriální suspenze buněk 0,6 McFarlandovy zákalové stupnice *Campylobacter jejuni* a vedle toho i *Campylobacter coli*. Současně s testovanými protilátkami byla dávkována i negativní kontrola, která by s testovanými protilátkami neměla reagovat a v případě pozitivní reakce svědčí o nespecifické reaktivitě protilátek. Jako negativní kontrola byl použit hovězí sérový albumin (BSA) jako inetrní protein, a fosfátový pufr jako negativní kontrola reakčního prostředí. Pro vizualizaci byla použita kolorimetrická detekce s použitím komerčního OPTI-4CN™ kitu (BioRad, USA).

Na obrázku 18 u monoklonálních protilátek Thermo a HyTest není viditelný spot, ale u polyklonálních protilátek BioRad jsou viditelné spoty u *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Tím byla potvrzena reaktivita polyklonálních protilátek (BioRad) s bakteriálními buňkami. Dále bylo prokázáno, že ve všech případech jsou výsledky negativních kontrol v pořádku. Na základě výsledků těchto dvou analýz byly pro další experimenty vybrány polyklonální protilátky anti-*Campylobacter jejuni* od firmy BioRad.



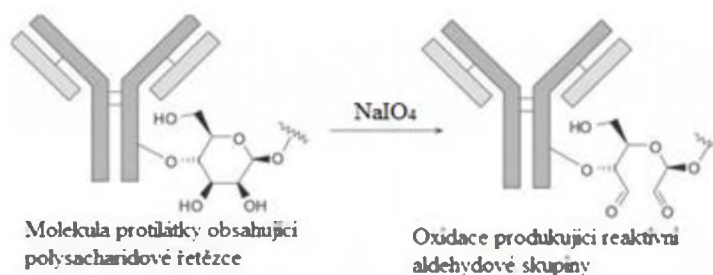
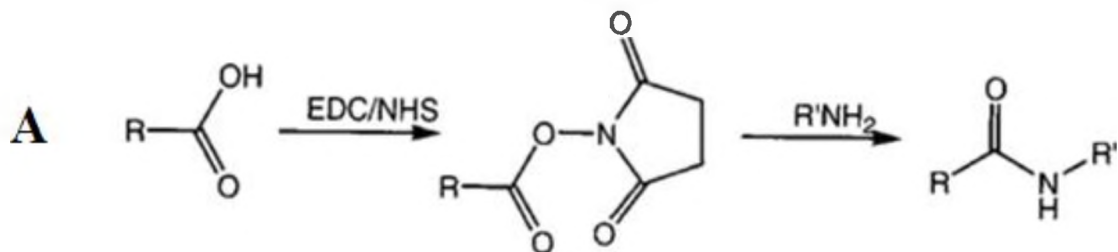
Obrázek 18 Dot-Blot analýza pro ověření afinity testovaných protilátek k danému antigenu za využití *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) a *Campylobacter coli* (*C. coli*); **A** –monoklonální protilátky (ThermoScientific), **B** –monoklonální protilátky (Hytest), **C** –polyklonální protilátky (BioRad), **D** – schéma pipetování vzorků testovaných protilátek a kontrol na membránu; kolorimetická detekce OPTI-4CN™ kit (BioRad, USA)

4.2 Příprava imunosorbentu pro záchyt *Campylobacter jejuni*

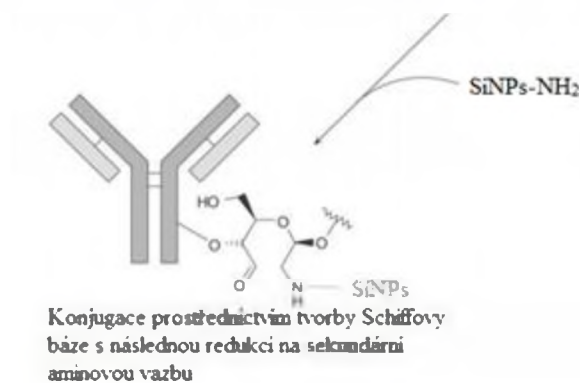
Vybrané protilátky byly imobilizovány na magnetické částice a byl tak připraven imunosorbent, který byl použit pro záchyt bakteriálních buněk ze vzorku. V předešlé diplomové práci, která byla na katedře řešena, byl vyvíjen systém pro detekci *Campylobacter jejuni*. Systém však nebyl funkční tak, jak jsme předpokládali, proto jsme se v této práci více zaměřili na přípravu imunosorbentu, protože je klíčovým krokem pro efektivní záchyt bakteriálních buněk ze vzorku.

Pro přípravu imunosorbentu byly testovány magnetické částice různých velikostí, vyrobené z různých materiálů a lišící se funkčními skupinami. V závislosti na funkčních skupinách byly pro imobilizaci protilátek používány dva optimalizované postupy. Jednalo se o využití dvou způsobů vazby protilátek na magnetické částice. V obou případech se jednalo o kovalentní vazbu, první byla metoda neorientované vazby pomocí karbodiimidové metody druhá metoda orientované vazby po oxidaci sacharidové části molekul protilátek jodistanem sodným [102].

U neorientované vazby se na $-NH_2$ skupiny lehkých i těžkých řetězců protilátek vážou magnetické částice s $-COOH$ skupinami za pomoci přídavku EDC a sulfo-NHS. EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid) je karbodiimid používaný pro aktivaci $-COOH$ skupin před následnou konjugací biologických látek obsahujících aminoskupiny (Obrázek 21). Jedná se o nejčastěji používané síťovací činidlo. Ve vodě rozpustný EDC může být použit v kombinaci s N-hydroxysulfosukcinimidem (NHS nebo sulfo-NHS). Výhodou přídavku sulfo-NHS je zvýšení rozpustnosti, vyšší stability aktivního meziprojektu a vzniku stabilní amidové vazby. Reakce s EDC a sulfo-NHS poskytují vyšší výtěžnost konjugace než při použití samotného EDC [102]. U orientované vazby se nejprve $-OH$ skupiny na těžkém řetězci protilátky zoxidují za pomoci jodistanu sodného (jodistanová metoda) na aldehyd a následně dochází k vazbě s aminoskupinami nebo hydrazidovými skupinami magnetických částic za vzniku amidových vazeb (Obrázek 19).



B



Obrázek 19 A - Karbodiimidová metoda, B – Jodistanová metoda

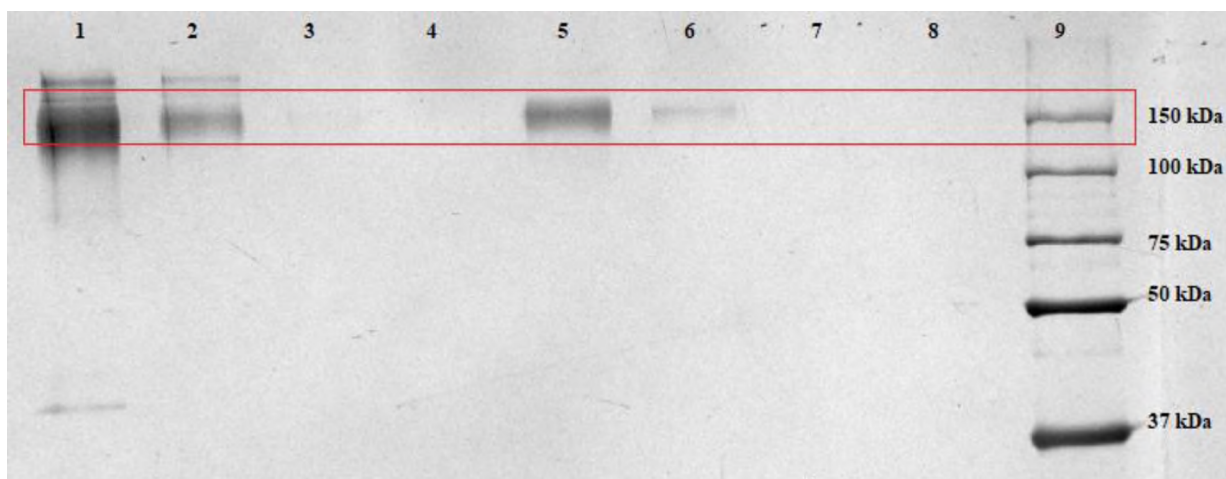
Testovány byly jednak komerční částice a jednak částice připravené v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze (Tabulka 8).

Na 0,5 mg magnetické makroporézní perlové celulózy bylo navázáno 20 μg protilátek. Na ostatní magnetické částice bylo vázáno 40 μg protilátek na 1 mg částic. Pro vazbu protilátek na magnetické částice byla využita metoda orientované a neorientované vazby, která je popsána v kapitole 3.4 a 3.5. Účinnost imobilizace byla ověřena pomocí SDS-PAGE analýzy. Z výsledků SDS-PAGE analýzy frakcí před, po a promývacích při imobilizaci protilátek na magnetické částice, jsme se rozhodly připravené imunosorbenty podrobit SEM analýze, abychom se ujistily, zda připravené imunosorbenty zachytávají bakterie.

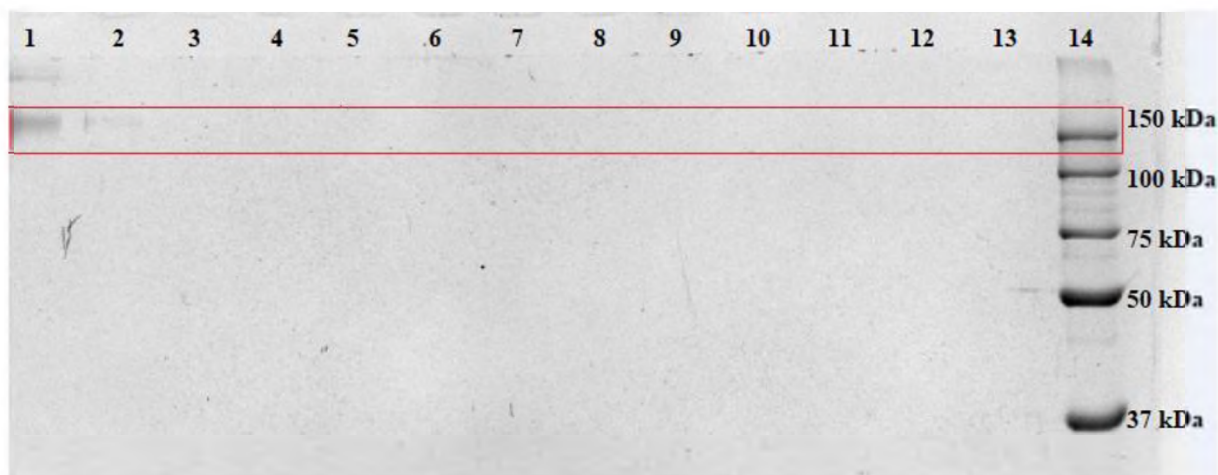
Tabulka 8 Přehled použitých magnetických částic pro přípravu magnetických nosičů anti-*Campylobacter jejuni*

Částice	Výrobce	Velikost	Funkční skupina	Způsob vazby	Účinnost imobilizace
ProMag	ProMag (Warrington, PA, USA)	0,746 μm	-COOH	Neorientovaná	65,2 %
Chemicell	Chemicell (Německo)	1 μm	-COOH	Neorientovaná	53,7 %
Chemicell	Chemicell (Německo)	1 μm	-NHNH ₂	Orientovaná	46,2 %
Dynabeads	Invitrogen (Norsko)	2,8 μm	-COOH	Neorientovaná	32,8 %
Dynabeads	Invitrogen (Norsko)	2,8 μm	-NH ₂	Orientovaná	53,9 %
HEMA	ÚMCH AV ČR (ČR)	4,4 μm	-COOH	Neorientovaná	55,1 %
HEMA	ÚMCH AV ČR (ČR)	4,4 μm	-NHNH ₂	Orientovaná	91,5 %
Magnetická makroporézní perlová celulóza	Iontosorb (ČR)	80 – 100 μm	-COOH	Neorientovaná	54,9 %
Magnetická makroporézní perlová celulóza	Iontosorb (ČR)	80 – 100 μm	-NHNH ₂	Orientovaná	76,2 %

Na obrázcích 20 a 21 jsou vybrané výsledky ověření účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE. Na obrázcích jsou porovnány účinnosti imobilizace protilátek na magnetické částice HEMA, za použití dvou metod imobilizace. Na obrázku 20 je výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před, po a promývacích při imobilizaci protilátek na magnetické částice HEMA s neorientovaně vázanými protilátkami. Na pozici 5 a 6 je vidět, že při promytí PBS pufrem došlo k částečnému uvolnění protilátek. Účinnost vazby byla vypočítána 55,1 %. Na obrázku 21 je výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před, po a promývacích při imobilizaci protilátek na magnetické částice HEMA s orientovaně vázanými protilátkami. Účinnost vazby byla v tomto případě vypočítána 91,5 %. Výsledky účinnosti imobilizace protilátek na ostatní testované magnetické částice jsou uvedeny v tabulce 8.



Obrázek 20 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po neorientované imobilizaci protilátek na magnetické částice HEMA. 1 - původní vzorek (PV), 2 – vazebná frakce (VF), 3 – promývací frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 4 - promývací frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 5 – promývací frakce (0,1 M PBS pufr pH 7,4), 6 - promývací frakce (0,1 M PBS pufr pH 7,4), 7 - promývací frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 8 – volné místo, 9 – standard molekulových hmotností (10-250 kDa); 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra, na gel dávkováno 10 μ l každé frakce.



Obrázek 21 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po orientované imobilizaci protilátek na magnetické částice HEMA. 1 - původní vzorek (PV), 2 – vazebná frakce (VF), 3 – promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 4 - promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 5 – promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 6 - promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3 s 1 M NaCl), 7 - promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3 s 1 M NaCl), 8 – promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 9 – promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 10 - promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 11 - promývací frakce (0,1 M PB pufr pH 7,3), 12 a 13 – volné místo, 14 - standard molekulových hmotností (10-250 kDa); 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra, na gel dávkováno 10 μ l každé frakce.

Pro záchyt bakterií *Campylobacter jejuni* byly následně testovány všechny připravené imunisorbenty uvedené v tabulce 8.

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

Pro ověření, zda jsou připravené imunosorbenty schopné vychytávat buňky *Campylobacter jejuni*, byla použita kultivační metoda. Experiment byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 3.6. Z výchozí suspenze 0,6 nebo 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice (odpovídá 1×10^8 CFU/ml) byla připravená desítkovým ředěním řada od 10^4 – 10^0 CFU/ml. Imunosorbent byl připraven navázáním 40 μg protilátek na 1 mg magnetických částic a pro ověření záchytu bylo použito 100 μg . K odebranému a promytému imunosorbentu byl přidán 1 ml příslušného ředění a po inkubaci a promytí byly vyočkovány na Columbia agar: vazebná frakce po inkubaci, dvě promývací frakce a imunosorbent s vychytanými bakteriálními buňkami. Po 48 hodinách kultivace při 41,5°C v mikroaerofilním prostředí byly počítány narostlé kolonie. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 9 - 12).

Tabulka 9 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* pomocí magnetických částic ProMag s neorientovaně vázanými protilátkami, záchyt ve fyziologickém roztoku, denzita 0,6 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice

Experiment 1										
	Záchyt (CFU/ml)									
	10^0		10^1		10^2		10^3		10^4	
Částice	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
VF	0	10	40	20	90	110	190	120	880	920
1x promytí	0	0	0	10	0	10	50	60	380	390
2x promytí	0	0	0	0	0	10	20	10	90	120
Experiment 2										
	Záchyt (CFU/ml)									
	10^0		10^1		10^2		10^3		10^4	
Částice	30	10	50	30	0	0	0	0	1	1
VF	0	20	30	10	80	70	450	630	970	980
1x promytí	0	0	10	20	0	0	30	0	250	330
2x promytí	0	10	0	0	10	0	10	20	70	50
Experiment 3										
	Záchyt (CFU/ml)									
	10^0		10^1		10^2		10^3		10^4	
Částice	0	0	20	20	10	20	0	40	30	50
VF	20	10	10	20	50	70	380	530	980	990
1x promytí	10	20	10	10	10	20	30	40	280	250
2x promytí	0	10	0	10	0	10	10	20	70	60

Tabulka 9 uvádí počty kolonií v CFU/ml jednotlivých frakcích při záchytu pomocí magnetických částic ProMag s neorientovaně vázanými protilátkami. Záchyt byl proveden ve fyziologickém roztoku s denzitou 0,6 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice (odpovídá 1×10^8 CFU/ml), která byla ředěná pomocí desítkového ředění na řadu od $10^4 - 10^0$ CFU/ml. Experiment byl proveden 3x. Z hodnot záchytu je patrné, že připravený imunosorbent není schopný kvantitativního záchytu bakteriálních buněk, proto byl experiment zopakován, ale s upravenými podmínkami. Záchyt byl v následujícím experimentu záchyt proveden v BHI bujónu.

Tabulka 10 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* pomocí magnetických částic ProMag s neorientovaně vázanými protilátkami v BHI bujónu, denzita 0,6 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice

Experiment 1

	Záchyt (CFU/ml)									
	10^0		10^1		10^2		10^3		10^4	
Částice	0	10	20	10	30	40	50	40	110	140
VF	10	0	10	10	120	150	460	530	870	930
1x promytí	10	0	10	0	20	10	20	40	230	210
2x promytí	0	0	0	10	0	10	10	0	110	100

Experiment 2

	Záchyt (CFU/ml)									
	10^0		10^1		10^2		10^3		10^4	
Částice	10	10	20	10	60	70	70	80	180	150
VF	10	0	80	60	170	190	970	930	1100	1250
1x promytí	0	0	60	40	40	60	330	340	450	510
2x promytí	0	0	20	10	20	40	120	100	90	140

Experiment 3

	Záchyt (CFU/ml)									
	10^0		10^1		10^2		10^3		10^4	
Částice	0	0	20	10	30	40	50	70	80	110
VF	20	20	30	30	80	90	640	740	1260	1350
1x promytí	40	0	20	20	20	30	320	240	230	210
2x promytí	10	0	0	0	0	20	10	20	110	150

Ani v tomto případě však nedošlo ke kvantitativnímu záchytu. Pro další experimenty byl proto využit imunosorbent připravený s využitím jiných magnetických částic, a to o větší velikosti, aby bylo ověřeno, zda na záchyt nemá vliv velikost magnetických částic [140]. Zároveň byla pro imobilizaci protilátek použita jiná metoda vazby protilátek na magnetické

částice (orientovaná vazba) a byla zvýšena výchozí denzita bakteriálních buněk pro přípravu ředění, a to 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice.

Tabulka 11 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* pomocí magnetických částic Dynabeads s orientovaně vázanými protilátkami v BHI bujónu, denzita 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice

Experiment 1

	Záchyt (CFU/ml)									
	10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴	
Částice	10	10	20	20	30	10	30	10	50	40
VF	10	0	90	20	200	280	1480	1600	6480	5440
1x promytí	20	10	20	10	40	30	150	200	840	1000
2x promytí	0	0	0	0	0	10	20	10	20	40

Tabulka 11 uvádí počty kolonií v CFU/ml jednotlivých frakcích při záchytu pomocí magnetických částic Dynabeads s orientovaně vázanými protilátkami. Záchyt byl proveden do BHI bujónu s denzitou 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice. Experiment byl proveden pouze jedenkrát. I po změně vazby protilátek na magnetické částice a zvýšení denzity, nedošlo k výraznému zlepšení záchytu bakterií imunosorbentem. Proto jsme se rozhodly připravit 9 různých imunosorbentů s různou velikostí a způsobem vazby protilátek, abychom ověřili, zda má na záchyt vliv velikost magnetických částic. Záchyt byl proveden pouze u ředění 10⁰ a 10⁴.

Tabulka 12 Vyhodnocení záchytu bakteriálních buněk *Campylobacter jejuni* pomocí 9 různých imunosorbentů, denzita 1,5 stupňů McFarlandovy zákalové stupnice

Záchyt (CFU/ml)

ProMag – neorientovaně vázané protilátky				
	10 ⁰		10 ⁴	
Částice	20	20	30	40
VF	10	0	1220	1560
1x promytí	10	10	310	380
2x promytí	0	0	40	20
Chemicell – neorientovaně vázané protilátky				
Částice	10	10	50	40
VF	10	10	1780	1530
1x promytí	0	10	250	270
2x promytí	0	0	20	50
Chemicell – orientovaně vázané protilátky				
Částice	10	10	60	30
VF	0	10	1660	1730
1x promytí	10	0	180	210
2x promytí	0	10	40	20
Dynabeads – neorientovaně vázané protilátky				
Částice	20	10	40	20
VF	10	0	1020	1080
1x promytí	0	10	230	220
2x promytí	10	0	30	40
Dynabeads – orientovaně vázané protilátky				
Částice	10	10	30	20
VF	0	0	920	950
1x promytí	10	0	210	250
2x promytí	0	10	20	10
HEMA – neorientovaně vázané protilátky				
Částice	10	10	30	10
VF	10	20	780	670
1x promytí	0	0	240	180
2x promytí	0	0	50	90
HEMA – orientovaně vázané protilátky				
Částice	20	30	70	90
VF	10	20	930	890
1x promytí	0	10	210	180
2x promytí	10	10	30	80
Magnetická makroporézní perlová celulóza – neorientovaně vázané protilátky				
Částice	40	50	50	40
VF	30	30	830	860
1x promytí	30	30	130	180
2x promytí	10	20	50	30
Magnetická makroporézní perlová celulóza – orientovaně vázané protilátky				
Částice	60	50	100	60
VF	40	30	1010	970
1x promytí	0	10	100	110
2x promytí	10	10	60	40

Při experimentech docházelo k tomu, že více kolonií naroslo ve vazebných a promývacích frakcích, což by nasvědčovalo tomu, že připravený imunosorbent není dostatečně účinný. Bylo pozorováno, že bakterie se více chytaly na částice s větší velikostí (Tabulka 13). Je pravděpodobné, že *Campylobacter jejuni*, kdy bakteriální buňka je přibližně velikosti 0,5 μ m, se účinněji váže na protilátky imobilizované na větší částice, než je jeho samotná velikost. Dále bylo pozorováno, že orientovaná vazba má vliv na vyšší účinnost záchytu a také áchyt v BHI bujónu měl vyšší účinnosti než záchyt do fyziologického roztoku. Rozhodli jsme se proto připravené imonosorbenty analyzovat pomocí SEM analýzy, jako v práci [149], která byla zaměřená na bakterie *Salmonella*. Ze SEM analýzy došly k závěru, že částice s protilátkami obalily bakterii a došlo tak k problémům se záchytem značených protilátek.

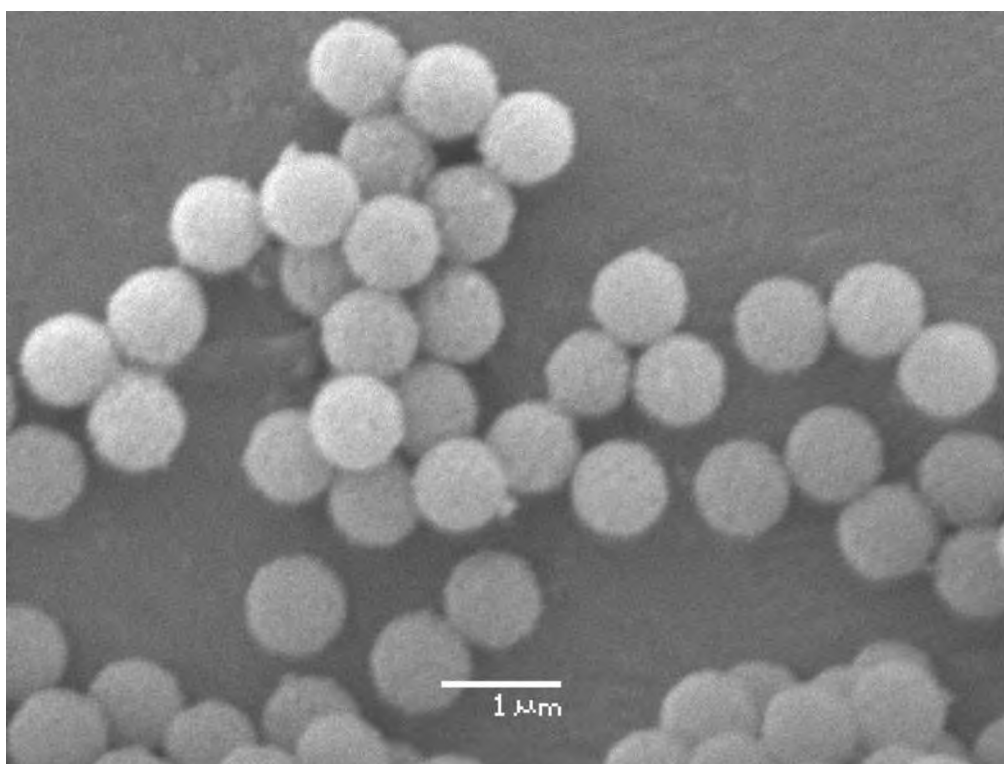
Tabulka 13 Porovnání účinnosti záchytu *Campylobacter jejuni* pomocí všech připravených imunosorbentů

Procenta účinnosti záchytu					
Magnetické částice	Způsob vazby	10 ⁰		10 ⁴	
ProMag	Neorientovaně	50 %	66 %	1,8 %	2 %
HEMA	Neorientovaně	50 %	33 %	2,7 %	1,1 %
Dynabeads	Orientovaně	50 %	50 %	2,5 %	1,6 %
Dynabeads	Neorientovaně	50 %	50 %	3 %	1,5 %
Chemicell	Neorientovaně	50 %	33 %	2,3 %	2,1 %
Chemicell	Orientovaně	50 %	33 %	3,1 %	1,5 %
Magnetická makroporézní perlová celulóza	Neorientovaně	36 %	38 %	4,7 %	3,6 %
HEMA	Orientovaně	50 %	43 %	5,6 %	7,3 %
Magnetická makroporézní perlová celulóza	Orientovaně	55 %	50 %	7,9 %	5,1 %

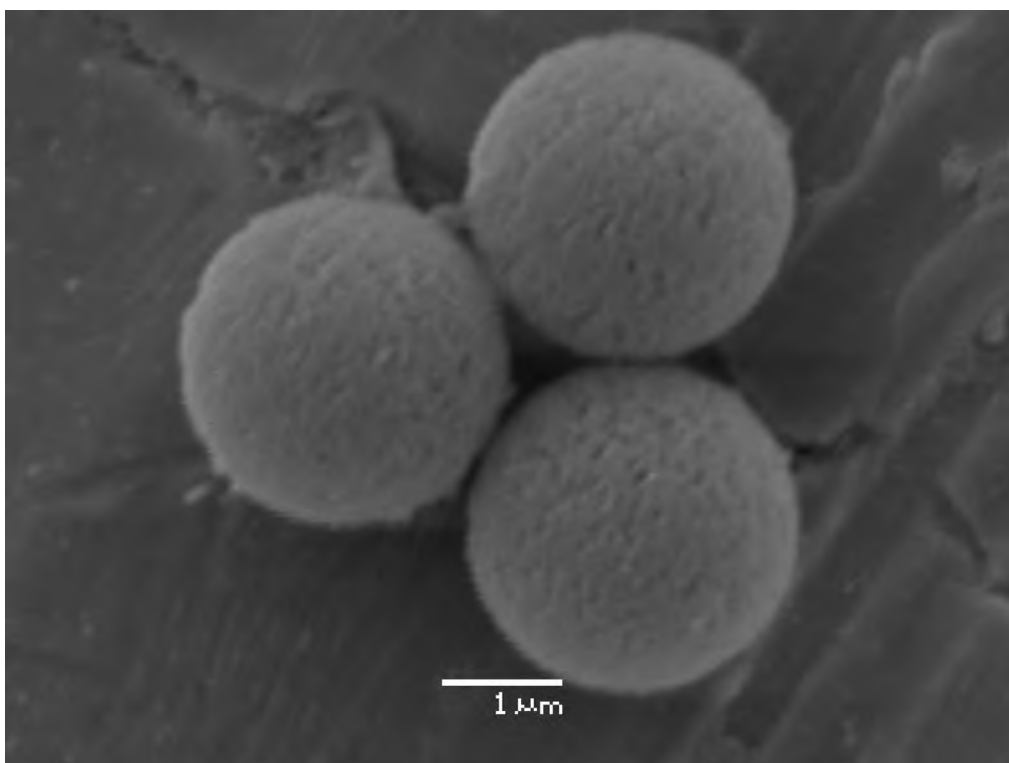
4.4 SEM analýza

Pro ověření, zda jsou připravené imunosorbenty schopné vycíhat bakteriální buňky byla použita SEM analýza. Postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 3.8. Připravená suspenze imunosorbentů s vycíhanými bakteriálními buňkami byla nanášena na terčík. Takto připravené terčíky byly vysušeny, pozlaceny a analyzovány skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko) a TESCAN VEGA3 SBU vybavený EDX sondou Brunker XFlash Detector 410-M (TESCAN, a.s., ČR).

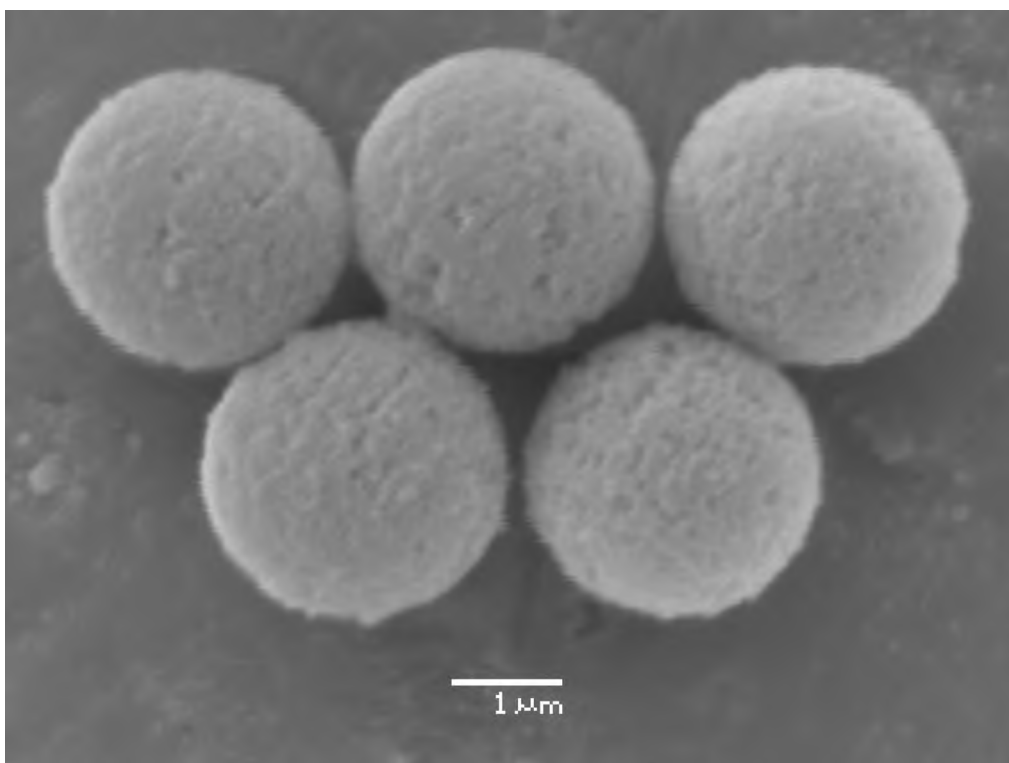
Při SEM analýze došlo k navázání bakterií pouze na magnetické částice makroporézní perlové celulózy. Na následujících obrázcích (22 - 28) jsou získané fotografie ze SEM.



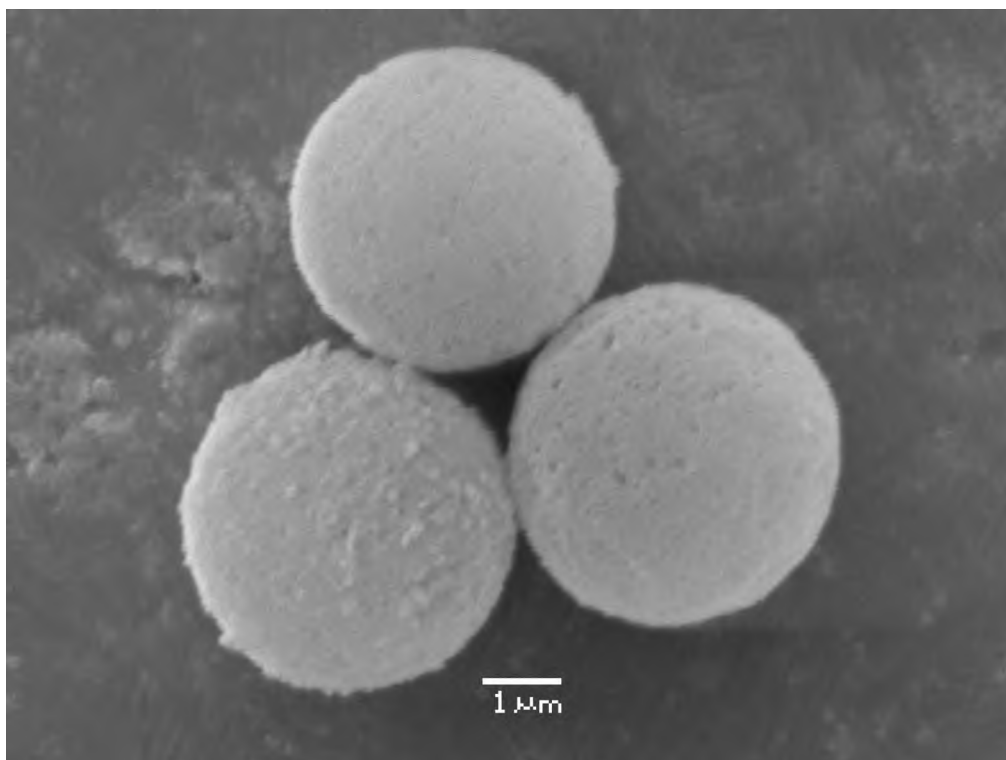
Obrázek 22 Fotografie ze SEM magnetických částic ProMag (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 1 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).



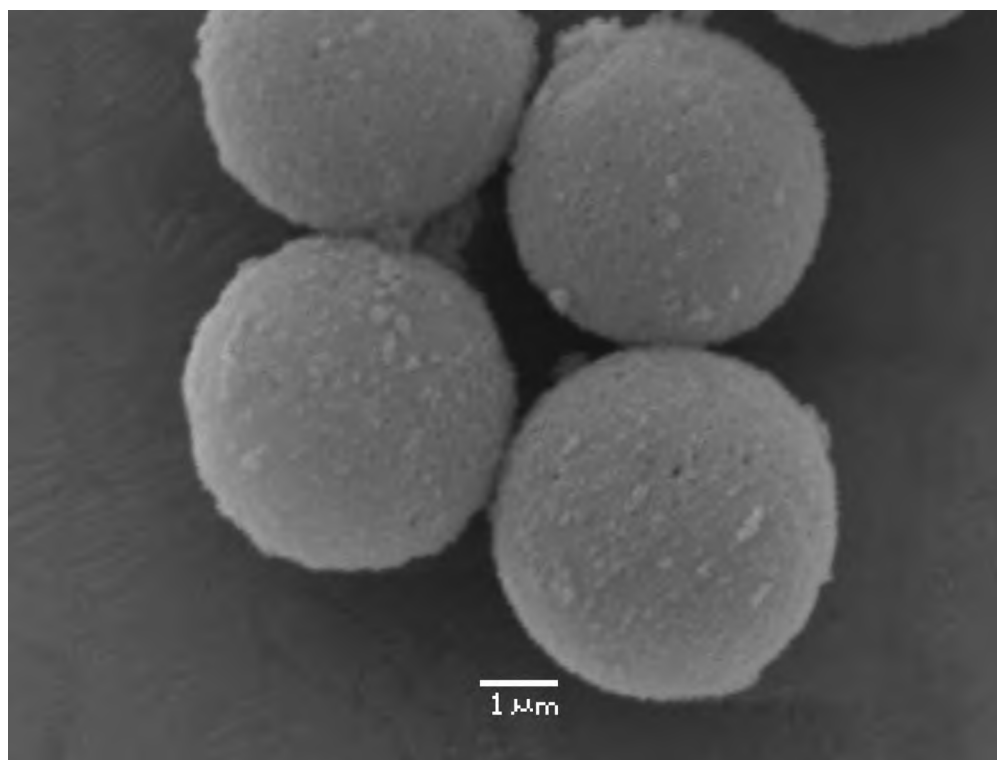
Obrázek 23 Fotografie ze SEM magnetických částic Dynabeads (orientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 1 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).



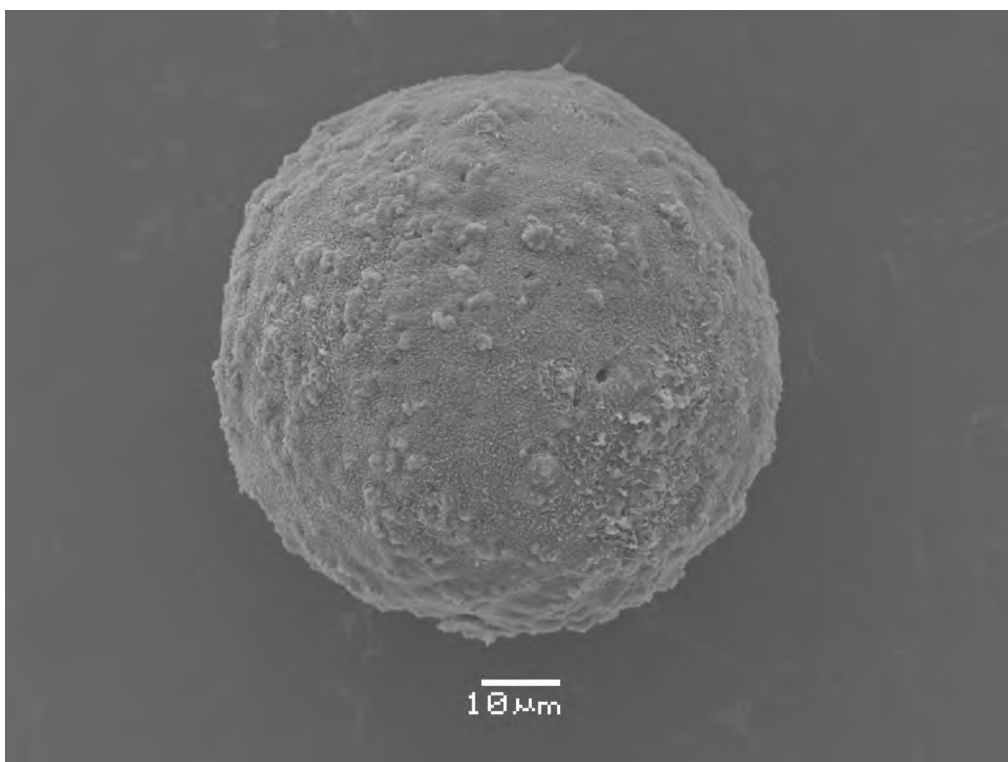
Obrázek 24 Fotografie ze SEM magnetických částic Dynabeads (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 1 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).



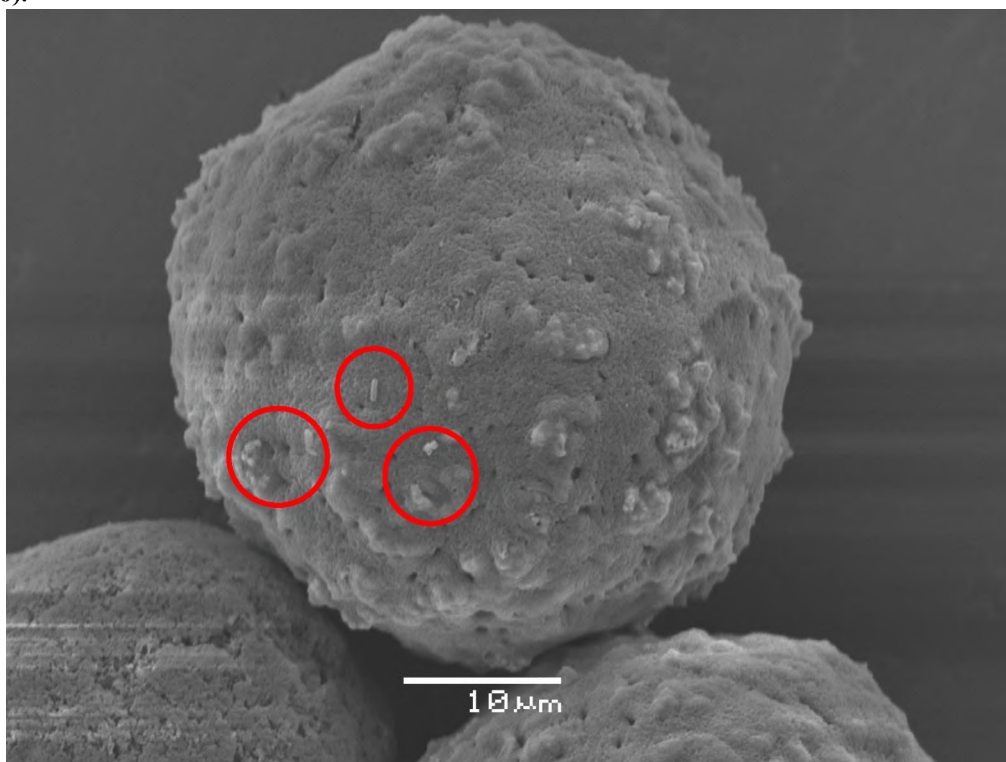
Obrázek 25 Fotografie ze SEM magnetických částic HEMA (orientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 1 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).



Obrázek 26 Fotografie ze SEM magnetických částic HEMA (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 1 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).



Obrázek 27 Fotografie ze SEM magnetické makroporézní perlové celulózy (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 10 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).



Obrázek 28 Fotografie ze SEM magnetické makroporézní perlové celulózy (neorientovaná vazby protilátek) po záchytu bakteriálních buněk; zvětšení 10 μm; přístroj JSM 5500-LV (JEOL Ltd., Japonsko).

U magnetické makroporézní perlové celulózy jsou na fotografii viditelné zachycené bakteriální buňky *Campylobacter jejuni* (Obrázek 28). U ostatních magnetických částic nebyly viditelné navázané bakterie. Docházelo k velkému shlukování magnetických částic, především u těch menších. I když docházelo ke shlukování částic, nebylo tím potvrzeno, že se tam bakterie neváží, ale zároveň není jisté, zda v tom shluku magnetických částic jsou. U magnetických částic Chemicell, došlo pravděpodobně k rozpadu částic, vlivem dehydratace, během přípravy na SEM, nebo byly již původní částice rozpadnuté. Proto nebyly pozorovány kulaté částice.

4.5 Příprava značených protilátek a ověření účinnosti značení

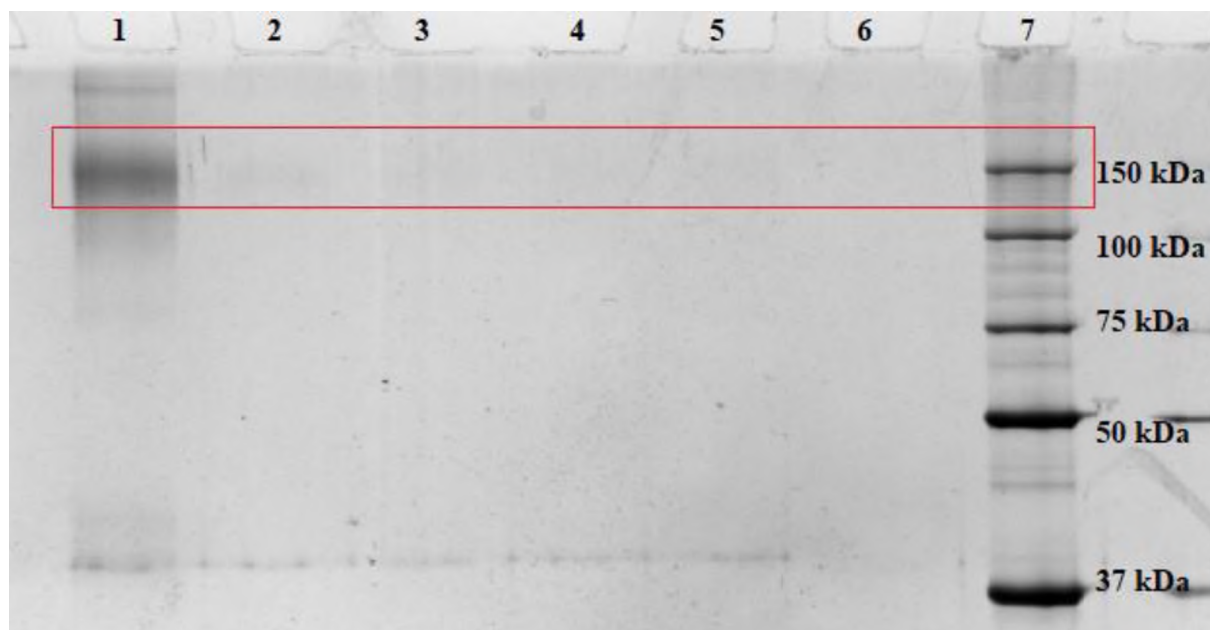
Pro detekci imunokomplexu *Campylobacter jejuni* s protilátkami navázanými na magnetických částicích byly pro přípravu značených protilátek pro detekci imunokomplexu vybrány kvantové tečky (CdTe QDs a PbS QDs) v kombinaci se silika nanočásticemi (Tabulka 14). Silika nanočástice byly použity pro snadnou přípravu a možnost separace značených protilátek od zbylých volných kvantových teček. Navíc, díky velkému specifickému povrchu je předpoklad možnosti vazby více kvantových teček na protilátky.

Tabulka 14 Kvantové tečky a silika nanočástice

	Velikost	Výrobce
Silika nanočástice SiNPs-NH₂	200 nm	Sigma Aldrich
Kvantové tečky CdTe QDs	6-8 nm	CEITEC
Kvantové tečky PbS-PEG-COOH QDs	80 nm	Mesolight

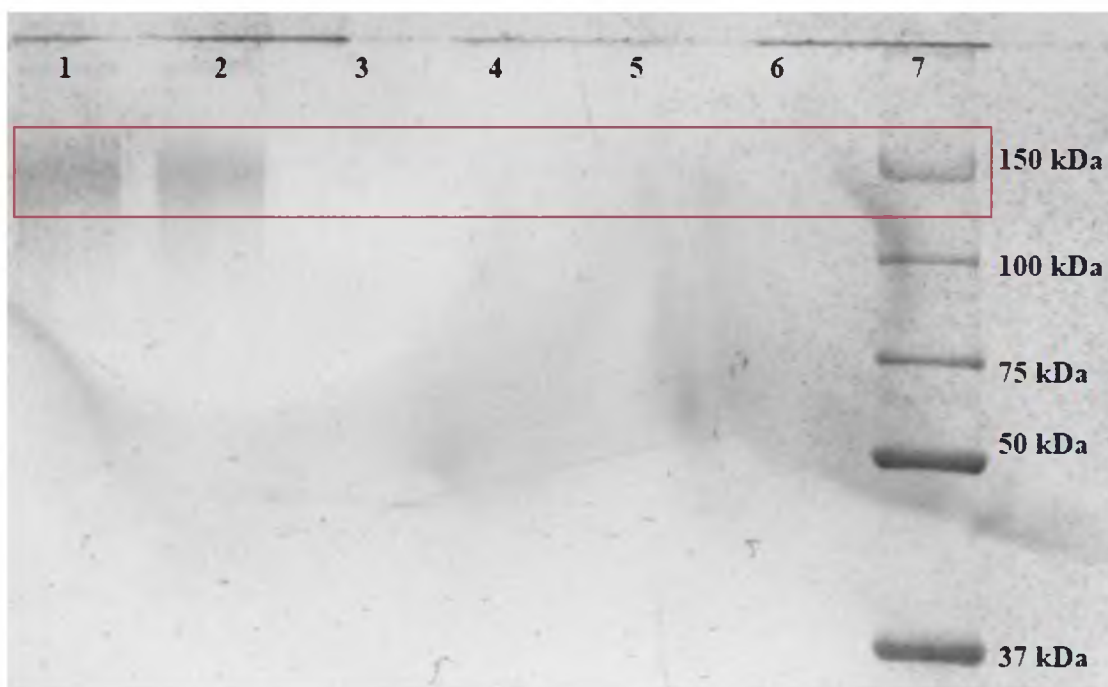
Postup přípravy značených protilátek je popsán v kapitole 3.9. Pro přípravu značených protilátek bylo odebráno 3 mg SiNPs, 50 µl CdTe QDs nebo 3 µl PbS QDs a 20 µg protilátek. Pro značení protilátek byly vybrány polyklonální anti-*Campylobacter jejuni* IgG protilátky (BioRad). Pro přípravu značených protilátek byla nejprve připravena značka, tj. SiNPs-QDs. Na připravenou značku byly vázány protilátky za pomoci jodistanové metody. Pro kontrolu účinnosti vazby protilátek byla použita SDS-PAGE analýza, pro elektrochemické ověření byla použita square wave anodická/katodická rozpouštěcí volumetrie na elektrodách DropSens C-110 (C/C/Ag-AgCl). SDS-PAGE analýza byla provedena na 10 % polyakrylamidovém dělicím gelu a 5 % zaostřovacím gelu, který byl po separaci obarven roztokem amoniakálního stříbra.

Na obrázku 29 je výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před, po a promývacích po konjugaci protilátek s kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi. Na přípravu byly použity CdTe QDs. Účinnost vazby značených protilátek byla 93,7 %. Takto připravené značené protilátky byly použity pro elektrochemickou detekci imunokomplexu bakteriálních buněk vycíhaných na imunosorbentu připraveném imobilizací protilátek na HEMA částicích, na které byly protilátky vázány orientovanou vazbou.



Obrázek 29 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po značení protilátek kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi. 1 - původní vzorek (PV), 2 – vazebná frakce (VF), 3 – promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pufr pH 7,3), 4 - promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pufr pH 7,3), 5 - promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pufr pH 7,3), 6 – volné místo, 7 - standard molekulových hmotností (10-250 kDa); 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra, na gel dávkováno 10 μ l každé frakce.

Na obrázku 30 je výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před, po a promývacích po konjugaci protilátek s kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi. Na přípravu byly použity PbS QDs (Tabulka 14). Účinnost vazby značených protilátek byla 56 %. Tyto připravené značené protilátky byly použity pro elektrochemickou detekci imunokomplexu bakteriálních buněk vycíhaných na imunosorbentu připraveném imobilizací protilátek na HEMA částicích, na které byly protilátky vázány orientovanou vazbou.



Obrázek 30 Výsledek SDS-PAGE analýzy frakcí před a po značení protilátek kvantovými tečkami v kombinaci se silika nanočásticemi. 1 - původní vzorek (PV), 2 – vazebná frakce (VF), 3 – promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pufr pH 7,3), 4 - promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pufr pH 7,3), 5 - promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pufr pH 7,3), 6 – volné místo, 7 - standard molekulových hmotností (10-250 kDa); 10 % dělicí gel, 5 % zaostřovací gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra, na gel dávkováno 10 μ l každé frakce.

Výsledky SDS-PAGE analýzy ve všech případech potvrdily, že protilátky anti-*Campylobacter jejuni* se s SiNPs-CdTe QDs vázaly z 93,7 % a s PbS QDs vázaly z 56 %. Na základě výsledků jsme se pro elektrochemickou detekci rozhodly použít protilátky značené CdTe QDs nebo PbS QDs v kombinaci se silika nanočásticemi (anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-CdTeQDs}; anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbSQDs}).

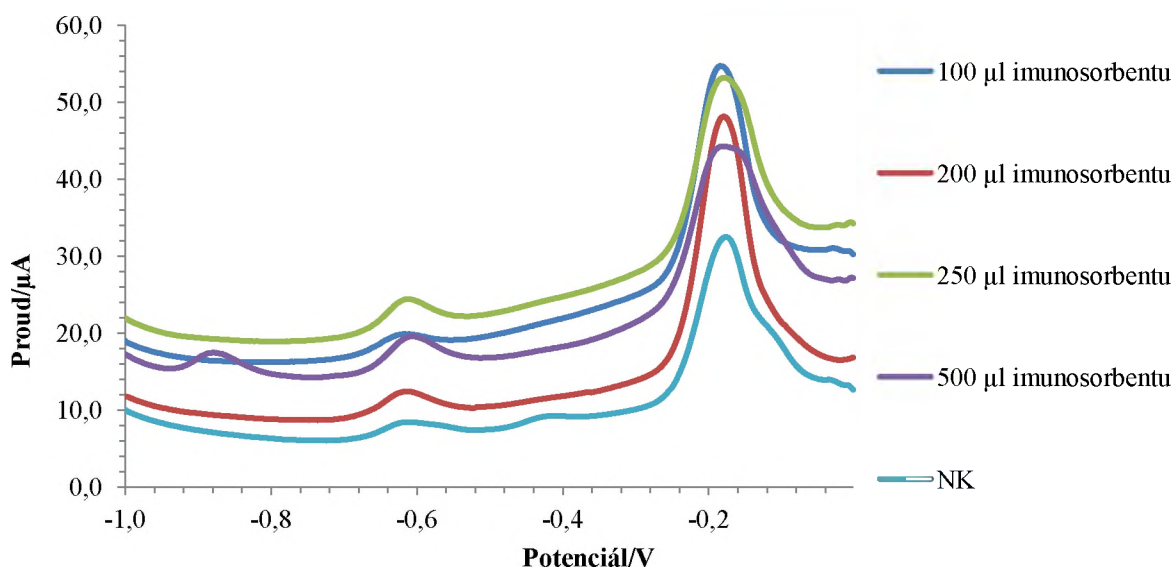
4.6 Sestavení imunosenzoru pro detekci *Campylobacter jejuni*

Posledním krokem bylo sestavení celého imunosenzoru, jehož princip je uveden na obrázku 18. K sestavení bylo odebráno vždy takové množství imunosorbentu, které odpovídalo 20 µg protilátek braných do reakce a 80 µl značených protilátek anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-CdTeQDs} nebo anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbSQDs}. K imunosorbentu bylo přidán 1 ml bakteriální supenze *Campylobacter jejuni* o příslušném ředění. Výsledná elektrochemická detekce spočívala v monitorování signálu kovových iontů uvolněných z kvantových teček použitých pro značení protilátek (Cd(II) nebo Pb(II)) a metoda SWASV/SWCSV na elektrodách DropSens-C110. Potenciály, při kterých docházelo k odečítání signálu kovových iontů uvolněných z kvantových teček, je uveden v tabulce 15.

Tabulka 15 Potenciály, při kterých je odečítán signál kovových iontů uvolněných z kvantových teček

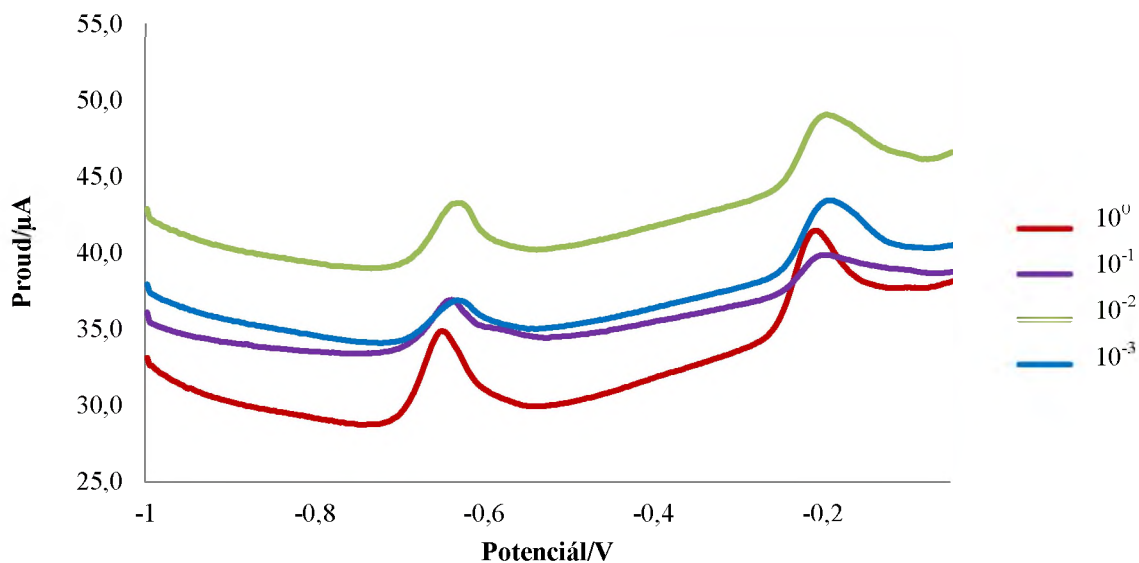
Typy kvantových teček	Proudové odezvy
CdTe QDs	-0,85 V
PbS QDs	-0,65 V

Pro záchyt bakterií ze vzorku byl použit imunosorbent tvořený anti-*Campylobacter jejuni* protilátkami imobilizovanými na magnetické částice HEMA-COOH. Pro imunosorbent bylo použito 40 µg protilátek na 1 mg magnetických částic. Bylo využito pouze ředění bakteriální suspenze 10³ CFU/ml, protože se testovalo různé množství nosiče. Měření bylo z časových důvodů provedeno pouze jednou. Na obrázku 31 je uveden výsledný voltamogram. Pro vyhodnocení byly odečítány proudové odezvy při potenciálu – 0,85 V. Charakteristický pík Cd(II) iontů byl pozorován pouze při použití 500 µl imunosorbentu s odezvou 2,450 µA. Díky většímu množství imunosorbentu, došlo k lepšímu a vyššímu záchytu bakterií na magnetické částice. Negativní kontrola byla měřena současně se vzorky obsahující připravený imunosorbent, pro kontrolu připraveného imunokomplexu. Negativní kontrola obsahovala místo bakterií jen PBS-T pufr. Na základě získaných výsledků bylo pro třetí experiment používáno takové množství imunosorbentu, které odpovídalo 20µg protilátek braných do reakce a 80 µl značených protilátek (anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbS QDs}), abychom zároveň vyzkoušeli i jiné značené protilátky.

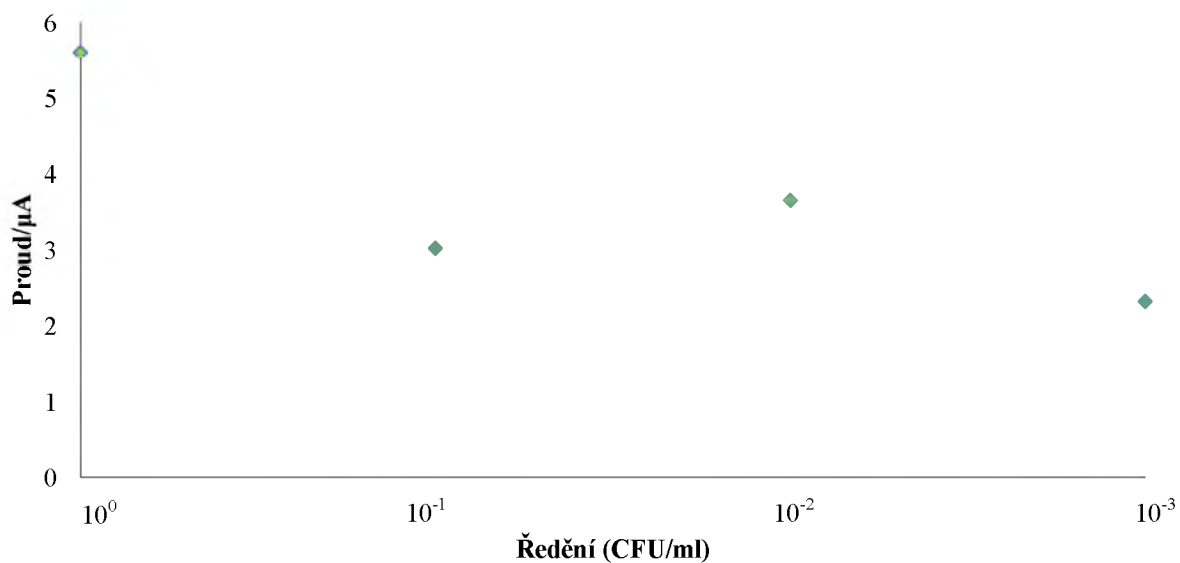


Obrázek 31 SWASV voltamogram měření imunokomplexu pro detekci *Campylobacter jejuni*. Testování různého množství imunosorbentu (100, 200, 250 a 500 µl) množství značených protilátek (anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SNPs-CdTe QDs}) 80 µl, elektrody DropSens C-110 modifikované *in situ* bizmutovým filmem (500 ppb), výška píku odečítána při potenciálu – 0,85 V.

Pro další experiment bylo odebráno takové množství imunosorbentu, které odpovídalo 20µg protilátek braných do reakce a 80 µl značených protilátek (anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SNPs-PbS QDs}). Pro záchyt bakterií ze vzorku byl použit imunosorbent tvořený anti- *Campylobacter jejuni* IgG protilátkami imobilizovanými na magnetické částice HEMA-COOH. Koncentrační rozmezí bakteriální suspenze bylo $10^0 - 10^3$ CFU/ml. Měření bylo provedeno v dubletu, ale z důvodu špatných elektrod je použitelné pouze jedno měření. Na obrázku 32 je uveden výsledný voltamogram a na obrázku 33 je uvedena závislost proudové odezvy na ředění. Pro vyhodnocení byly odečítány proudové odezvy při potenciálu – 0,65 V. V tabulce 16 jsou uvedeny výsledky měření. Použité koncentrační rozmezí $10^0 - 10^3$ CFU/ml bylo pro ověření vyočkováno na Columbia agar a inkubováno (48 hodin, 42°C, mikroaerofilně), abychom si ověřili, zda dané ředění korespondovalo s počtem kolonií na misce. I když počty buněk na miskách odpovídaly danému ředění, tak změřené proudové odezvy nersotly lineárně s rostoucím ředěním.



Obrázek 32 SWASV voltamogram měření imunokomplexu po detekci *Campylobacter jejuni*. Množství imunisorbentu (380 μ l) a značených protilátek anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbS QDs} (60 μ l), elektrody DropSens C-110 modifikované *in situ* bizmutovým filmem (500 ppb), výška píku odečítána při potenciálu - 0,65 V.

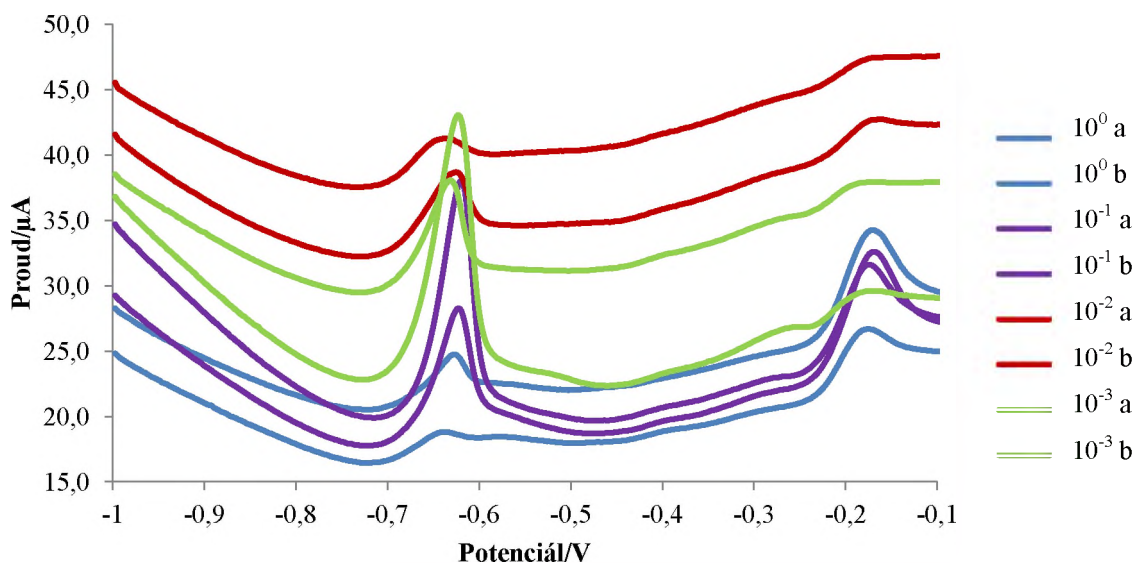


Obrázek 33 Závislost proudové odezvy k danému ředění

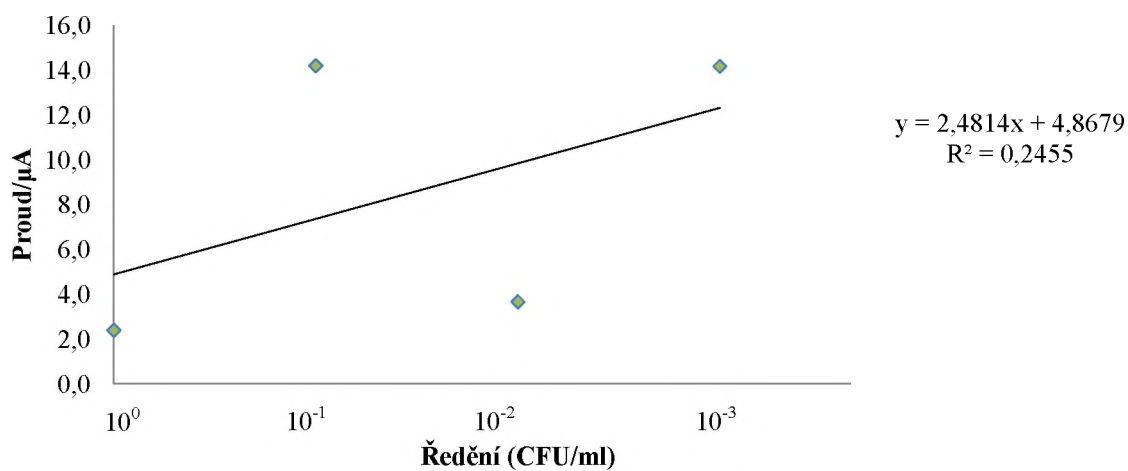
Tabulka 16 Odečtené proudy při daném potenciálu

Proudová odezva v μA	Ředění			
	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0
	2,320	3,654	3,021	5,604

Pro další experiment byl použit imunosorbent tvořený anti-*Campylobacter jejuni* protilátkami imobilizovanými na magnetické částice HEMA-COOH. Pro imunosorbent bylo použito 40 μg protilátek na 1 mg magnetických částic a 80 μl značených protilátek (anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SiNPs-PbS QDs}). Byla použita ředění bakteriální suspenze $10^0 - 10^{-3}$ CFU/ml. Měření bylo provedeno v dubletu. Na obrázku 34 je uveden výsledný voltamogram a na obrázku 35 je kalibrační závislost odečteného proudu k danému ředění. Pro vyhodnocení byly odečítány proudové odezvy při potenciálu $-0,65$ V. V tabulce 17 jsou uvedeny výsledky měření. Použité ředění $10^0 - 10^{-3}$ CFU/ml bylo pro ověření vyočkováno na Columbia agar a inkubováno (48 hodin, 42°C, mikroaerofilně), abychom si ověřili, zda dané ředění korespondovalo s počtem kolonií na misce. Při experimentu byla získána kalibrační závislost proudové odezvy na rostoucím množství bakteriálních buněk ve vzorku. Dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 a č. 1441/2007 stačí pouze určit přítomnost/nepřítomnost v 25 g potravin.



Obrázek 34 SWASV voltamogram měření imunokomplexu po detekci *Campylobacter jejuni*. Množství imunisorbentu (1000 µl) a značených protilátek anti-*Campylobacter jejuni* IgG^{SINPs-PbS QDs} (80 µl), elektrody DropSens C-110 modifikované *in situ* bizmutovým filmem (500 ppb), výška píku odečítána při potenciálu – 0,65 V.



Obrázek 35 Kalibrační závislost odečteného proudu na daném ředění

Tabulka 17 Odečtené proudy při daném potenciálu

Ředění				
	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0
Proudová odezva v μA	7,882	5,065	10,134	1,147
	20,433	2,225	18,235	3,599

I při použití velkého množství nosiče nedošlo k lineárnímu nárůstu. PbS QDs poskytovaly lepší signál než CdTe QDs. SEM analýza potvrdila záchyt bakterií pouze na magnetické makroporézní perlové celulóze. Použité magnetické částice Chemicell byly při SEM analýze rozpadnuté. SEM analýza potvrdila shlukování magnetických částic. Záchyt bakterií pomocí připraveného imunosorbentu byl účinnější v případě záchytu do BHI bujónu než při použití fyziologického roztoku.

Výsledky korespondují i s literaturou.

Podle studie Yihua Che a kol. (2001) má velikost magnetických částic vliv na vazbu bakterií na její modifikovaný povrch. Ze studie vyplývá, že nejvhodnější velikostí magnetických částic je okolo 2,8 μm . Naše studie tuto domněnku potvrdila, kdy HEMA částice s orientovaně vázanými protilátkami měly nejvyšší účinnost imobilizace. S takto připravenými magnetickými částicemi byl proveden záchyt.

Ze studie Le Ly Thuy Tram a kol. (2012) vyplývá, že kvalita protilátek ovlivňuje jejich vazbu na magnetické částice. Dále studie Dianna J. Bopp a kol. (2002) uvádí, že imunomagnetická separace zvyšuje možnost izolace společně se studií Soo Hwan Suh et al. (2013).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sestavit imunosenzor, který by byl využitelný pro detekci *Campylobacter jejuni* v potravinách. Práce se zabývala výběrem vhodných magnetických částic pro přípravu imunosorbentu. Pro jeho přípravu byly zvoleny komerčně dostupné magnetické částice o různých velikostech (ProMag, Chemicell, Dynabeads, HEMA a Magnetická makroporézní perlová celulóza). Na magnetické částice byly imobilizovány polyklonální protilátky anti-*Campylobacter jejuni* IgG od firmy BioRad. I když výsledky dobré nejsou, jako nejvhodnější se na základě výsledků jevíly magnetické částice HEMA pro přípravu imunosorbentu. Pro značení protilátek byly vybrány kvantové tečky (CdTe QDs a PbS QDs) v kombinaci se silika nanočásticemi pro snadnou přípravu a lepších vazebných vlastností. Pomocí značených protilátek docházelo k elektrochemické detekci. Elektrochemická detekce využívala square wave anodické rozpouštěcí voltametrie, za využití jednorázových tištěných elektrod DropSens C-110 (C/C/Ag-AgCl). Vždy se souběžně dělala kultivace a pomnožení. Kultivační metodou byl prokázán záchyt bakteriálních buněk připravených imunosorbentů a jen některých imunosorbentů pomocí SEM analýzy. V rámci práce se však prokázalo, že sestavený systém neposkytoval rostoucí trend s rostoucí koncentrací buněk ve vzorku, který by umožňoval kvantifikaci, a proto je nutné vylepšit uspořádání systému. Připravený imunosenzor by mohl být využitelný pro kvalitativní průkaz přítomnosti *Campylobacter jejuni*, ale ne pro kvantifikaci. Což je pro předběžné hodnocení důležité.

ZDROJE

- [1] GILBERT, M. J., DUIM, B., et al. (2019). Living in Cold Blood: *Arcobacter*, *Campylobacter*, and *Helicobacter* in Reptiles. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01086. ISSN 1664-302X.
- [2] LAPIERRE, L., GATICA, M. A., et al. (2016). Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Animals, Meat, and Humans. *Microbial Drug Resistance*. 2016, 22(5), 432-444. DOI: 10.1089/mdr.2015.0055. ISSN 1076-6294.
- [3] PARKER, C. T., MILLER, W. G., et al. (2007). Common genomic features of *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* strains distinguish them from *C. jejuni* subsp. *jejuni*. *BMC Microbiology*, 2007, 7(1). DOI: 10.1186/1471-2180-7-50. ISSN 14712180.
- [4] *Campylobacter jejuni*. In: *PotravinýX*. Dostupné z: <http://potravinex.cz/index.php/2015/07/07/campylobacter-jejuni-a-campylobacter-coli/>
- [5] GREENWOOD, D., ed. (2012). Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. 18th ed. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone. ISBN 978-0-7020-4089-4.
- [6] TAKAMIYA, M., OZEN, A., et al. (2011). Genome Sequence of *Campylobacter jejuni* strain 327, a strain isolated from a turkey slaughterhouse. *Standards in genomic sciences*, 2011, Vol. 4, No. 2, p. 115.
- [7] DEMNEROVÁ, K. (2012). Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy*. (106), 920-925.
- [8] LITTLE, C. L., GORMLEY, F. J., et al. (2010). A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pâté in England and Wales. *Epidemiology and Infection*. 2010, 138(12), 1691-1694. DOI: 10.1017/S0950268810001974.
- [9] JONSSON, M. E., TAFJORD HEIER, B., et al. (2010). Analysis of simultaneous space-time clusters of *Campylobacter* spp. in humans and in broiler flocks using a multiple dataset approach. *International Journal of Health Geographics*. 2010, 9(1). DOI: 10.1186/1476-072X-9-48. ISSN 1476-072X.

- [10] WILLIAMS, M. S., GOLDEN, N. J., et al. (2015). Temporal patterns of *Campylobacter* contamination on chicken and their relationship to campylobacteriosis cases in the United States. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 208, 114-121. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.018. ISSN 01681605.
- [11] ISHIHARA, K., TAKAHASHI, R., et al. (2012). Seasonal Variation in *Campylobacter*-contaminated Retail Chicken Products: A Year-Round Investigation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2012, 74(1), 117-120. DOI: 10.1292/jvms.11-0110. ISSN 0916-7250.
- [12] MUGHINI GRAS, L., SMID, J. H. et al. (2012). Risk Factors for Campylobacteriosis of Chicken, Ruminant, and Environmental Origin: A Combined Case-Control and Source Attribution Analysis. *PLoS ONE*. 2012, 7(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0042599. ISSN 1932-6203.
- [13] ROSNER, B. M., SCHIELKE, A., et al. (2017). A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011–2014. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). DOI: 10.1038/s41598-017-05227-x. ISSN 2045-2322.
- [14] YOUNG, K. T., DAVIS, L. M., et al. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 5, Issue 9, p. 665-669.
- [15] RYCKE, J., OSWALD, E. (2006). Cytolethal distending toxin (CDT) : a bacterial weapon to control host cell proliferation?. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 203, Issue 2, p. 141-148 .
- [16] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. (2008). *Food Microbiology*, third edition, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008, 478 p., ISBN 978-0- 85404-284-5.
- [17] MURPHY, C., CARROLL, C., et al. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne patogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, Issue 4, p. 623-632.
- [18] HERMANS, D., VAN DEUN, K., et al. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*. 2011, 42(1). DOI: 10.1186/1297-9716-42-82. ISSN 1297-9716.

- [19] WILSON, D. J., GABRIEL, E., et al. (2008). Tracing the Source of Campylobacteriosis. *PLoS Genetics*. 2008, 4(9). DOI: 10.1371/journal.pgen.1000203. ISSN 1553-7404.
- [20] DRENTHEM, J., YUKI, N., et al. (2011). Guillain-Barre syndrome subtypes related to *Campylobacter* infection. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2011, 82(3), 300-305. DOI: 10.1136/jnnp.2010.226639. ISSN 0022-3050.
- [21] LU, X., SAMUELSON, D. R., et al. (2012). Antimicrobial effect of diallyl sulphide on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012, 67(8), 1915-1926. DOI: 10.1093/jac/dks138. ISSN 0305-7453.
- [22] WEI, W., SCHÜPBACH, G., et al. (2015). Time-series analysis of *Campylobacter* incidence in Switzerland. *Epidemiology and Infection*. 2015, 143(9), 1982-1989. DOI: 10.1017/S0950268814002738. ISSN 0950-2688.
- [23] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2017a. Infekce v ČR - EPIDAT. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2006-2015 - absolutně. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2006-2015-absolutne>
- [24] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2017b. Infekce v ČR - EPIDAT. Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, leden – prosinec 2019 porovnání se stejným obdobím v letech 2010 – 2018. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/szu/infekce/tabulka_leden_prosinec_2019.pdf
- [25] EL-ZAMKAN, M. A., ABDEL HAMEED, K. G. (2016). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products. *Veterinary World*. 2016, 9(10), 1147-1151. DOI: 10.14202/vetworld.2016.1147-1151. ISSN 09728988.
- [26]. VOTAVA, M. a kol. (2010). Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody. Neptun, 495 s., ISBN: 978-80-86850-04-8
- [27] FUJIHARA, N., TAKAKURA, S., et al. (2006). A case of perinatal sepsis by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* infection successfully treated with carbapenem – case report and literature review. *Journal of Infection*. 2006, 53(5), e199-e202. DOI: 10.1016/j.jinf.2006.01.009. ISSN 01634453.

- [28] OLIVER, S.P., JAYARAO, B.M., et al. (2005). 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.
- [29] STEPHAN R., SCHUMACHER S., et al. (2003). The VITR technology for rapid detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. *Int J Food Microbiol*. 2003, 89, 287–90.
- [30] ČSN EN ISO 10272-1. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp. - Část 1: Metoda průkazu*. 2018.
- [31] KARSHIMA, S., BOBBO, A. (2016). Isolation and PCR Characterisation of Thermophilic *Campylobacter* Species in Dogs Presented to Selected Veterinary Clinics in Jos, Nigeria. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 2016, 50(1). DOI: 10.5455/ajvs.221754. ISSN 1110-2047.
- [32] LEE K. M., RUNYON M., et al. (2014). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*. 2014, 47, 264-276. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.07.011.
- [33] LACZKA O., DEL CAMPO FJ., et al. (2007) Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*. 22, 1205–17.
- [34] LONG, F., ZHU, A. N., et al. (2013). Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. *Sensors*, 2013 (13): 13928-13948.
- [35] DUNBAR, N. L., BRUGGINK, L. D., et al. (2014). Evaluation of the RIDAGENE real-time PCR assay for the detection of GI and GII norovirus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014, 79(3), 317-321. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.017. ISSN 07328893.
- [36] BARDONĚ, J., KOLÁŘ, M., et al. (2011). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. *Food Control*. 2., 22(2), 328–332. ISSN 09567135. Doi:10.1016/j.foodcont.2010.08.001.
- [37] BAROT, M. S., MOSENTHAL, A. C., et al. (1983). Location of *Campylobacter jejuni* in Infected Chicken Livers. *Journal of Clinical Microbiology*. 17(5), 921–922.

- [38] BLACKBURN, C. de W., MCCLURE, P. J. (2002). Foodborne pathogens: hazards, risk analysis, and control. Boca Raton, FL : Cambridge, England: CRC Press ; Woodhead. Woodhead Publishing in food science and technology. ISBN 978-0-8493-1213-7.
- [39] EL-WADAWE, N., OMRAN, E., et al. (2019). Detection of *Campylobacter* in Chicken Parts by Conventional Methods and Polymerase Chain Reaction with Identification of Antibiotic Resistance Profile. *Journal of High Institute of Public Health*. 2019, 49(2), 73-81. DOI: 10.21608/jhiph.2019.49258. ISSN 2357-061X.
- [40] LIU, Y., CAO, Y., et al. (2019). Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00222. ISSN 1664-302X.
- [41] FROST, J. A. (2001). Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 90(S6), 85S-95S. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01357.x. ISSN 1364-5072.
- [42] CORNELIUS, A. J., NICOL C. et al. (2005). *Campylobacter* spp. in New Zealand raw sheep liver and human campylobacteriosis cases. *International Journal of Food Microbiology*. (99), 99–105. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.016.
- [43] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. (2010). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*. 8(3). Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2010.1503.
- [44] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY a EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2010. *EFSA Journal*. 3., 10(3), 2597. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2012.2597.
- [45] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY a EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. *EFSA Journal*. 4., 11(4), 3129. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.

- [46] FERNANDEZ, R. (2009). *Microbiology Handbook: Dairy Products*. B.m.: Leatherhead Publishing. ISBN 978-1-905224-62-3
- [47] FERNANDEZ, R. (2009). *Microbiology Handbook Meat Products*. B.m.: Leatherhead Publishing. ISBN 978-1-905224-66-1.
- [48] FORSYTHE, S. J. (2010). *The Microbiology of Safe Food*. B.m.: Blackwell Science. ISBN 978-1-4051-4005-8.
- [49] FORSYTHE, S. J., HAYES, P. R. (1998). *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. B.m.: Springer Science + Business Media New York. ISBN 978-1-4419-5196-0.
- [50] GHARST, G., OYARZABAL, O. A., et al. (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods*. 10., 95(1), 84–92. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2013.07.014.
- [51] GUYARD-NICODÈME, M., RIVOAL, K., et al. (2015). Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *International Journal of Food Microbiology*. (203), 8–14. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.013.
- [52] HIMEDIA. (2017). Oxidase discs. Himedia Technical Data [online]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/DD018.pdf>
- [53] HOCHÉL, I. (2009). Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. *Chemické listy*. (103), 814–822.
- [54] HU, L., KOPECKO, D. J. (2003). *Campylobacter* species. In: M. D. MILIOTIS a J. W. BIER, ed. *International handbook of foodborne pathogens*. New York: M. Dekker, Food science and technology, 125. ISBN 978-0-8247-0685-2.
- [55] HUANG, H., BROOKS, B. W. et al. (2015). *Campylobacter* species in animal, food, and environmental sources, and relevant testing programs in Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. 61(10), 701–721. Dostupné z: doi:10.1139/cjm-2014-0770.
- [56] HUMPHREY, T., O'BRIEN, S., et al. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*. 7., 117(3), 237–257. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006.

- [57] HUTCHINSON, M., HARRISON, D., et al. (2015). A Method for the Preparation of Chicken Liver Pâté that Reliably Destroys *Campylobacters*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. (12), 4652–4669. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph120504652.
- [58] KAPPERUD, G., ESPELAND, G., et al. (2003). Factors Associated with Increased and Decreased Risk of *Campylobacter Infection*: A Prospective Case-Control Study in Norway. *American Journal of Epidemiology*. 158(3), 234–242. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwg139.
- [59] MOORE, J. E., CORCORAN, D., et al. (2005). *Campylobacter*. *Veterinary Research*. 5., 36(3), 351–382. ISSN 0928-4249, 1297-9716. Dostupné z: doi:10.1051/vetres:2005012.
- [60] MOORE, J. E., MADDEN, R. H. (1998). Occurrence of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Porcine Liver in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*. 61(4), 409–413. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-61.4.409.
- [61] NGULUKUN, S. S. (2016). Taxonomy and physiological characteristics of *Campylobacter* spp. In: G. KLEIN, ed. *Campylobacter: Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease*. B.m.: Academic Press, s. 41–60. ISBN 978-0-12-803623-5.
- [62] OMURTAG, I., PAULSEN, P., et al. (2013). The risk of transfer of foodborne bacterial hazards in Turkey through the consumption of meat; risk ranking of muscle foods with the potential to transfer *Campylobacter* spp. *Food Security*. 5(1), 117–127. Dostupné z: doi:10.1007/s12571-012-0230-z.
- [63] PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P., et al. (2005). *Microbiology*. 6th ed. Dubuque, IA: McGraw-Hill Higher Education. ISBN 978-0-07-255678-0.
- [64] VONDRÁKOVÁ, L., PAZLAROVÁ, J., et al. (2014). Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, coli and lari in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathogens*. 6(1), 12. ISSN 1757-4749. Dostupné z: doi:10.1186/1757-4749-6-12
- [65] WHILEY, H., VAN DEN AKKER, B., et al. (2013). The Role of Environmental Reservoirs in Human Campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8. 11., 10(11), 5886–5907. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph10115886

- [66] KABIR, S. M. L., CHOWDHURY, N., et al. (2019). Comparison of Established PCR Assays for Accurate Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2019, 72(2), 81-87. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2018.340. ISSN 1344-6304.
- [67] KAMEI, K., ASAKURA, M., et al. (2014). A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2014, 63(5), 659-666. DOI: 10.1099/jmm.0.071498-0. ISSN 0022-2615.
- [68] PLATTS-MILLS, J. A., LIU, J., et al. (2014). Detection of *Campylobacter* in Stool and Determination of Significance by Culture, Enzyme Immunoassay, and PCR in Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, 52(4), 1074-1080. DOI: 10.1128/JCM.02935-13. ISSN 0095-1137.
- [69] SHAIBANI, P. M., JIANG, K. et al. (2016). The detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) with the pH sensitive hydrogel nanofiber-light addressable potentiometric sensor (NF-LAPS). *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016, 226, 176-183. DOI: 10.1016/j.snb.2015.11.135. ISSN 09254005.
- [70] LAZCKA, O., CAMPO, F. J. D. et al. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22(7), 1205-1217. DOI: 10.1016/j.bios.2006.06.036. ISSN 09565663.
- [71] RAMFOS, I., VASSILIADIS, N., et al. (2013). A compact hybrid-multiplexed potentiostat for real-time electrochemical biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 47, 482-489. DOI: 10.1016/j.bios.2013.03.068. ISSN 09565663.
- [72] Dostupné z: www.dropsens.com [vid. 2020-5-16].
- [73] BLANCA, A. G., RODRIGUEZ, E. K. G. T., et al. (2015). Dutra Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor, in *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. 2015, InTech.
- [74] GESZKE-MORITZ, M., MORITZ, M. (2013). Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties. *Materials Science and Engineering: C*, 2013 (33): 1008-1021.

- [75] D'ORAZIO, P., (2011). Biosensors in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, 2011 (412): 1749-61.
- [76] RECHNITZ, G.A., (1991). Biosensors into the 1990s. *Electroanalysis*, 1991 (3): 73-76.
- [77] WANG, L., SIPE, D. M., et al. (2008). A MEMS thermal biosensor for metabolic monitoring applications. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2008 (17): 318-327.
- [78] BAHADRR, B., SEZGINTURK, M. K. (2015). Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta*, 2015 (132): 162-174.
- [79] LUPPA, P. B., SOKOLL, L.J., et al. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 2001 (314): 1-26.
- [80] JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. (2009). *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington DC: ASM Press, 2009. ISBN 978-1-55581-459-5.
- [81] RICCI, F., ADORNETTO, G., et al. (2012). A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, 2012 (84): 74-83.
- [82] MASCINI, M., TOMBELII, S. (2008). Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers*, 2008 (13): 637-657.
- [83] ZHOU, F., LU, M., et al. (2010). Electrochemical Immunosensor for Simultaneous Detection of Dual Cardiac Markers Based on a Poly(Dimethylsiloxane)-Gold Nanoparticles Composite Microfluidic Chip: A Proof of Principle. *Clinical Chemistry*, 2010 (56): 1701-1707.
- [84] WANG, J., LU, J. M. et al. (2001). Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 2001 (434): 29-34.
- [85] YOGESWARAN, U., CHEN, S. M. (2008). A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. *Sensors*, 2008 (8): 290- 313.
- [86] LIU, K. P., ZHANG, J. J., et al. (2011). Graphene-assisted dual amplification strategy for the fabrication of sensitive amperometric immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011 (26): 3627-3632 .

- [87] SILVA, B. V. M., CAVALCANTI, I. T., et al. (2013). A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. *Talanta*, 2013 (117): 431-437.
- [88] LEE, C. H., LIN, T. S. et al. (2009). Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*, 2009 (4): 165-179.
- [89] RONKAINEN, N. J., OKON, S. L. (2014). Nanomaterial-Based Electrochemical Immunosensors for Clinically Significant Biomarkers. *Materials*, 2014 (7): 4669- 4709.
- [90] WANG, J., LIU, G. D., et al. (2006). Electroactive silica nanoparticles for biological labeling. *Small*, 2006 (2): 1134-1138.
- [91] TANG, J., TANG, D. P., et al. (2012). Hierarchical dendritic gold microstructure-based aptasensor for ultrasensitive electrochemical detection of thrombin using functionalized mesoporous silica nanospheres as signal tags. *Analytica Chimica Acta*, 2012 (720): 1-8.
- [92] WANG, J., LIU, G. D., et al. (2004). Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *Journal of the American Chemical Society*, 2004 (126): 3010- 3011 .
- [93] KUMAR, S., AHLAWAT, W., et al. (2015). Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015 (70): 498-503.
- [94] AHIRWAL, G. K., MITRA, C. K. (2010). Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010 (25): 2016-2020
- [95] HONG, C. L., YUAN, R., et al. (2012). A strategy for signal amplification using an amperometric enzyme immunosensor based on HRP modified platinum nanoparticles. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012 (664): 20-25.
- [96] YANG, R. MIAO, D. D., et al. (2015). Ultrasensitive electrochemical sensor based on CdTe quantum dots-decorated poly(diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene nanocomposite modified glassy carbon electrode for the determination of puerarin in biological samples. *Electrochimica Acta*, 2015 (173): 839-846

- [97] WANG, J., LIU, G. D., et al. (2003). Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *Journal of the American Chemical Society*, 2003 (125): 3214-3215.
- [98] SATIJA, J., SAI, V. V. R. et al. (2011). Dendrimers in biosensors: Concept and applications. *Journal of Materials Chemistry*, 2011 (21): 14367-14386.
- [99] ENDO, T., FUKUNAGA, T., et al. (2006). Scavenging DPPH radicals catalyzed by binary noble metal-dendrimer nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006 (302): 516-521.
- [100] SVOBODOVA, L., SNEJDARKOVA, M., et al. (2002). Properties of glucose biosensors based on dendrimer layers. Effect of enzyme immobilization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002 (373): 735-741.
- [101] HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. (2009). *Základy imunologie*. 4.vydání. Praha : Nakladatelství TRITON, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- [102] HERMANSON, G.T. (2013). *Bioconjugate Techniques*. B.m.: Academic Press, 2013. 3rd Edition. ISBN 978-0-12-382239-0.
- [103] EISSA, S., L'HOCINE, L., et al. (2013). A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin. *The Analyst*. 2013, 138(15). DOI: 10.1039/c3an36883a. ISSN 0003-2654.
- [104] OWINO, J., AROTIBA, O., et al. (2008). Electrochemical Immunosensor Based on Polythionine/Gold Nanoparticles for the Determination of Aflatoxin B1. *Sensors*. 2008, 8(12), 8262-8274. DOI: 10.3390/s8128262. ISSN 1424-8220.
- [105] LIU, X., DUCKWORTH, P. A., et al. (2010). Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, 25(6), 1467-1473. DOI: 10.1016/j.bios.2009.10.047. ISSN 09565663.
- [106] WANG, J., LU, J., et al. (2000). Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry. *Analytical Chemistry*. 2000, 72(14), 3218-3222. DOI: 10.1021/ac000108x. ISSN 0003-2700.

- [107] RANJAN, R., ESIMBEKOVA, E. N., et al. (2017). Rapid biosensing tools for cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, 87, 918-930. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.061. ISSN 09565663.
- [108] ŠVANCARA, I., WALCARIUS, A., et al. (2009). Carbon paste electrodes in the new millennium. *Open Chemistry*. 2009, 7(4). DOI: 10.2478/s11532-009-0097-9. ISSN 2391-5420.
- [109] HOČEVAR, S. B., OGOREVC, B., et al. (2002). A Study on Operational Parameters for Advanced Use of Bismuth Film Electrode in Anodic Stripping Voltammetry. *Electroanalysis*. 14(24), 1707-1712. DOI: 10.1002/elan.200290014. ISSN 10400397.
- [110] KEFALA, G. (2003). A study of bismuth-film electrodes for the detection of trace metals by anodic stripping voltammetry and their application to the determination of Pb and Zn in tapwater and human hair. *Talanta*. 2003, 61(5), 603-610. DOI: 10.1016/S0039-9140(03)00350-3. ISSN 00399140.
- [111] YÁÑEZ-SEDEÑO, P., CAMPUZANO, S., et al. (2016). Magnetic Particles Coupled to Disposable Screen Printed Transducers for Electrochemical Biosensing. *Sensors*. 2016, 16(10). DOI: 10.3390/s16101585. ISSN 1424-8220.
- [112] ROMANAZZO, D., RICCI, F., et al. (2010). Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, 25(12), 2615-2621. DOI: 10.1016/j.bios.2010.04.029. ISSN 09565663.
- [113] ARORA, S., AHMED N. et al. (2018). Detecting food borne pathogens using electrochemical biosensors. *International journal of chemical studies*. 2018, 6 (1), 1031 - 1039. ISSN 2321-4902.
- [114] ADLEY, C.C. a M.P. RYAN. Conductometric biosensors for high throughput screening of pathogens in food. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*. Elsevier, 2015, 2015, s. 315-326. DOI: 10.1016/B978-0-85709-801-6.00014-9. ISBN 9780857098016.

- [115] ERCOLE, C., GALLO, M. D., et al. (2002). A biosensor for *Escherichia coli* based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2002, 83(1-3), 48-52. DOI: 10.1016/S0925-4005(01)01027-9. ISSN 09254005.
- [116] ROSSETTI, C., POMATI, F., et al. (2001). Microorganisms' activity and energy fluxes in lake Varese (Italy): a field method. *Water Research*. 2001, 35(5), 1318-1324. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00362-6. ISSN 00431354.
- [117] VARSHNEY, M. and LI, Y. (2007). Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22(11), 2408-2414. DOI: 10.1016/j.bios.2006.08.030. ISSN 09565663.
- [118] SHAMS, S., BAKHSHI, B., et al. (2019). A sensitive gold-nanorods-based nanobiosensor for specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019, 17(1). DOI: 10.1186/s12951-019-0476-0. ISSN 1477-3155
- [119] BRANDÃO, D., LIÉBANA, S., et al. (2015). Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles. *New Biotechnology*. 2015, 32(5), 511-520. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.03.011. ISSN 18716784.
- [120] JANSIENTO, W., JANGPATARAPONGSA, K., et al. (2016). Detection of *Campylobacter* DNA using magnetic nanoparticles coupled with PCR and a colorimetric endpoint system. *Food Science and Biotechnology*. 2016, 25(1), 193-198. DOI: 10.1007/s10068-016-0029-3. ISSN 1226-7708.
- [121] WILSON, D., MATERÓN, E. M., et al. (2019). Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides. *Talanta*. 2019, 194, 611-618. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.089. ISSN 00399140.
- [122] LI, S., LIU, H., et al. (2013). Development of a Magnetic Nanoparticles Microarray for Simultaneous and Simple Detection of Foodborne Pathogens. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013, 9(7), 1254-1260. DOI: 10.1166/jbn.2013.1610. ISSN 15507033.

- [123] ZHANG, Y., WANG,H., et al. (2008). A reusable piezoelectric immunosensor using antibody-adsorbed magnetic nanocomposite. *Journal of Immunological Methods*. 2008, 332(1-2), 103-111. DOI: 10.1016/j.jim.2007.12.019. ISSN 00221759.
- [124] SILVA, N. F. D., MAGALHÃES, J. M. C. S., et al. (2019). In situ formation of gold nanoparticles in polymer inclusion membrane: Application as platform in a label-free potentiometric immunosensor for *Salmonella typhimurium* detection. *Talanta*. 2019, 194, 134-142. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.024. ISSN 00399140.
- [125] OH, S. Y., HEO, N. S., et al. (2017). Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of *Salmonella typhimurium* in pork meat. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). DOI: 10.1038/s41598-017-10188-2. ISSN 2045-2322.
- [126] XUE, L., ZHENG, L., et al. (2018). An ultrasensitive fluorescent biosensor using high gradient magnetic separation and quantum dots for fast detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, 265, 318-325. DOI: 10.1016/j.snb.2018.03.014. ISSN 09254005.
- [127] VIJIAN, D., CHINNI, S. V., et al. (2016). Non-protein coding RNA-based genosensor with quantum dots as electrochemical labels for attomolar detection of multiple pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, 77, 805-811. DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.057. ISSN 09565663.
- [128] HAO, X., YEH, P., et al. (2019). Aptamer surface functionalization of microfluidic devices using dendrimers as multi-handled templates and its application in sensitive detections of foodborne pathogenic bacteria. *Analytica Chimica Acta*. 2019, 1056, 96-107. DOI: 10.1016/j.aca.2019.01.035. ISSN 00032670.
- [129] D'SOUZA, S.F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, 16(6), 337-353. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00125-7. ISSN 09565663.
- [130] LAWRENCE, N. S., DEO, R. P., et al. (2004). Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes. *Talanta*. 2004, 63(2), 443-449. DOI: 10.1016/j.talanta.2003.11.024. ISSN 00399140.

- [131] SUN, Y., BAI, Y., et al. (2007). Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with magnetic microbeads. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 23(4), 473-478. DOI: 10.1016/j.bios.2007.06.016. ISSN 09565663.
- [132] LEONARD, P., HEARTY, S., et al. (2003). 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. ISSN 01410229.
- [133] ARAYA-KLEINSTEUBER, B., ROQUE, A. C. A., et al. (2006). Magnetic acoustic resonance immunoassay (MARIA): a multifrequency acoustic approach for the non-labelled detection of biomolecular interactions. *Journal of Molecular Recognition*. 2006, 19(4), 379-385. DOI: 10.1002/jmr.790. ISSN 0952-3499.
- [134] SRBOVA, J., KRULISOVA, P., et al. (2018). Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed. *ELECTROPHORESIS*. 2018, 39(3), 526-533. DOI: 10.1002/elps.201700257. ISSN 01730835.
- [135] SILVA, N. F. D., ALMEIDA, C. M. R., et al. (2019). Development of a disposable paper-based potentiometric immunosensor for real-time detection of a foodborne pathogen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, 141. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111317. ISSN 09565663.
- [136] LEVA-BUENO, J., PEYMAN, S. A., et al. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Medical Microbiology and Immunology*. 2020, 209(3), 343-362. DOI: 10.1007/s00430-020-00668-0. ISSN 0300-8584
- [137] JAMPASA, S., LAE-NGEE, P., et al. (2019). Electrochemical immunosensor based on gold-labeled monoclonal anti-LipL32 for leptospirosis diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, 142. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111539. ISSN 09565663.
- [138] SILVA, N.a F.D., NEVES, M. M. P. S., et al. (2020). Electrochemical immunosensor towards invasion-associated protein p60: An alternative strategy for *Listeria monocytogenes* screening in food. *Talanta*. 2020, 216. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120976. ISSN 00399140.
- [139] BU, S-J., WANG, K-Y., et al. (2019). Immunoassay for pathogenic bacteria using platinum nanoparticles and a hand-held hydrogen detector as transducer. Application to the

detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Microchimica Acta*. 2019, 186(5). DOI: 10.1007/s00604-019-3409-6. ISSN 0026-3672.

[140] CHE, Y., LI, Y., et al. (2001). Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, 16(9-12), 791-797. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00222-6. ISSN 09565663.

[141] WANG, S., SUN, Ch., et al. (2020). A homogeneous magnetic bead-based impedance immunosensor for highly sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical Engineering Journal*. 2020, 156. DOI: 10.1016/j.bej.2020.107513. ISSN 1369703X

[142] CAI, G., ZHENG, L., et al. (2019). A microfluidic immunosensor for visual detection of foodborne bacteria using immunomagnetic separation, enzymatic catalysis and distance indication. *Microchimica Acta*. 2019, 186(12). DOI: 10.1007/s00604-019-3883-x. ISSN 0026-3672.

[143] LUNA-MORENO, D., SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, A., et al. (2019). Early Detection of the Fungal Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR Immunosensor Method. *Sensors*. 2019, 19(3). DOI: 10.3390/s19030465. ISSN 1424-8220.

[144] MASDOR, N. A., ALTINTAS, Z., et al. (2016). Sensitive detection of *Campylobacter jejuni* using nanoparticles enhanced QCM sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, 78, 328-336. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.033. ISSN 09565663.

[145] DEGHANI, Z., MOHAMMADNEJAD, J., et al. (2020). Whole cell FRET immunosensor based on graphene oxide and graphene dot for *Campylobacter jejuni* detection. *Food Chemistry*. 2020, 309. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125690. ISSN 03088146.

[146] SINGH, R., MUKHERJEE, M. D., et al. (2014). Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014, 197, 385-404. DOI: 10.1016/j.snb.2014.03.005. ISSN 09254005.

[147] HASSAN, A., DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A. et al. (2015). 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, 511-515. DOI: 10.1016/j.bios.2014.09.019. ISSN 09565663

[148] SAPSFORD, K. E., RASOOLY, A., et al. (2004). Detection of *Campylobacter* and *Shigella* Species in Food Samples Using an Array Biosensor. *Analytical Chemistry*. 2004, 76(2), 433-440. DOI: 10.1021/ac035122z. ISSN 0003-2700.

[149] MURASOVA, P., KOVAROVA, A., et al. (2020). Direct culture-free electrochemical detection of cells in milk based on quantum dots-modified nanostructured dendrons. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2020, 863. DOI: 10.1016/j.jelechem.2020.114051. ISSN 15726657.