

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Sensory pro detekci bakterií v ranách  
Eliška Kendzierská

Bakalářská práce  
2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška Kendzierská**  
Osobní číslo: **C13336**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Sensory pro detekci bakterií v ranách**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na moderní metody používané pro detekci bakterií v ranách.
2. Z nejnovějších odborných publikací popište studie zabývající se využitím sensorů pro detekci bakterií (princip detekce, které mikroorganismy byly detekovány, jakých výsledků autoři dosáhli).
3. Konkrétní detekce zhodnoťte a popište jejich výhody a nevýhody.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petra Mořková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

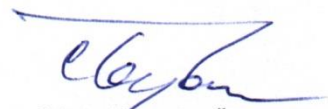
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

**Prohlašuji:**

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

.....  
Eliška Kendzierská

## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Petře Mořkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zaměřuje na detekci bakterií v ranách, především pomocí biosensorů. V úvodu práce jsou popsány akutní a chronické rány a bakterie vyskytující se v ranách. Dále jsou uvedeny všeobecné principy jednotlivých biosensorů. Hlavní část práce podrobně popisuje studie, zabývající se použitím jednotlivých sensorů pro detekci konkrétních mikroorganismů. V závěru jsou porovnány výhody a nevýhody jednotlivých studií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Sensory, elektronický nos, uhlíková vlákna, akutní a chronické rány

## **TITLE**

Sensors for the detection of bacteria in wounds

## **ANNOTATION**

Bachelor thesis is focused on the detection of bacteria in the wounds using biosensors. In the introduction of the thesis acute and chronic wounds are described and also bacteria occurring in the wounds are mentioned. The following part describes the general principles of biosensors. The main part of the thesis deals with the using of individual sensors for detection of specific microorganisms. In the end, the advantages and disadvantages of the individual studies are compared.

## **KEYWORDS**

Sensors, electronic nose, carbon fibers, acute and chronic wounds

# OBSAH

## SEZNAM OBRÁZKŮ

## SEZNAM TABULEK

## SEZNAM ZKRATEK

ÚVOD.....	13
<b>1 Rány .....</b>	<b>14</b>
1.1 Akutní rány .....	14
1.2 Chronické rány.....	14
<b>2 Bakterie v ranách .....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.3 Methicillin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.4 <i>Enterococcus</i> .....	17
2.5 <i>Serratia marcescens</i> .....	17
2.6 <i>Proteus mirabilis</i> .....	17
<b>3 Moderní metody pro detekci bakterií v ranách .....</b>	<b>18</b>
3.1 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem .....	18
3.1.1 Princip .....	18
3.1.2 Matrice používaná v MALDI-TOF MS .....	18
3.1.3 Postup.....	19
3.1.4 Závěr .....	20
3.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase .....	20
3.2.1 Princip .....	20
3.2.2 Sondy v real-time PCR.....	21
3.2.3 Postup.....	21
3.2.4 Závěr .....	22
3.3 Fluorescenční in situ hybridizace.....	22
3.3.1 Princip .....	22
3.3.2 Sondy v metodě FISH .....	22
3.3.3 Postup.....	23
<b>4 Sensory.....</b>	<b>26</b>
4.1 Elektrochemické biosensory .....	26
4.1.1 Potenciometrické biosensory .....	27

4.1.2	Ampérometrické biosensory .....	28
4.1.3	Impedimetrické biosensory .....	28
4.2	Optické biosensory.....	28
4.2.1	Piezoelektrické biosensory.....	29
4.2.2	Fluorescence.....	29
4.2.3	Luminiscence .....	29
4.2.4	Absorbance.....	29
4.2.5	SPR biosensory .....	29
4.3	Kalorimetrické biosensory .....	30
<b>5</b>	<b>Biosensory pro detekci bakterií v ranách.....</b>	<b>31</b>
5.1	Sensor z uhlíkových vláken pro elektrochemickou detekci pyocyaninu produkovaného <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1).....	31
5.2	Sensor z uhlíkových vláken pro elektrochemickou detekci pyocyaninu produkovaného <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2).....	31
5.3	Integrované elektrochemické sensory z uhlíkových vláken pro snímání ran.....	33
5.4	Plně mikrofabrikovaný elektrochemický sensor pro detekci methicillin rezistentního <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
5.5	Elektronický nos .....	37
5.5.1	PEN3 .....	37
5.5.2	Cyranose320.....	38
5.6	Elektrochemický sensor pro detekci bakteriálních virulenčních faktorů <i>Staphylococcus aureus</i> a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	38
5.7	Sensorové materiály pro detekci aktivity lidské neutrofilní elastázy a aktivity katepsinu G v tekutině z rány.....	39
5.8	Elektronický nos .....	41
5.9	Porézní křemíkové rezonanční mikrotvary pro detekci <i>S. aureus</i> .....	41
5.10	Obvaz s lipidovými vezikuly pro detekci <i>S. aureus</i> a <i>P. aeruginosa</i> .....	42
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>45</b>



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma hmotnostního spektrometru .....	19
Obrázek 2 Schéma metody FISH.....	23
Obrázek 3 Schéma biosensoru s elektrochemickým převodníkem .....	27
Obrázek 4 Složení sensoru z uhlíkových vláken .....	31
Obrázek 5 A Schéma procesu laminace; B Prototyp snímací sestavy.....	33
Obrázek 6 Square wave záznam - stanovení urátu .....	34
Obrázek 7 Schematické znázornění $\mu$ ECS .....	35
Obrázek 8 Mechanizmy povrchové modifikace pro (a) detekci založenou na redoxním markeru a (b) detekci na bázi enzymu .....	36
Obrázek 9 Zařízení PEN3 pro sběr dat .....	37
Obrázek 10 Zařízení Cyranose320 pro sběr dat.....	38
Obrázek 11 Histogramy znázorňující reakce redoxního proudu na supernatanty bakterií.....	39
Obrázek 12 Jednoduché prototypové obvazy: odezva modifikované tkaniny po růstu bakterií přes noc na polypropylenové tkanině .....	43

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Přehled nejčastěji stanovených mikroorganismů v ranách .....	15
Tabulka 2 Aktivita HNE a CatG ve vzorcích infikovaných ranách .....	40

## SEZNAM ZKRATEK

μECS	mikroelektrochemický sensor (microelectrochemical sensor)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CatG	katepsin G
CCD	CCD kamera (charge-coupled device)
CLSM	konfokální laserový skenovací mikroskop (confocal laser scanning microscopy)
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DNA	deoxyribonukleová kyselina (desoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded desoxyribonucleic acid)
EN	elektronický nos (electronic nose)
FA	kyselina ferulová
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescence in situ hybridization)
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)
HCCA	kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová
HNE	4-hydroxy-2-nonenal (lidská neutrofilní elastáza)
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted Laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)
MEMS	mikroelektromechanický systém (microelectromechanical system)
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFC	ferikyanid draselný
PMNs	polymorfonukleární neutrofilny
PMS	fenazin methosulfát
PNA	peptidonukleová kyselina (peptide nucleic acid)
pSiRM	porézní křemíkový rezonanční mikrotvar
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)

SA	kyselina sinapová
SAM	samonasávací monovrstva
spp.	druhy
Srt	sortáza
SWV	square wave voltametrie
T <sub>M</sub>	teplota tání (melting temperature)

## ÚVOD

Chronické rány představují v dnešní době velký socioekonomický problém. Hlavním problémem je zdlouhavé hojení. Velkou komplikací je vstup mikroorganismů do rány, což může vést k rozvoji infekčních komplikací. To prodlužuje dobu léčby a v horším případě může dojít až k amputaci končetiny. Zdlouhavá léčba také souvisí s vysokými náklady. Mikroorganismy si postupem času vytvářejí čím dál větší rezistenci vůči antibiotikům, proto je léčba chronických ran stále obtížnější. Proto je snaha vyvinout technologii pro rychlou detekci bakterií v ranách. Jednou z možností je využití biosensorů, na které je tato práce zaměřena.

Bakterie, které mohou kolonizovat ránu, jsou buď aerobní, nebo anaerobní. Některé z nich mohou být producenti biofilmu a to také přispívá k prodloužení léčby.

Klasické kultivační metody jsou zdlouhavé a stanovení přítomných bakterií může trvat i několik dní. Moderní technologie jako jsou například MALDI-TOF MS, FISH a real-time PCR mohou detekci bakterií o něco urychlit. Stále ještě však potřebují před svým použitím bakterie vykultivované na agaru.

Samotné biosensory představují budoucnost v detekci bakterií. Sensory jsou rozděleny z různých hledisek do několika skupin. Nejdůležitějším rozdělením je dělení dle způsobu přenosu signálu a nejvyužívanější z nich jsou sensory elektrochemické. Je popsána řada studií, které využívají konkrétní biosensor a většinou jsou zaměřeny na určitý mikroorganismus. Některé z biosensorů jsou založeny na nepřímé detekci a ostatní na detekci přímé, k čemuž je použit exsudát přímo z infikované rány. Každý z biosensorů má své výhody i nevýhody. Biosensory jsou velmi rychlou a levnou volbou pro detekci bakterií v ráně.

# 1 Rány

Rány mohou být klasifikovány buď jako akutní nebo jako chronické. Akutní jsou více náchylné k infekci, než chronické (McGuckin *et al.*, 2003).

## 1.1 Akutní rány

Akutní rány jsou definovány jako ty, které vykazují známky hojení v době kratší než čtyři týdny. Nejčastější akutní rány jsou rány pooperační (McGuckin *et al.*, 2003).

Akutní rány zahrnují pooperační rány, traumatická zranění a popáleniny (Fletcher, 2008).

## 1.2 Chronické rány

Chronické rány nemají normální proces hojení a doba hojení je delší než čtyři týdny (McGuckin *et al.*, 2003). Infekce chronických ran jsou zodpovědné za značnou nemocnost a značně přispívají ke stupňování nákladů na zdravotní péči (Siddiqui *et al.*, 2010).

Chronické rány jsou kolonizovány polymikrobiální flórou, která obsahuje komenzální mikroorganismy, jako jsou stafylokoky, streptokoky, *Pseudomonas spp.* a koliformní bakterie (Gentili *et al.*, 2012). V chronických ranách je nízká hladina kyslíku a to v kombinaci s nekrotickou tkání usnadňuje růst anaerobů (Gentili *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2010), proto jich je v chronických ranách větší podíl (Siddiqui *et al.*, 2010). Úloha bakterií v ráně závisí na jejich koncentraci, druhovém složení a hostitelské reakci (Gentili *et al.*, 2012).

Většina patogenů chronických ran, jako jsou methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a *Pseudomonas spp.*, jsou producenti biofilmu. Bakterie, které se nachází uvnitř biofilmu, jsou vysoce odolné vůči tradiční léčbě. Bakterie v biofilmu rostou pomaleji a pomalejší růst může vést ke snížení absorpce léku a dalších fyziologických změn, které by mohly narušit účinnost léku (Siddiqui *et al.*, 2010).

Chronické rány zahrnují především bércové vředy, proleženiny (dekubity), diabetickou nohu a komplikovaně se hojící rány (Rhoads *et al.*, 2012; Fletcher, 2008). Nejčastěji se vyskytující bakterie u diabetické nohy jsou *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*,  $\beta$ -hemolytické streptokoky a *Klebsiella pneumoniae*.

Nejčastěji izolovanými organismy jsou *Staphylococcus aureus* a koaguláza negativní stafylokoky (Siddiqui *et al.*, 2010).

## 2 Bakterie v ranách

Složení bakteriální mikroflóry se liší dle typu rány. Tabulka 1 uvádí 5 nejčastěji se vyskytujících mikroorganismů v různých typech ran. Mikroorganismy byly stanoveny jak kultivačně, tak metodami molekulárně biologickými.

Tabulka 1 Přehled nejčastěji stanovených mikroorganismů v ranách (upraveno dle Rhoads *et al.*, 2012)

Typ rány	Počet vzorků	Kmeny (klasická kultivační metoda)	Kmeny (molekulárně biologické metody)
Dekubitový vřed	24	<i>Enterococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
		<i>Staphylococcus</i>	<i>Peptoniphilus</i> *
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Anaerococcus</i> *
		<i>Proteus</i>	<i>Bacteroides</i> *
Vředy diabetických končetin	40	<i>Enterococcus</i>	<i>Anaerococcus</i> *
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Peptoniphilus</i> *
		<i>Streptococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Fingoldia</i> *
		<i>Staphylococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Operační rány	23	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Staphylococcus</i>
		<i>Enterococcus</i>	<i>Bacteroides</i> *
		-	<i>Prevotella</i>
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>
Žilní vředy	49	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
		-	<i>Staphylococcus</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Bacteroides</i> *
		<i>Streptococcus</i>	<i>Prevotella</i>
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Peptoniphilus</i> *
Trauma/absces	32	-	<i>Staphylococcus</i>
		<i>Staphylococcus</i>	<i>Prevotella</i>
		<i>Enterococcus</i>	<i>Bacteroides</i> *
		<i>Serratia</i>	<i>Peptoniphilus</i> *
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Corynebacterium</i>

Anaerobní bakterie jsou označovány \*

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* je bakterie, která přispívá k prodloužení hojení u chronických ran (Sharp *et al.*, 2010). Je to gramnegativní, nefermentující aerobní tyčinka, která je běžným patogenem u nozokomiálních infekcí, zejména u pacientů s pneumonií spojenou s ventilátorem, cystickou fibrózou, chronickými ranami a popáleninami. Jedním z hlavních

faktorů, přispívajících k patogenitě *P. aeruginosa* v prostředí zdravotní péče, je schopnost tvořit biofilm (Sismaet *et al.*, 2016).

V roce 1981 bylo testováno 835 kmenů *P. aeruginosa* a zjistilo se, že 96-98 % kmenů produkuje pyocyanin, což je derivát fenazinu. Ten je zodpovědný za charakteristickou modrozelenou barvu druhů *Pseudomonas* a působí jako faktor virulence (Sismaet *et al.*, 2016).

Redox-aktivní vlastnosti pyocyaninu lze využít při elektrochemickém stanovení přítomnosti *P. aeruginosa* (Sismaet *et al.*, 2016).

## **2.2 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* je grampozitivní, kataláza pozitivní bakterie nacházející se na lidské kůži a sliznicích. *S. aureus* má několik faktorů virulence zodpovědných za jeho přežití během kolonizace a infekce hostitele. Tyto faktory virulence jsou běžně přítomny na povrchu organismu nebo jsou vylučovány do hostitelského prostředí. Využívá své virulenční faktory k úniku z vrozené imunitní odpovědi nebo k poškození tkání a buněk (Krismastuti *et al.*, 2016).

Sortáza (Srt), membránově zakotvená transpeptidáza, je odpovědná za ukotvení faktorů virulence na povrchu buněk, které se podílejí na procesech adheze a virulence do tlusté peptidoglykanové vrstvy hostitelské buňky, a proto je nezbytná pro patogenezí. Tento protein je důležitý v bakteriálním přežití během infekcí a byl identifikován u *S. aureus* jako dvě enzymové izoformy, SrtA a SrtB, ale pouze SrtA je exprimována konstitutivně a má důležitou úlohu k ukotvení povrchových proteinů. Proto byla SrtA prokázána jako slibný cíl pro antibakteriální terapii a pro léčbu chorob způsobených grampozitivní bakteriální infekcí včetně bakteriální infekce u chronických ran. Biosensory schopné detekovat SrtA ve velmi nízkých koncentracích mohou nabídnout velký potenciál jako diagnostické nástroje pro bakteriální infekci rány (Krismastuti *et al.*, 2016).

## **2.3 Methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus***

Methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je bakterie rezistentní vůči mnoha antibiotikům, jako je methicillin, oxacilin a penicilin. Přestože pro detekci MRSA pomocí biosensorů na bázi mikroeletromechanického systému (MEMS) byly použity různé biologické markery, nejslibnější je detekce genu *mecA*, který indikuje rezistenci na methicillin.



## **2.4 *Enterococcus***

Enterokoky jsou důležité lidské patogeny, které jsou stále odolnější vůči antimikrobiálním látkám. K dnešnímu dni bylo popsáno 12 druhů patogenních pro člověka, včetně nejčastějších lidských izolátů, *E. faecalis* a *E. faecium*. Jsou nyní třetím nejčastějším organismem, který se vyskytuje u nozokomiálních infekcí. Enterokoky mají velké množství jak vlastních, tak získaných rezistentních znaků, včetně rezistence na cefalosporiny, klindamycin, tetracyklin a peniciliny odolné proti penicilinázám, jako je například oxacilin. Známými znaky rezistence jsou rezistence na penicilinázu a rezistence na vankomycin (Murray, 1990).

Do rodu *Enterococcus* patří grampozitivní, fakultativně anaerobní organismy, které mají kulatý tvar a mohou se vyskytovat buď jako jednotlivé buňky, v párech nebo jako krátké řetízky. Tyto organismy nemají cytochromové enzymy a jsou tak kataláza negativní, i když některé kmeny produkují pseudokatalázu (Murray, 1990).

## **2.5 *Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* se stala důležitou příčinou nozokomiálních infekcí (Hejazi and Falkiner, 1997).

Byla definována jako gramnegativní, oxidáza negativní bakterie produkující DNázu. Produkuje červený pigment, prodigiosin (Hejazi and Falkiner, 1997).

## **2.6 *Proteus mirabilis***

*Proteus mirabilis* je pohyblivá gramnegativní bakterie, může mít tvar od krátkých, vegetativních buněk až po prodloužené formy. Typický je plazivý růst (Moblely and Belas, 1995).

## 3 Moderní metody pro detekci baterií v ranách

### 3.1 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

Identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) je vysoce přesná, rychlá, aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s tradičními metodami. Čas identifikace se snižuje z 24 až 48 hodin na méně než jednu hodinu (Croxatto *et al.*, 2012).

#### 3.1.1 Princip

Tato metoda detekuje bakteriální proteiny (Wang *et al.*, 1998) a vytváří charakteristické hmotnostní spektrální otisky, které jsou jedinečné pro každý mikroorganismus a jsou proto ideální pro přesnou mikrobiální identifikaci na rodové a druhové úrovni a z tohoto důvodu má metoda potenciál být použita pro kmenovou typizaci a identifikaci (Croxatto *et al.*, 2012). Je to šetrná metoda, kdy biomolekuly nejsou po ataku laseru štěpeny, ale pouze ionizovány pomocí matrice (Bursová *et al.*, 2014).

#### 3.1.2 Matrice používaná v MALDI-TOF MS

Důležitým faktorem analýzy je výběr matrice (Huong *et al.*, 2014). Matrice je složena z molekul malých kyselin, které mají silnou optickou absorpci v rozsahu vlnové délky použitého laseru. Složení matrice se mění v závislosti na biomolekulách, které mají být analyzovány a na typu použitého laseru (Croxatto *et al.*, 2012).

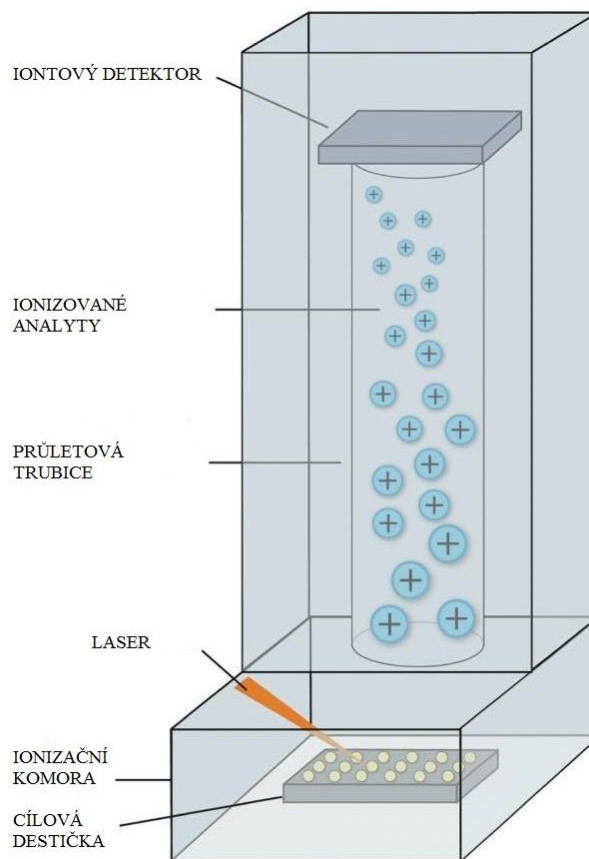
Matrice zajišťuje kontakt analyzované molekuly s laserem tak, aby biomolekula nebyla atakována přímo a štěpena nežádoucím způsobem (Bursová *et al.*, 2014).

Nejčastěji používané matrice jsou kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB),  $\alpha$ -kyano-4-hydroxykořicová kyselina (HCCA), kyselina sinapová (SA), kyselina ferulová (FA), a 2,4-hydroxyfenyl benzoová kyselina. Bylo prokázáno, že FA, SA, a HCCA jsou účinné pro detekci proteinů biomarkerů a DHB se zdá být nejlepší volbou pro detekci glykopeptidů a glykoproteinů. Velikost a intenzita píků detekovaných molekul je závislá na matrici. DHB a HCCA jsou obvykle optimální pro detekci s nižší hmotností iontů. Jak bylo prokázáno, SA a FA jsou lepší pro detekci větší hmotnosti iontů, avšak poskytují nižší citlivost než HCCA (Croxatto *et al.*, 2012).

### 3.1.3 Postup

Hmotnostní spektrometr, který je na obrázku 1, se skládá ze tří funkčních jednotek:

1. zdroje iontů pro ionizaci a přenos molekul iontů do plynné fáze
2. hmotnostního analyzátoru, který odděluje ionty podle jejich poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ )
3. detekčního zařízení pro sledování oddělených iontů (Croxatto *et al.*, 2012).



Obrázek 1 Schéma hmotnostního spektrometru (upraveno dle Patel, 2013)

MALDI-TOF MS analýza může být dokončena během několika minut za předpokladu, že bylo shromážděno dostatečné množství bakterií před hmotnostní spektrální analýzou. Obvykle, ale ne vždy, se nechají bakterie růst na kultivačních půdách. I když tento faktor může být považován za nevýhodu, je třeba poznamenat, že jiné metody molekulární biologie také vyžadují předběžné kroky před jejich použitím (Lay, 2001).

V MALDI analýze se vyberou bakteriální kolonie, pěstované na agaru, sterilní špičkou a rozetrou se v tenkém filmu na ocelovou vodivou destičku. Mikrobiální film se pak převrství

nadbytkem matrice, vybrané podle doporučení výrobce. Po smíchání dojde ke krystalizaci (Croxatto *et al.*, 2012; Seng *et al.*, 2009; Cherkaoui *et al.*, 2010).

Po krystalizaci matrice a vzorku na kovové destičce, se destička zavádí do hmotnostního spektrometru, kde je ozařována krátkými pulsy laserového záření z laseru. Matrice absorbuje energii z laseru vedoucí k odpařování matrice. Molekuly analytu jsou převáděny do plynné fáze. Laserová energie způsobuje strukturální rozklad ozařovaného krystalu a vytváří převážně jednotlivě nabitě ionty vzorku (Croxatto *et al.*, 2012; Jurinke *et al.*, 2004).

Ionty jsou unášeny pomocí kladně nabitého elektrického pole a jsou hnány přes kovovou průletovou trubici, kde jsou vystaveny vakuu. Pohybují se směrem k detektoru rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Bioanalyty jsou separovány podle času průletu, lehčí částice či více nabitě dorazí k detektoru dříve než těžší nebo méně nabitě. Získané hmotnostní spektrum se srovnává s databází pro identifikaci daného druhu nebo rodu (Croxatto *et al.*, 2012; Jurinke *et al.*, 2004; Patel 2013; Bursová *et al.*, 2014).

### **3.1.4 Závěr**

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla zavedena do rutinní mikrobiologické diagnostiky. Začíná se úspěšně využívat v různých oblastech mikrobiologie, nejen v klinické praxi. Metodou lze identifikovat bakterie, kvasinky a plísně izolované z různých biologických materiálů, potravin i vzorků prostředí (Bursová *et al.*, 2014).

## **3.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) v reálném čase je rychlejší než tradiční PCR a nevyžaduje postamplifikační manipulaci pro identifikaci bakterií (Melendez *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008).

Tato metoda představuje revoluci v diagnostice lidských patogenů (Espy *et al.*, 2006) a byla velmi užitečná pro studium mikrobiálních původců infekčních onemocnění, kde pomohla objasnit procesy nemoci (Mackay 2004).

### **3.2.1 Princip**

V této metodě je reakční směs obohacena o látky schopné fluorescence nebo fluorescenční sondy, které během reakce hybridizují v řetězcích vznikajících amplikonů. K emisi fluorescenčního záření dochází jen tehdy, pokud je v reakční zkumavce amplifikován templát, deoxyribonukleová kyselina (DNA) (Beránek 2016).

### 3.2.2 Sondy v real-time PCR

#### a) Hydrolyzační:

##### 5' nukleáza (Taqman) sondy

První fluorescenční sondy, které byly vyvinuty, byly 5' nukleáza sondy, které jsou běžně označovány TaqMan. TaqMan sonda je krátký oligonukleotid, který obsahuje na 5' konci fluorescenční barvivo a na 3' konci zhášec. Pro generování světelného signálu musí být splněny dvě podmínky. Za prvé, sonda se váže na komplementární řetězce DNA při teplotě 60 °C a za druhé při této teplotě Taq polymeráza, stejný enzym použitý pro PCR, musí štěpit 5' konec TaqMan sondy oddělením fluorescenčního barviva od zhášeče. Protože TaqMan sonda vyžaduje 60 °C pro efektivitu aktivity 5' nukleázy, teplota pro amplifikaci je v rozmezí 95 a 60 °C. Kromě toho se štěpené (volné) fluorescenční barvivo hromadí po každém cyklu, a proto může být měřeno kdykoliv v průběhu cyklů PCR, včetně hybridizačního kroku. To je rozdíl od molekulárních majáků a FRET hybridizačních sond, u kterých může být fluorescence měřena pouze během hybridizačního kroku (Espy *et al.*, 2006).

#### b) Hybridizační:

##### Molekulární majáky

Molekulární majáky jsou podobné TaqMan sondám. Tyto sondy mají fluorescenční barvivo na 5' konci a zhášec na 3' konci oligonukleotidové sondy. Oblast na každém konci sondy molekulárního majáku je navržena tak, aby byla komplementární sama k sobě. Centrální oblast sondy musí být komplementární s oblastí amplifikačního produktu PCR (Espy *et al.*, 2006).

##### FRET sondy

FRET hybridizační sondy, také označované jako LightCycler, představují třetí typ sond běžně používaných v real-time PCR. FRET hybridizační sondy jsou dvě sondy určené tak, aby hybridizovaly vedle sebe v konfiguraci „hlava-ocas“ v produktu PCR. První sonda má fluorescenční barvivo na 3' konci a druhá sonda má akceptor na 5' konci. Pokud obě sondy nasedají do cílového produktu PCR, fluorescence z 3' konce je absorbována sousedním akceptorem na 5' konci druhé sondy (Espy *et al.*, 2006).

### 3.2.3 Postup

Proces PCR může být rozdělen do tří kroků. Za prvé se dvouvláknová DNA (dsDNA) rozdělí na dva jednoduché řetězce při teplotě nad 90 °C. Za druhé, oligonukleotidové primery obecně nasedají při 50-60 °C a nakonec, syntéza DNA nastane při 70-78 °C. Teplota, při které

primer nasedá, se obvykle označuje jako  $T_M$ . To je teplota, při které se vytvoří 50% oligonukleotidových cílových duplexů (Mackay 2004).

### **3.2.4 Závěr**

Výsledky mohou rychle informovat lékaře, pokud jde o infekční stav pacienta, což umožňuje přesnější a včasné použití antibiotik. To může zkrátit dobu pobytu v nemocnici a zabránit zneužívání antibiotik, čímž se minimalizuje potenciál pro objevení rezistentních kmenů (Mackay 2004).

## **3.3 Fluorescenční in situ hybridizace**

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je levný, rychlý a specifický způsob, který nevyžaduje nákladné technické vybavení (Poppert *et al.*, 2005).

Umožňuje vizualizaci a identifikaci jednotlivých bakterií v jejich přirozeném prostředí (Moter and Göbel, 2000; Amann *et al.*, 2001).

### **3.3.1 Princip**

Fluorescenční in situ hybridizace detekuje specifické sekvence nukleových kyselin pomocí fluorescenčně značené sondy, která hybridizuje specificky ke komplementární cílené sekvenci v inaktivní buňce (Moter and Göbel, 2000).

### **3.3.2 Sondy v metodě FISH**

Oligonukleotidové sondy používané ve FISH metodě jsou dlouhé obecně mezi 15 a 30 páry bází (Amann *et al.*, 2001; Moter and Göbel, 2000). Existují různé způsoby značení. Přímé fluorescenční značení se používá nejčastěji a nevyžaduje žádné další kroky detekce po hybridizaci. Jeden nebo více fluorescenčních molekul barviva jsou přímo vázány na oligonukleotid buď chemicky, během syntézy prostřednictvím aminolinkeru na 5' konci sondy, nebo enzymaticky použitím terminální transferázy připojením fluorescenčně značených nukleotidů na 3' konci (Moter and Göbel, 2000). Lze aplikovat více sond současně, a tím se zaměřit na každou molekulu ribozomální ribonukleové kyseliny (rRNA) s více fluorofory (Amann *et al.*, 2001).

Polynukleotidové sondy se skládají z téměř plné délky 16S nebo 23S rRNA genů. Nicméně, sondy o této velikosti obsahují mnoho konzervovaných oblastí a jsou pouze schopné rozlišovat mezi vzdáleně příbuznými skupinami, jako jsou bakterie. Kratší polynukleotidové sondy, které cílí na definované variabilní oblasti přibližně 250 nukleotidů 23S rRNA, umožňují rozlišit rody jednotlivých bakterií (Amann *et al.*, 2001).

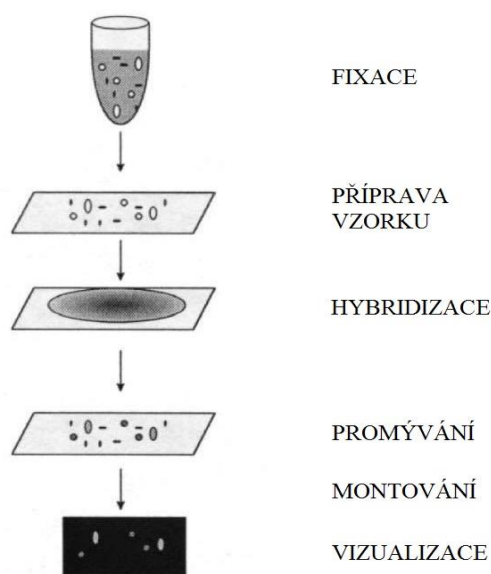
Tradičně značené DNA sondy hybridizují s jejich komplementárními cílenými nukleovými kyselinami (Moter and Göbel, 2000). Dále mohou být použity PNA sondy. Jsou to DNA analogy, mnohem chemicky stabilnější než oligonukleotidy, protože neexistuje žádné elektrostatické odpuzování mezi sondou PNA a záporně nabitými cukernými fosfáty cílové molekuly (Malic *et al.*, 2009; Amann *et al.*, 2001).

Ve srovnání s tradičními sondami DNA, PNA sondy mají vynikající hybridizační vlastnosti, včetně vyšší přesnosti a lepší hybridizační kinetiky, která je dána elektrickou neutralitou PNA sondy. Hybridizace PNA sondou může být provedena v pufru s nízkým obsahem soli, může být indukován pokles stability sekundárních struktur rRNA, což usnadňuje hybridizaci PNA sondy na méně přístupných cílech (Malic *et al.*, 2009). Fluorescenčně značené PNA sondy mohou nahradit oligonukleotidy (Amann *et al.*, 2001).

### 3.3.3 Postup

Bakterie obsahují 5S, 16S, 23S rRNA o délce přibližně 120, 1500 a 3000 nukleotidů. V drtivé většině se aplikace FISH sondy zaměřuje na 16S rRNA. Veřejné databáze nyní obsahují 16S rRNA sekvence pro většinu pěstovaných mikrobiálních druhů (Amann *et al.*, 2001).

Procedura zahrnuje kroky, které jsou zobrazeny na obrázku 2: fixaci vzorku; přípravu vzorku; hybridizaci s příslušnými sondami pro detekci odpovídajících cílových sekvencí; kroky promytí k odstranění nenavázaných sond (Moter and Göbel, 2000) a detekci značených buněk mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií (Amann *et al.*, 2001).



Obrázek 2 Schéma metody FISH (upraveno dle Moter and Göbel, 2000)

### 1. Fixace a příprava vzorku

In situ hybridizace byla úspěšně použita u většiny biologických tkání, včetně celých buněk, tkáňových řezů, chromozómů a izolovaných jader (Price, 1993). Před hybridizací musí být bakterie fixovány a permeabilizovány pro pronikání fluorescenčních sond do buňky a pro ochranu ribonukleové kyseliny (RNA). K fixaci lze použít srážecí činidla, jako je ethanol nebo methanol, a také lze použít činidla, jako jsou aldehydy, nebo jejich směsi. Fixační podmínky se mohou lišit v závislosti na cílovém organismu a typu vzorku nebo tkáně. Účinná fixace je rozhodující pro uspokojivé výsledky FISH. Optimální fixace by měla vést k dokonalému proniknutí sondy a zachování maximální úrovně cílové RNA (Moter and Göbel, 2000).

### 2. Denaturace

Před hybridizací se dvouřetězová sonda a cílová DNA musí teplem nebo alkalicky denaturovat. Časy a teploty pro tyto kroky se mění v závislosti na typu sondy a typu tkáně, s cílem zachování integrity tkáně a maximalizaci účinnosti hybridizace. Hybridizační kroky se obvykle provádí v malém objemu pufru (10-20  $\mu$ l) překrývající tkáně. Denaturace preparátu se uskutečňuje v horkém roztoku formamidu (Price, 1993).

### 3. Hybridizace

Hybridizace musí být prováděna za přísných podmínek pro správné nasedání sondy k cílové sekvenci. Samotná hybridizace se uskutečňuje ve vlhké tmavé komůrce při teplotě 37-50 °C. Na základě použité sondy se může pohybovat od 30 minut až po několik hodin (Moter and Göbel, 2000).

### 4. Promývání

Sklička se krátce opláchnou destilovanou vodou, aby se odstranily nenavázané sondy (Moter and Göbel, 2000).

### 5. Vizualizace

Po promytí jsou hybridizované sekvence detekovány přímo (Price, 1993). Pro mikroskopii může být použit konvenční epifluorescenční mikroskop. Použití CCD kamery a příslušného softwaru pro analýzu obrazu, umožňuje digitalizaci a manipulaci s obrázkem. Je to v současné době nejvíce citlivý systém a může být užitečný pro kritické vzorky, u nichž se očekává nízká intenzita signálu. Používá se pro mikroskopické stanovení počtu mikroorganismů (Moter and Göbel, 2000).

Další mikroskop používaný pro FISH je konfokální laserový skenovací mikroskop (CLSM). FISH signály lze zaznamenat také pomocí průtokového cytometru a i když neposkytuje žádné informace o morfologii či prostorovém rozložení mikroorganismů, může



to být užitečné pro automatizované, kvantitativní analýzy bakterií v suspenzi (Moter and Göbel, 2000).

## 4 Sensory

Sensory jsou zařízení, která zaznamenávají fyzikální, chemické nebo biologické změny a přeměňují je na měřitelný signál. Sensor obsahuje rozpoznávací prvek, který umožňuje selektivní odezvu na určitý analyt nebo skupinu analytů. Další hlavní součástí sensoru je převodník nebo detekční zařízení, které vytváří signál. Signálový procesor shromažďuje, zesiluje a zobrazuje signál (Ronkainen *et al.*, 2010).

Biosensory pro bakteriální detekci obecně zahrnují biologickou rozpoznávací složku, jako jsou receptory, nukleové kyseliny nebo protilátky, v těsném kontaktu s vhodným převodníkem (Ivnitski *et al.*, 1999; Lazcka *et al.*, 2007). V závislosti na způsobu přenosu signálu, lze biosensory rozdělit do čtyř základních skupin: elektrochemické, optické, hmotnostní a kalorimetrické (Ivnitski *et al.*, 1999).

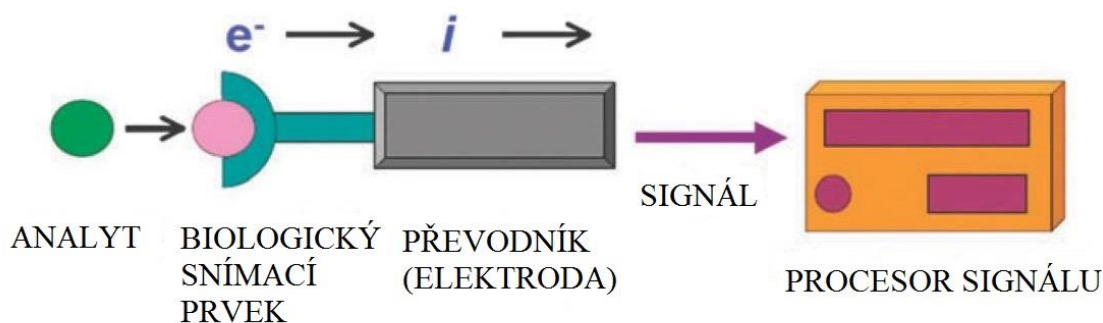
Kromě toho, mohou být biosensory klasifikovány do dvou širokých kategorií: biosensory pro přímou detekci cílového analytu a biosensory s nepřímou (značenou) detekcí. Přímé biosensory jsou navrženy takovým způsobem, že se biologicky specifické reakce přímo stanovují v reálném čase měřením fyzikálních změn vyvolaných tvorbou komplexu. Nepřímé detekční biosensory jsou ty, ve kterých probíhají předběžné biochemické reakce a produkty této reakce jsou pak detekovány snímačem (Ivnitski *et al.*, 1999).

Hlavní typy ran, které nejvíce využívají sensorovou technologii, jsou chronické vředy a v menší míře infikované akutní rány a velké popáleniny v plné tloušťce. Chronické vředy jsou obtížně léčitelné, vysoce náchylné k infekci a mohou způsobit dlouhodobé utrpení pro pacienta (Dargaville *et al.*, 2013).

### 4.1 Elektrochemické biosensory

Elektrochemické biosensory kombinují citlivost elektroanalytických metod s vlastní bioselektivitou biologické složky. Biologický ekvivalentní prvek (enzym, protein, protilátka, nukleová kyselina, buňka, tkáň nebo receptor) selektivně reaguje s cílovým analytem a produkuje elektrický signál, který souvisí s koncentrací zkoumaného analytu a je monitorovaný elektrochemickým převodníkem (Ronkainen *et al.*, 2010).

Schéma elektrochemického biosensory je zobrazeno na obrázku 3.



Obrázek 3 Schéma biosensoru s elektrochemickým převodníkem (upraveno dle Ronkainen *et al.*, 2010)

Techniky jsou obecně klasifikovány podle sledovaného parametru: proud (ampérometrické), potenciál (potenciometrické), nebo impedance (impedimetrické) (Lazcka *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2014; Ronkainen *et al.*, 2010; Pohanka and Skládal, 2008).

Ve srovnání s optickými metodami umožňuje elektrochemie pracovat se zakalenými vzorky a pořizovací cena zařízení je mnohem nižší. Na druhé straně elektrochemické metody představují poněkud omezenou selektivitu a citlivost než metody optické (Lazcka *et al.*, 2007).

Elektrochemické sensory jsou součástí elektrochemického článku, který se skládá buď ze tří, nebo ze dvou elektrod. Typický elektrochemický článek se třemi elektrodami se skládá z pracovní elektrody, referenční elektrody a pomocné elektrody. Pracovní elektrodu tvoří chemicky stabilní pevný, vodivý materiál jako je platina, zlato nebo uhlík. Referenční elektroda je argenchloridová a u pomocné elektrody se většinou jedná o platinový drátek. Systém dvou elektrod má pouze pracovní a referenční elektrodu (Ronkainen *et al.*, 2010).

Většina biosensorů využívá elektrochemickou detekci kvůli nízké ceně, snadnosti použití, přenosnosti a jednoduchosti konstrukce (Ronkainen *et al.*, 2010).

Tyto sensory se staly nejvíce rozvinutou skupinou s největším komerčním úspěchem a to především z důvodu ampérometrického biosensoru pro stanovení glukózy přímo z krve (Ahmed *et al.*, 2014).

#### 4.1.1 Potenciometrické biosensory

Potenciometrické sensory jsou založeny na bezproudovém měření rozdílového potenciálu mezi měřicí a srovnávací elektrodou (Kimmel *et al.*, 2013; Ronkainen *et al.*, 2010). Pro měření potenciálu v roztoku se používají iontově selektivní elektrody na základě specifické interakce s ionty v roztoku (Ahmed *et al.*, 2014; Pohanka and Skládal, 2008). Tato metoda měří změnu potenciálu, která se vyskytuje po rozpoznání analytu na pracovní elektrodě. Ačkoli je potenciometrie široce používána v oblasti biosensorů, příkladů

potenciometrických biosensorů pro detekci celých bakteriálních buněk je málo. Ve srovnání s jinými metodami, jako je impedimetrie, nemůže potenciometrie poskytovat specifické a citlivé signály pro velké analyty, jako jsou bakterie (Ahmed *et al.*, 2014).

#### **4.1.2 Ampérometrické biosensory**

Tato technika byla běžně použita ke stanovení široké škály analytů, včetně celých bakterií. Ampérometrické biosensory jsou založeny na přímém měření proudu, procházejícího mezi dvěma elektrodami ponořenými do roztoku elektrolytu (Ahmed *et al.*, 2014). Změny proudu jsou sledovány přímo s časem, zatímco u pracovní elektrody je vzhledem k referenční elektrodě udržován konstantní potenciál (Ronkainen *et al.*, 2010; Thévenot *et al.*, 2001). Složka bioreceptoru je běžně enzym, jako je glukosooxidasa. Generovaný proud je přímo úměrný koncentraci analytu, a proto je určení snadné (Ahmed *et al.*, 2014; Thévenot *et al.*, 2001). Ampérometrické biosensory mají výbornou citlivost (Ahmed *et al.*, 2014; Pohanka and Skládal, 2008).

#### **4.1.3 Impedimetrické biosensory**

Impedimetrické biosensory zaznamenávají buď impedanci ( $Z$ ) nebo odpor komponent ( $R$ ) a kapacitu ( $C$ ). Indukčnost má minimální vliv v typickém elektrochemickém uspořádání (Pohanka and Skládal, 2008).

Inverzní hodnota odporu se nazývá konduktance a z tohoto důvodu se takové systémy označují jako konduktometrické (Pohanka and Skládal, 2008).

Impedimetrické biosensory mají dvě elektrody s aplikovaným střídavým napětím, používají se amplitudy od několika do 100 mV (Pohanka and Skládal, 2008).

Impedimetrické biosensory jsou velmi slibnou volbou pro detekci celých bakterií, jsou méně nákladné než jiné systémy, vysoce citlivé, a nejsou ovlivněny přítomností jiných analytů nebo barevných látek v matrici vzorku (Ahmed *et al.*, 2014).

## **4.2 Optické biosensory**

Optické snímače jsou zvláště atraktivní pro aplikaci přímé detekce bakterií. Tyto sensory jsou schopné detekovat malé změny v indexu lomu nebo tloušťky, k nimž dochází, když se buňky váží na receptory imobilizované na měřicí ploše. Nejjednodušší optické biosensory měří změnu fluorescence nebo, méně často, absorpance nebo luminiscence na povrchu biosensoru po rozpoznání analytu (Ivnitski *et al.*, 1999).

#### **4.2.1 Piezoelektrické biosensory**

Piezoelektrické biosensory detekují změnu rezonanční frekvence, na křemenné krystalové mikrováze, která je výsledkem změny hmoty na povrchu sensoru v důsledku vazby analytu (Ivnitski *et al.*, 1999; Lazcka *et al.*, 2007).

#### **4.2.2 Fluorescence**

Fluorescence nastane, když je valenční elektron excitován z jeho základního stavu do stavu excitovaného. Excitace je vyvolána absorpcí světla s dostatečnou energií. Když se elektron vrátí do svého původního základního stavu, emituje foton na nižší energii. Dalším důležitým rysem fluorescence je malá tepelná ztráta a rychlá emise světla po absorpci (<10 ns). Vyzářené světlo má delší vlnovou délku než absorbované světlo, protože část energie je ztracena kvůli vibracím (Lazcka *et al.*, 2007).

#### **4.2.3 Luminiscence**

Luminiscence může být rozdělena do dvou částí. Jedná se o chemiluminiscenci a bioluminiscenci. Na rozdíl od fluorescence jsou excitované stavy způsobeny chemickou reakcí a tyto excitované stavy emitují světlo při návratu do základního stavu (Koyun *et al.*, 2012).

Bioluminiscenční mikrobiální biosensor měří změnu luminiscence vyzařovanou živými mikroorganismy (Su *et al.*, 2011).

#### **4.2.4 Absorbance**

Atom nebo molekula pohlcuje světelnou energii (absorbance). Molekula přebírá tuto energii a přemísťuje se do vyššího excitovaného energetického stavu ze stavu původního. Optická vlákna detekují přenášené a rozptýlené světlo skrz vlákno a pak mohou být získány hodnoty absorbancí (Koyun *et al.*, 2012).

#### **4.2.5 SPR biosensory**

Biosensory SPR měří změny indexu lomu způsobené strukturálními změnami v blízkosti tenkého kovového povrchu. Aktuální nástroje fungují následovně. Skleněná deska pokrytá tenkou vrstvou zlata je ozařována ze zadní strany p-polarizovaným světlem (z laseru) přes hemisferický hranol a odrazivost je měřena jako funkce úhlu dopadu (Lazcka *et al.*, 2007).

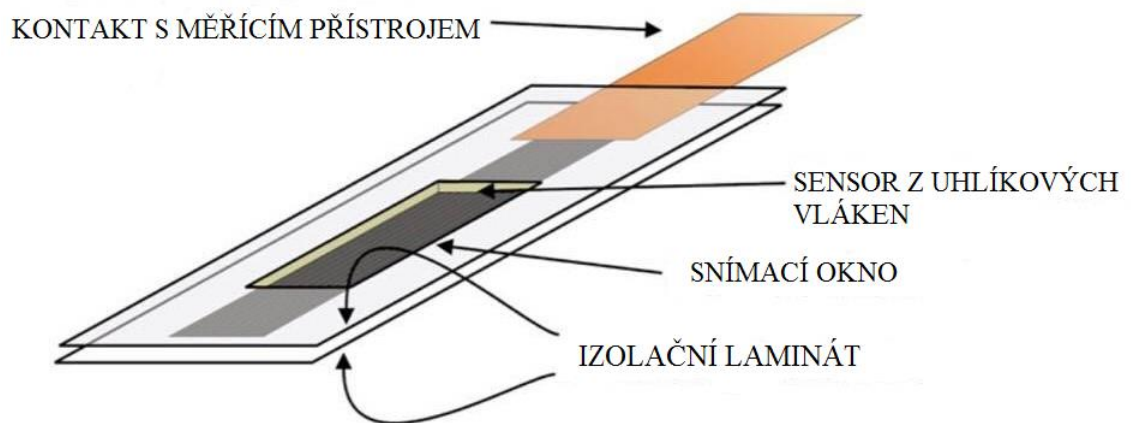
### **4.3 Kalorimetrické biosensory**

Pomocí kalorimetrických biosensorů měříme změny entalpie v reálném čase v biochemických reakcích a tepelné vlastnosti biologických tekutin (Zhang *et al.*, 2004).

## 5 Biosensory pro detekci bakterií v ranách

### 5.1 Sensor z uhlíkových vláken pro elektrochemickou detekci pyocyaninu produkovaného *Pseudomonas aeruginosa* (1)

Pyocyanin (1-hydroxy-5metylfenazin) je produkován *Pseudomonas aeruginosa* během kolonizace rány. Je derivátem fenazinu a způsobuje charakteristické modré zbarvení při infekcích ran. Jeho detekci se ve své studii zabývají Sharp *et al.* (2010).



Obrázek 4 Složení sensoru z uhlíkových vláken (upraveno dle Sharp *et al.*, 2010)

Oxidačně redukční vlastnosti fenazinu jsou zhodnoceny metodou cyklické voltametrie. Pro detekci pyocyaninu byl navržen sensor z uhlíkových vláken, který je znázorněn na obrázku 4. Oxidace pyocyaninu byla detekována metodou square wave voltametrie (SWV). Tímto způsobem došlo k detekci pyocyaninu i při biologicky relevantních koncentracích.

Metodou SWV byl získán jediný prudký oxidační pik pozorovaný při  $-0,17$  V, který byl připisován pouze oxidaci pyocyaninu. Navržené uspořádání umožnilo lineární kvantifikaci pyocyaninu od  $1 \mu\text{M}$  do  $100 \mu\text{M}$  v roztoku.

Navržený sensor má schopnost detekovat pyocyanin i v přítomnosti dalšího pigmentu (pyomelaninu) produkovaného *Pseudomonas aeruginosa*.

### 5.2 Sensor z uhlíkových vláken pro elektrochemickou detekci pyocyaninu produkovaného *Pseudomonas aeruginosa* (2)

Sismaet *et al.* (2016) navrhli sensor pro detekci pyocyaninu ve 14 vzorcích tekutiny z rány a biofilmu od 12 pacientů. Výzkum se uskutečnil prostřednictvím studie o etiologii a léčbě ran (WE-HEAL).

Podle standardních pracovních postupů pro studii WE-HEAL byly vzorky z rány odebrány buď stěrem za pomoci tamponu, nebo technikou Levine. Tato technika byla dobře ověřena, aby byla zajištěna standardizace u všech vzorků shromážděných ve studii. Po odběru byly tampony okamžitě umístěny do odstředivých filtrů o velikosti pórů 0,65  $\mu\text{m}$ . Vzorky byly centrifugovány rychlostí 12 000 ot/min po dobu 4 minut, aby se extrahoval exsudát rány a odstranily se buněčné a fibrinózní zbytky. Vzorky byly skladovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do analýzy.

Pro detekci přítomnosti pyocyaninu v klinických vzorcích byly použity jednorázové, tištěné sensory. Tištěné sensory jsou složeny ze dvou elektrod. Pracovní elektroda je z uhlíku a referenční je Ag/AgCl.

Pro každý test bylo na pracovní elektrodu pipetováno 7,5  $\mu\text{l}$  exsudátu z rány, což je minimální objem tekutiny potřebný pro úspěšné měření. Každý klinický vzorek byl testován dvakrát s použitím nového sensoru. Data byla analyzována dvěma nezávislými vyšetřovateli za použití produktu OriginPro 9.1.

Oxidační pík pyocyaninu byl zaznamenán při  $-0,25\text{ V}$  vs. referenční elektroda  $0,030\text{ }\mu\text{A}$ . Ze 14 vzorků bylo 8 testováno pozitivně na přítomnost pyocyaninu.

Ve srovnání s genetickými metodami a detekcí sekvence 16S rRNA měl elektrochemický sensor pro detekci pyocyaninu citlivost 71 % a specificitu 57 %, což naznačuje, že může být užitečný při screeningu přítomnosti *Pseudomonas* v tekutině z lidských ran. Jedna z obav týkajících se užitečnosti elektrochemických sensorů pro testování lidských vzorků je, že mohou existovat i jiné molekuly, které mohou nepříznivě ovlivňovat výkonnost sensorů. Lidské vzorky často obsahují polymikrobiální flóru včetně vzorků z ran. Navzdory polymikrobiální povaze vzorků z lidské rány nebyly v testovaných vzorcích přítomny molekuly, které by ovlivňovaly stanovení pyocyaninu. Dřívější práce ukázaly, že bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, také nevykazují redoxní vrcholy ve sledované oblasti pro pyocyanin. U některých vzorků autoři pozorovali malé posuny v místě pyocyaninového vrcholu.

Dnešní standardní klinické postupy pro identifikaci bakterií stále spoléhají na kultivační nebo molekulárně biologické metody, které vyžadují několik hodin či dní, než je možné identifikovat bakterie. Elektrochemické sensory nabízejí jednoduchou a nenákladnou alternativu pro okamžitou identifikaci přítomnosti bakterií.

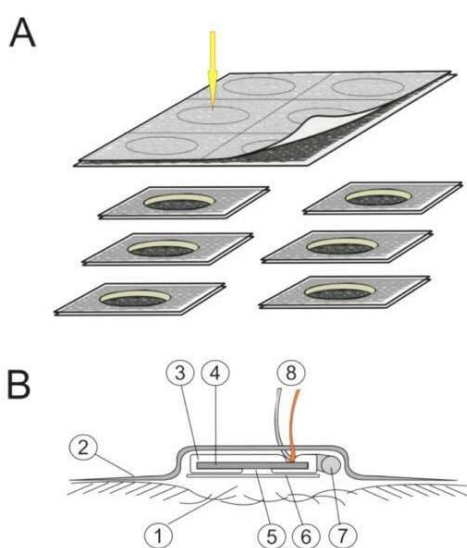


### 5.3 Integrované elektrochemické sensory z uhlíkových vláken pro snímání ran

Podstatné důvody pro volbu rozkladu urátu spočívají ve skutečnosti, že molekula má pro pacienta významnou fyziologickou roli a je degradována některými patogenními a oportunně patogenními bakteriemi. Touto problematikou se zabývá studie autorů Sharp *et al.* (2008).

Další možností je, že lokální spotřeba urátu se může v principu vyskytnout tam, kde některé bakteriální kolonie efektivně metabolizují urát. Urát je konečným produktem purinového katabolismu u člověka a v séru je přítomen v relativně velké koncentraci (150-420  $\mu\text{M}$ ). Mnoho patogenních a oportunně patogenních mikroorganismů má schopnost metabolizovat kyselinu močovou, nejdůležitější jsou *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Oba rychle metabolizují kyselinu močovou prostřednictvím syntézy mikrobiální urikázy. Mikrobiální urikáza metabolizuje kyselinu močovou na allantoin.

Schéma přípravy (laminace uhlíkových vláken) a proces snímání je uveden na obrázku 5A a 5B. Sensor je vložen do běžné adhezivní náplasti a nahrazuje v ní absorpční složku, která je tradičně spojená s druhou.

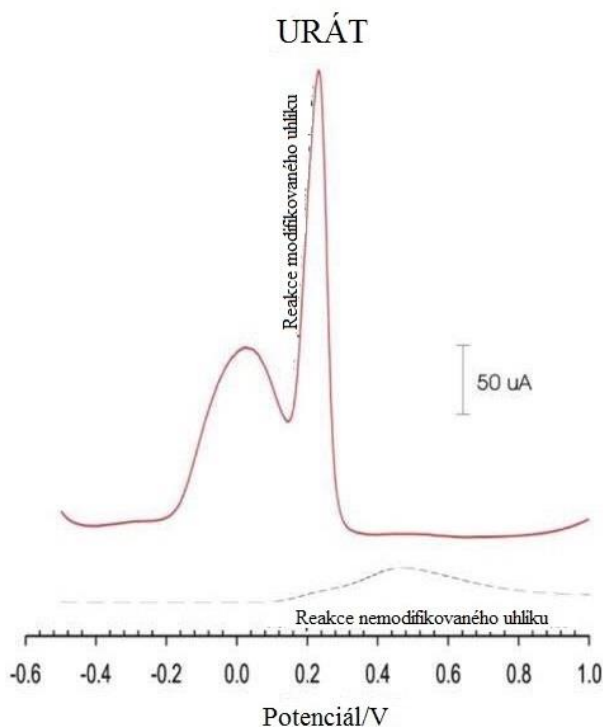


Obrázek 5 A Schéma procesu laminace; B Prototyp snímací sestavy. (1) otvor pro ránu, (2) lepicí náplast, (3) izolační laminát, (4) snímač z uhlíkových vláken, (5) snímací okno, (6) bariéra acetátu celulózy, (7) kombinovaná Ag/AgCl referenční elektroda, (8) kontakty pro měřicí zařízení (Sharp *et al.*, 2008)

Elektrochemická měření byla provedena pomocí  $\mu\text{Autolab}$  typu III pomocí konfigurace dvou elektrod sestávající z pracovní elektrody z uhlíkových vláken a chlorido-stříbrného drátu jako kombinované kontrolní/referenční elektrody.

Jediný ostrý vrchol je pozorován při +0,23 V, což se připisuje oxidaci urátu. Anodizování uhlíkových vláken vyvolalo podstatný nárůst velikosti píku urátu, jak je popsáno na obrázku 6. Potvrzení, že ostrý vrchol při + 0,23V je skutečně urát bez příspěvku askorbátu, byl poskytnut opakovaním ale s výrazně zvýšenou koncentrací askorbátu.

Askorbát se objevuje jako široký vrchol (+0,03V). To zdůrazňuje, že dokonce i za přítomnosti velké koncentrace askorbátu je stále možné jednoznačně posoudit koncentraci urátu a je ve výrazném kontrastu.



Obrázek 6 Square wave záznam - stanovení urátu (upraveno dle Sharp *et al.*, 2008)

Vzhledem k tomu, že sensor může jasně detekovat urát v komplexním biologickém vzorku, další problém, který je třeba řešit, se týká toho, zda je nebo není skutečně schopen sledovat urát v počátku. Aby se tento problém vyřešil, byl povrch elektrody pokryt celulóзовým acetátem, který působil jako ochranná bariéra. Rozdíl v charakteristikách odezvy, mezi modifikovaným senzorem celulózy a nepokrytým systémem, je vyznačen pouze malou ztrátou výkonu (-20 %).

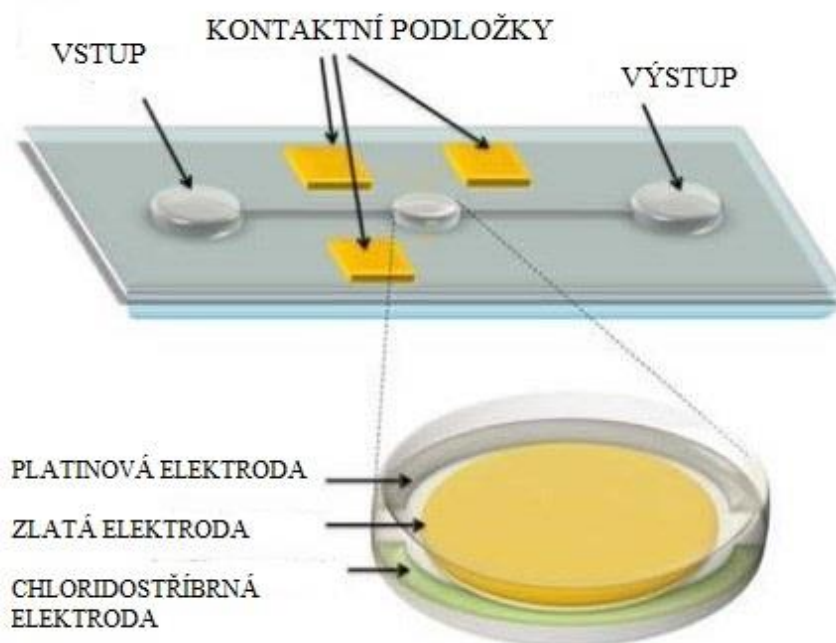
Sensor z uhlíkových vláken se ukázal jako schopný všestranný snímací systém. Modifikace uhlíkových vláken buď před, nebo po laminaci, poskytuje citlivou detekci urátu.

Během tohoto šetření nevykazovaly vyráběné sensory žádné známky nestability nebo degradace. Navrhovaný elektrochemický systém jasně nabízí silný základ pro kvantitativní technologie inteligentního obvodu.

## 5.4 Plně mikrofabrikovaný elektrochemický sensor pro detekci methicillin rezistentního *Staphylococcus aureus*

Koydemir *et al.* (2014) uvádí studii zabývající se detekcí methicillin rezistentního *Staphylococcus aureus* mikroelektrochemickým senzorem ( $\mu$ ECS). Tato platforma je schopna elektrochemicky snímat cílový analyt v mikrofluidním reaktoru bez použití objemných elektrod. V experimentech byla testována funkčnost sensoru pro detekci specifických DNA sekvencí genu *mecA* (indikátor rezistence na methicillin).

Tato práce představuje první  $\mu$ ECS využívající mikrofluidní kanály s referenčními (stříbro), pracovními (zlato) a kontrolními (platina) elektrodami pro detekci MRSA, který můžeme vidět na obrázku 7.

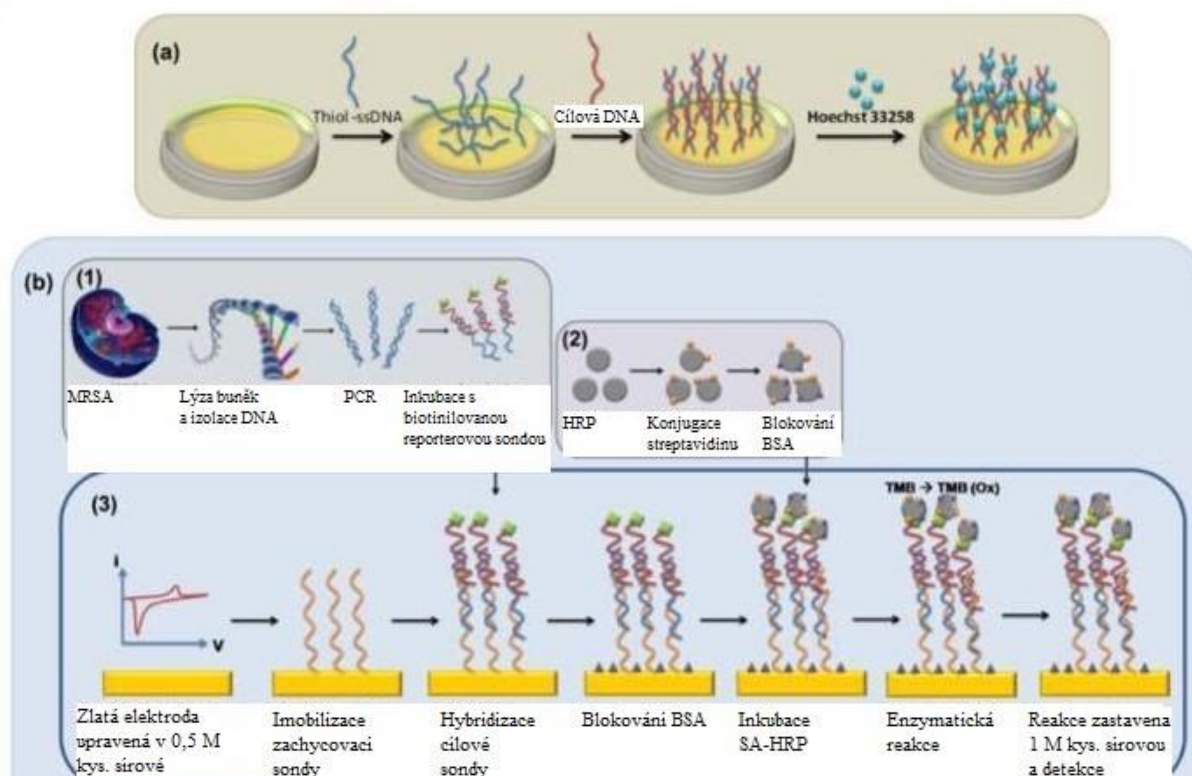


Obrázek 7 Schematické znázornění  $\mu$ ECS (upraveno dle Koydemir *et al.*, 2014)

Hoechst 33258 je fluorescenční barvivo, které se selektivně váže do malého žláčku dsDNA, zejména v oblasti dvojitého helixu DNA bohaté na A-T. Obrázek 8a zobrazuje povrchový modifikační mechanismus, kde bylo barvivo Hoechst 33258 použito jako redoxní indikátor při elektrochemické detekci. Pro aktivaci sensoru jsou prováděny převážně dva kroky: (1) samovolně sestavená monovrstva na zlaté elektrodě prostřednictvím interakce thiol-DNA a (2) DNA hybridizace a adsorpce barviva 33258.

Protokol je následující: na sensor bylo pipetováno 70  $\mu$ M roztoku DNA a inkubováno přes noc pro adsorpci thiolových molekul na povrchu zlata. Poté byl sensor propláchnut roztokem pro odstranění nenavázané DNA. Poté byla provedena hybridizace ve fyziologickém roztoku pufovaným fosfátem (PBS1) po dobu tří hodin při 37 °C za účelem

dosažení hybridizace. Následně bylo přidáno barvivo Hoechst 33258. Na obrázku 8b je znázorněn postup použití sensoru pro detekci cílové DNA s enzymatickým značením křenovou peroxidázou. PCR produkty byly před hybridizací 10krát zředěny. Zředěné PCR produkty byly smíchány s biotinylovanou reportérovou sondou (100 nM) v PBS2 a ponechány pět minut při 80 °C. Tato směs byla ochlazená na pokojovou teplotu a vložena na povrch sensoru po dobu dvou hodin. Po inkubaci byl sensor propláchnut PBS1. 1% roztok BSA byl inkubován jednu hodinu na elektrodě za účelem blokování zbývajících aktivních míst. Potom byly elektrody inkubovány s 2 µl streptavidinu-HRP konjugátu po dobu pěti minut. Po opláchnutí sensoru byla provedena elektrochemická detekce.



Obrázek 8 Mechanizmy povrchové modifikace pro (a) detekci založenou na redoxním markeru a (b) detekci na bázi enzymu: (1) kroky přípravy vzorku včetně lýzy buněk, izolace DNA, PCR a inkubace s biotinylovanou reportérovou sondou, (2) konjugace HRP molekuly streptavidinu a (3) povrchová aktivace pomocí SAM a celého DNA testu pro enzymatickou detekci (upraveno dle Koydemir *et al.*, 2014)

Změny vrcholových proudů byly pro různé koncentrace genu *mecA* analyzovány diferenční pulsní voltametří. Vrcholový proud se zvyšuje spolu s koncentrací cílové DNA. Předpokládá se, že to je způsobeno nasycením molekulární adsorpce na zlaté elektrodě.

Specifita sensoru byla demonstrována třemi sekvencemi DNA, konkrétně *mecA* genem, který je běžný u *S. aureus* a *S. epidermis*, genem *femA* u *S. aureus* a genem *femA* u *S. epidermis*.

Ukázalo se, že pomocí tohoto sensoru bylo možné detekovat méně než 0,01 nM syntetického DNA.  $\mu$ ECS navržené v této studii má vyšší citlivost než u srovnatelných studií v literatuře. Omezení tohoto  $\mu$ ECS spočívá v tom, že vyžaduje přípravu vzorku.

## 5.5 Elektronický nos

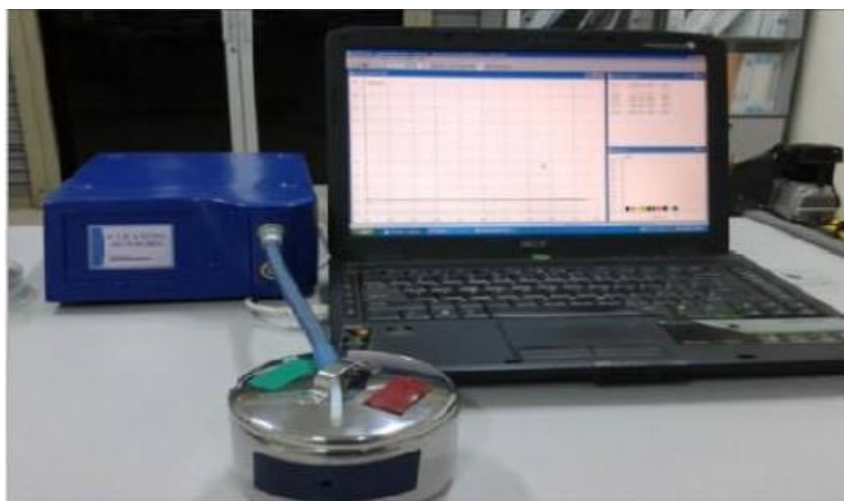
V tomto výzkumu popisují Yusuf *et al.* (2014) využití elektronického nosu.

V průběhu let počet pacientů s diabetes mellitus rychle roste. Tato chronická nemoc vede k různým komplikacím. Aby se zabránilo zhoršení, měla by být jako moderní lékařská kontrolní metoda používána rychlá detekce infekce. To lze provést pomocí e-nosu, jako je Cyranose320 nebo PEN3, kde jsou různá pole plynových sensorů k detekci pachů uvolněných bakteriemi na infikované noze.

E-nos napodobuje čichový systém u člověka k odhalení pachů a klasifikuje je jako vůni. Různé sensory detekují specifický zápach a každý z nich má odlišné vzory selektivity a určitou prahovou hodnotu pro označení a zpracování vyhodnocené informace o zápachu, který e-nos detekuje. Při porovnání moderního způsobu detekce e-nosu v diagnostice infikované diabetické nohy v reálném čase s tradiční metodou, moderní detekce jasně poskytuje spolehlivé výsledky za kratší dobu.

### 5.5.1 PEN3

Vzorek bakterií je umístěn uvnitř plně zakrytého kontejneru, takže bakteriální pachy nejsou uvolněny do okolního vzduchu. Zařízení PEN3 je zobrazeno na obrázku 9. Vzhledem k tomu, že sběr dat probíhá v časovém intervalu 0,5 s po dobu 60 s, každý sběr dat z PEN3 produkoval 120 číselných dat. Pro analýzu dat se používá pouze posledních 20 dat, které jsou od 50 do 60 s.

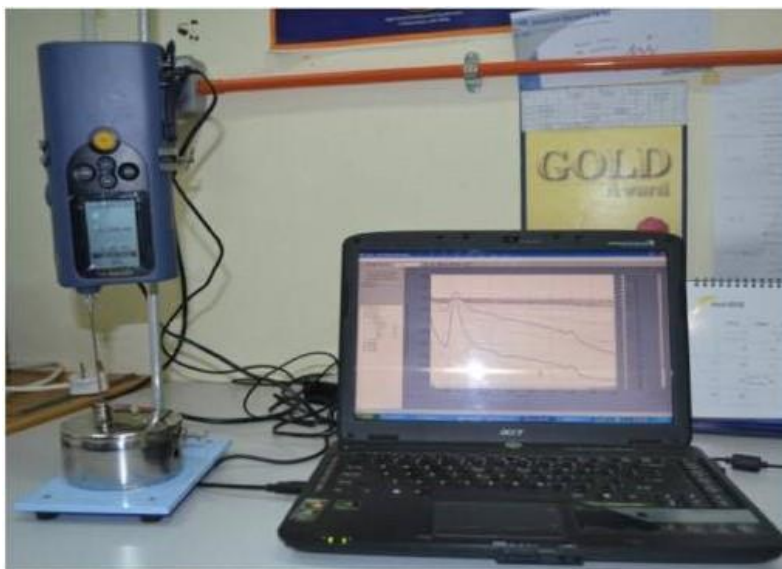


Obrázek 9 Zařízení PEN3 pro sběr dat (Yusuf *et al.*, 2014)

Od 6. do 24. hodiny jsou bakterie klasifikovány do odpovídajících skupin, k zařazení dochází již po prvních 6 hodinách.

### 5.5.2 Cyranose320

Vzorek bakterií je umístěn uvnitř plně zakrytého kontejneru stejně jako PEN3. E-nos byl nastaven na 37 °C, což je optimální teplota pro růst bakterií. Obrázek 10 znázorňuje zařízení pro sběr dat pomocí programu Cyranose320.



Obrázek 10 Zařízení Cyranose320 pro sběr dat (Yusuf *et al.*, 2014)

Data byla shromážděna po 6., 12., 18., 24., 30. a 36. hodině. Různé skupiny bakterií mohou být rozděleny do různých oblastí na počátku 6. hodiny růstu bakterií. Tato zjištění ukazují, že přesné klasifikace bakteriálních druhů lze dosáhnout i v prvních 6 hodinách růstu bakterií.

Ze studie lze vyvodit závěr, že oba e-nosy jsou schopné napodobit lidský smysl pro pach a jsou užitečné pro detekci bakterií vředů diabetické nohy.

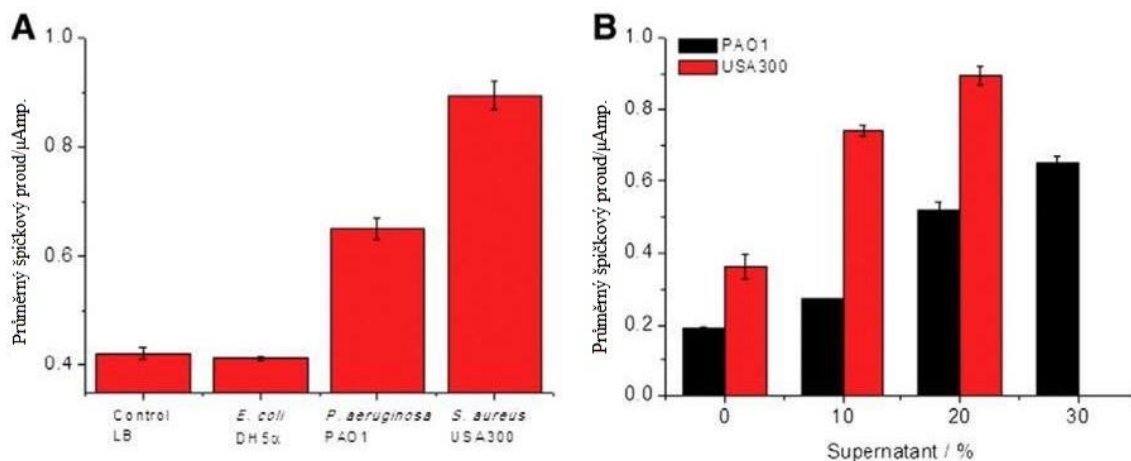
## 5.6 Elektrochemický sensor pro detekci bakteriálních virulenčních faktorů *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*

Thet *et al.* (2015) vypracovali studii zabývající se elektrochemickým senzorem pro detekci bakteriálních virulenčních faktorů.

Každá polyesterová deska obsahuje tři planární elektrody tištěné se zlatým polymerem (pracovní elektrodou), Ag/AgCl (referenční elektroda) a uhlíkem/grafitovými pastami (protielektroda). Měření diferenciální pulzní voltametrií bylo prováděno při pokojové teplotě za použití potenciostatu  $\mu$ AutoLab (typ III).

Supernatant ze tří kmenů, *S. aureus* (USA300), *P. aeruginosa* (PAO1) a oslabený kmen *E. coli* (DH5a) jako kontrola, byl použit ke studiu jejich lipolytické aktivity.

Rhamnolipidové a delta toxiny jsou primární exotoxiny, ale přesné množství těchto toxinů produkovaných bakteriemi není známo. Pro zjištění účinku exotoxinů na PFC vezikuly byly extrahovány supernatanty ze tří bakterií, tj. *E. coli* DH5a, *P. aeruginosa* PAO1 a *S. aureus* USA300. Byla prokázána selektivita mezi patogenními a nepatogenními bakteriemi (obrázek 11A). Můžeme jasně vidět pozitivní reakce na *P. aeruginosa* PAO1 a *S. aureus* USA300 a naopak negativní výsledek u kontroly a u *E. coli* DH5a. 10% supernatant *S. aureus* USA300 poskytl přírůstek proudu o 0,4  $\mu$ A (obrázek 11B). Naproti tomu u *P. aeruginosa* PAO1 byla odezva nižší. Při nejvyšší zkoušené koncentraci 30 % o 0,5  $\mu$ A.



Obrázek 11 Histogramy znázorňující reakce redoxního proudu na supernatanty bakterií (upraveno dle Thet *et al.*, 2015)

Navrhovaný test může detekovat purifikované exotoxiny bakteriálního původu, stejně jako široké exotoxiny z bakteriálních supernatantů. Nízkonákladová, selektivní a elektrochemická kontrola navrženého sensoru pro *in vivo* signalizaci infekce by mohla být hlavní výhodou pro budoucí vývoj inteligentních ob vazů na rány.

## 5.7 Sensorové materiály pro detekci aktivity lidské neutrofilní elastázy a aktivity katepsinu G v tekutině z rány

Neutrofilní granulocyt je první nukleovaná buňka, která infiltruje lůžko rány poté, co je porušena celistvost kůže. Hlavním úkolem neutrofilů v místě infekce je dekontaminovat otevřenou ránu ničením napadajících mikrobů. Lidská neutrofilní elastáza (HNE) a katepsin G (CatG) jsou dva enzymy řady chymotrypsinů, které jsou uloženy v primárních granulích polymorfonukleárních neutrofilů (PMN). Řada studií zjistila signifikantně zvýšené průměrné hladiny aktivity HNE u tlakových vředů a vředů na nohou.

V této studii popisuje Hasmann *et al.* (2011) detekci HNE a CatG pomocí sensorových materiálů.

Kapaliny ze šesti pooperačních ran, dvou ran s tlakovými vředy, šesti hlubokých vředů a čtyř vředů na nohou byly shromážděny a analyzovány biochemickými technikami. Exsudáty byly odebírány přímo z povrchu rány pomocí jehel nebo lžice před každodenním ošetřením. Navíc byly odebrány vzorky z devíti puchýřů.

Činnosti lidské neutrofilní elastázy a katepsinu G byly stanoveny přímo v kapalině rány (tabulka 2). Výrazně vyšší aktivita HNE a CatG byla zjištěna u infikovaných ran ve srovnání s neinfikovanými poraněními. Mezi puchýřky a neinfikovanými pooperačními nebo chronickými ranami byl signifikantní rozdíl v hladinách enzymů. Nebyly však signifikantní rozdíly v hladinách enzymů u infikovaných chronických ran nebo pooperačních ran.

Tabulka 2 Aktivita HNE a CatG ve vzorcích (upraveno dle Hasmann *et al.*, 2011)

<b>Klinický popis rány</b>	<b>Infikovaná</b>	<b>Neinfikovaná</b>
Puchýř	0	9
Pooperační rány	3	3
Vředové rány	2	0
Hluboké vředy	2	4
Bércový vřed	2	2
Aktivita HNE [U/ml]	22,97±13,27	2,89±1,27
Aktivita CatG [U/ml]	50,85±36,76	7,05±4,93

Peptidové substráty pro tyto dva enzymy byly úspěšně imobilizovány na různých površích, včetně kolagenu, modifikovaného kolagenu, polyamidových polyesterů a silikagelu.

Inkubace imobilizovaných substrátů se vzorky kapaliny rány na silikagelu po dobu 24 hodin vedla k uvolnění p-nitroanilidu a tím k zabarvení supernatantu v případě infikovaných vzorků.

Úspěšná hydrolýza peptidového substrátu byla pozorována v případě infikovaných poranění ran a HNE. Pouze mírná hydrolýza byla pozorována v případě neinfikovaných infiltračních poranění.

Polyamid a polyester jsou široce používané materiály integrované v obvazech. Po inkubaci s infikovanými a neinfikovanými vzorky ran byl pozorován jasný rozdíl v hydrolýze substrátu a tvorbě barev. V případě enzymaticky modifikovaných materiálů bylo dosaženo významně vyšší hydrolýzy vázaného substrátu HNE ve srovnání s povrchy bez modifikace.



Zjistilo se, že HNE je na počátku infekce zvýšená. Proto byl enzym navržen jako diagnostický marker pro detekci infekce rány. Detekce enzymů HNE a CatG v kapalině ran by mohla poskytnout varování v raném stádiu infekce rány, z důvodu jejich zvýšené hladiny.

V případě obvazů na rány by imobilizace peptidových substrátů pro HNE a CatG pro integraci přímo do obvazů měla silné výhody. Na rozdíl od *in vitro* testů enzymové aktivity by online sledování infekce rány zabránilo manipulaci s tekutinami rány.

## 5.8 Elektronický nos

Šetkus *et al.* (2006) ve své studii popisuje systém umělého nosu (elektronický nos, EN), který je navržen jako slibná technologie pro lékařskou diagnózu. Systémy EN jsou založeny na plynně citlivých strukturách, které nejsou selektivní vůči určitému plynu, a obecně každý z těchto sensorů reaguje na různé plyny. EN detekuje a rozpoznává směs těkavých organických sloučenin ve vzduchu a v důsledku toho identifikuje kmen infekčních agens, který vytváří jedinečný sběr produktů ve vzduchu, které mohou být přijaty jako marker infekce.

Pro současnou práci byly vybrány tři typy infekčních agens, jmenovitě *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*.

V této studii bylo prokázáno, že vnější znázornění aktivity bakterií těkavými produkty je ovlivněno relativní vlhkostí okolního vzduchu a teplotou prostředí. V důsledku toho musí přesnost rozpoznání infekce velmi záviset na stavu rány a na stavu pacienta obecně. Navíc charakterizace bakterií výstupními daty sensorového pole je vysoce ovlivněna stupněm růstu kultury. Na základě výsledků této studie lze konstatovat, že infekční agens byly zcela rozpoznatelné.

## 5.9 Porézní křemíkové rezonanční mikrotvary pro detekci *S. aureus*

V této studii Krismastusi *et al.* (2016) navrhli a vyvinuli biosensor pro SrtA, který nepřímo detekuje přítomnost *S. aureus*.

Snímací platforma použitá k detekci SrtA byla založena na fotonické struktuře pSiRM. Struktura pSiRM má vrstvu aktivní dutiny mezi dvěma distribuovanými Braggovými reflektory, střídajícími se s vrstvami s vysokou porézností a nízkou porézností. Zvýšení fotoluminiscence ze struktury pSiRM je založeno na spontánní emisi v aktivní vrstvě.

Autoři prokázali schopnost pSiRM snímací platformy detekovat přítomnost SrtA v komplexních biologických vzorcích, jako je chronická tekutina z rány a bakteriální kultivační médium. Zde se použila tekutinu z lidské rány, tekutina z lidských ran

naočkovanou *S. aureus* po dobu 24 hodin, bakteriální kultivační médium a bakteriální kultivační médium inokulované *S. aureus*. Jasný fluorescenční signál byl již pozorován z pSiRM snímací platformy inkubované s bakteriálním kultivačním médiem po půl hodině inokulace *S. aureus* odpovídající koncentraci bakterií. Koncentrace *S. aureus* se zvyšovala s dobou inokulace. Inkubace roztoků s rostoucími koncentracemi bakterií na pSiRM vedla ke zvýšení intenzity fluorescence.

Fluorescenční emise byla také detekována v tekutině z lidských ran, naočkované *S. aureus* po dobu 24 hodin. Porovnáním tekutiny z rány a bakteriálního kultivačního média pro stejný čas inokulace ukázal vzorek tekutiny z rány nižší intenzitu fluorescence, což naznačuje, že bakteriální růst v kultivačním médiu je rychlejší než v tekutině z rány. To se očekává, protože kultivační médium má optimální podmínky pro růst bakterií. Nicméně naše snímací platforma byla schopna detekovat SrtA přímo ve vzorku tekutiny z rány. Vyšetřili se také účinky matrice, které mohou být způsobeny jinými biomolekulami v tekutině z rány nebo bakteriálním kultivačním médiu.

Fluorescenční signál generovaný na vzorcích pSiRM vykazoval lineární vztahy s koncentrací SrtA.

Zde popsaný biosensor má potenciál stát se diagnostickým nástrojem pro určení stavu rány, který umožňuje rychlé lékařské posouzení.

Závěrem lze říci, že autoři prokázali detekci bakteriálního enzymu SrtA použitím pSiRM modifikovaného fluorogenním SrtA peptidovým substrátem. Detekci SrtA na bázi fluorescence lze dosáhnout pomocí fluorometru nebo konfokálního mikroskopu.

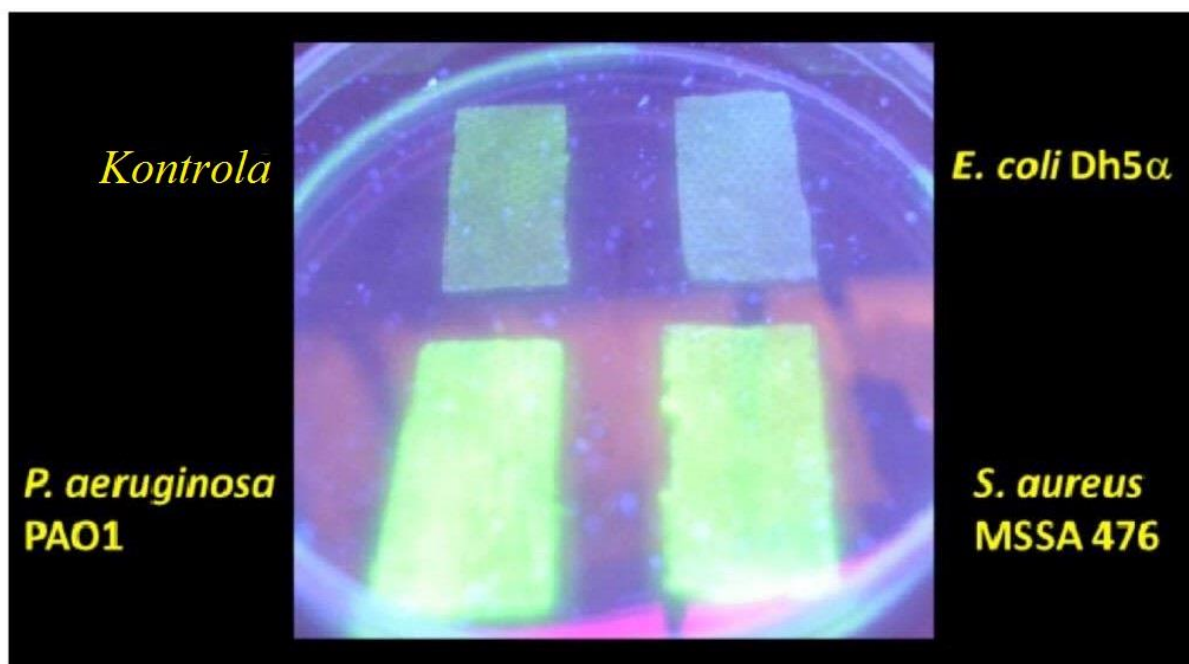
## **5.10 Obvaz s lipidovými vezikuly pro detekci *S. aureus* a *P. aeruginosa***

Patogenní bakterie použité v tomto experimentu, který provedli Zhou *et al.* (2011), byly klinicky izolované kmeny *S. aureus* (MSSA 476) a *P. aeruginosa* (PAO1), které byly rezistentní na methicillin, a nepatogenní *Escherichia coli* (DH5a).

Základem detekčního testu je, že při vysoké koncentraci je karboxyfluorescein nefluorescenční. Po rozpadu zásobníků lipidových váček bakteriálními toxiny se barvivo zředí a "zapne". Pokusy byly prováděny na 96 jamkové destičce. Barvivo bylo excitováno světlem při 495 nm a emise měřeny při 520 nm. Fluorescence byla zaznamenávána každé 4 minuty a vynesena v závislosti na čase.

Byla testována citlivost vezikulů na bakterie a jejich schopnost rozlišovat mezi nepatogenním kmenem *E. coli* a dvěma patogenními kmeny (*P. aeruginosa* PAO1 a *S. aureus* MSSA 476).

Výsledky dále ilustrují, že vezikuly mohou být potaženy tkaninou a jsou citlivé na patogenní bakterie, pokud jsou rozptýleny v pufru/bujónu. Závěrečná část studie testovala, zda buňka modifikovaná vezikuly by byla dostatečně citlivá na patogenní bakterie, aby poskytla vizuální odezvu při slabém UV záření, aniž by se nezabývala nepatogenním *E. coli* (obrázek 12). Je třeba poznamenat, že test byl proveden pro velký počet kmenů *S. aureus* (více než 100 klinických izolátů), stejně jako velké množství kmenů *P. aeruginosa*. Tato data naznačují, že test je citlivý na 96 % náhodného sběru klinických izolátů *S. aureus* (96/100).



Obrázek 12 Jednoduché prototypové obvazy: odezva modifikované tkaniny po růstu bakterií přes noc na polypropylenové tkanině (upraveno dle Zhou *et al.*, 2011)

Tento experiment poskytl jasný signál, že by mohla být vyrobena látka, která vykazuje fluorescenční odpověď na patogenní bakterie.

## 6 ZÁVĚR

Je stále více potřeba vyvíjet nové technologie, které by mohly pomoci včas odhalit bakterie přítomné v chronických ranách. Čím dříve se zjistí příčina infekce, tím dříve mohou být podána pacientovi vhodná antibiotika a tím se může zabránit fatálním následkům infekce, jako je například amputace končetiny. Rány se dělí z hlediska doby léčby na rány akutní a chronické, ale především rány chronické představují velké riziko.

Nejčastěji se vyskytující bakterie v ranách jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a MRSA, který je rezistentní na methicillin. Rezistence na antibiotika je čím dál větší problém, protože bakterie jsou stále více rezistentnější a jejich léčba je proto obtížnější.

Jako příklady moderních metod, které se využívají k detekci bakterií, lze uvést MALDI-TOF MS, FISH a PCR v reálném čase. Detekce těmito metodami je rychlejší oproti metodám kultivačním, kde je potřeba i několik dní. V práci je u každé z těchto metod napsán princip a postup.

Cílem této práce bylo zpracovat studie na využití jednotlivých biosensorů pro detekci konkrétních bakterií v ranách a zhodnotit výhody a nevýhody. Bylo zpracováno celkem deset studií, z nichž každá se zaměřuje na detekci konkrétního mikroorganismu určitým biosensorem. Některé biosensory jsou založené na detekci určitého markeru, který je typický pro bakterii. Markery, které jsou v práci detekovány, jsou například pyocyanin, urát, lidská neutrofilní elastáza nebo katepsin G. Jiné sensory jsou založeny na principu elektronického nosu, který detekuje pach vylučovaný konkrétním mikroorganismem. Jednotlivé detekce se ještě liší v tom, zda je detekce nepřímá a nebo přímo z exsudátu rány. U zpracovaných studií je vždy popsán výsledek, ke kterému autoři dospěli. Ze studií lze usoudit, že většina biosensorů jsou na takové úrovni, že by mohly být vhodné již k běžnému užití. Biosensory jsou snadnou a levnou volbou pro detekci popsaných markerů a mohly by být použity do moderních obvazů pro detekci bakterií přímo z povrchu rány.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AHMED, A., J. V. RUSHWORTH, N. A. HIRST a P. A. MILLNER. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, **27**(3), 631–646. DOI: 10.1128/CMR.00120-13.
2. AMANN, R., B. M. FUCHS a S. BEHRENS. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, **12**(3), 231-236. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00204-4.
3. BERÁNEK, M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
4. BURSOVÁ, Š., M. DUŠKOVÁ, L. NECIDOVÁ, R. KARPÍŠKOVÁ a P. MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.
5. CHERKAOUI, A., J. HIBBS, S. EMONET, M. TANGOMO, M. GIRARD, P. FRANCOIS a J. SCHRENZEL. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, **48**(4), 1169-1175. DOI: 10.1128/JCM.01881-09.
6. CROXATTO, A., G. PROD'HOM a G. GREUB. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012, **36**, 380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
7. DARGAVILLE, T. R., B. L. FARRUGIA, J. A. BROADBENT, S. PACE, Z. UPTON a N. H. VOELCKER. Sensors and imaging for wound healing: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, **41**, 30-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.029>.
8. ESPY, M. J., J. R. UHL, L. M. SLOAN, S. P. BUCKWALTER, M. F. JONES, E. A. VETTER, J. D. C. YAO, NL. L. WENGENACK, J. E. ROSENBLATT, F. R. COCKERILL III a T. F. SMITH. Real-Time PCR in Clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, **19**(1), 165-256. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165–256.2006.
9. FLETCHER, J. Differences between acute and chronic wounds and the role of wound bed preparation. *Nursing Standard*. 2008, **22**(24), 62-68. DOI: 10.7748/ns2008.02.22.24.62.c6412.
10. GENTILI, V., S. GIANESINI, P. G. BALBONI, E. MENEGATTI, A. ROTOLA, M. ZUOLO, E. CASELLI, P. ZAMBONI a D. DI LUCA. Panbacterial real-time PCR to

- evaluate bacterial burden in chronic wounds treated with Cutimed™ Sorbact™. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012, **31**(7), 1523–1529. DOI: 10.1007/s10096-011-1473-x.
11. HASMANN, A., U. GEWESSLER, E. HULLA, K. P. SCHNEIDER, B. BINDER, A. FRANCESKO, T. TZANOV, M. SCHITLER, J. Van der PALEN, G. M. GUEBITZ a E. WEHRSCHUETZ-SIGL. Sensor materials for the detection of human neutrophil elastase and cathepsin G activity in wound fluid. *Experimental Dermatology*. 2011, **20**(6), 508–513. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01256.x.
  12. HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 1997, **46**(11), 903-912. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903.
  13. HUONG, T. T., M. KOMÍNKOVÁ, R. GURÁŇ, B. RUTTKAY-NEDECKÝ, P. KOPEL, L. TRNKOVÁ, O. ZÍTKA, V. ADAM a R. KIZEK. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, **1**(2), 64-66. ISSN 2336-3940.
  14. IVNITSKI, D., I. ABDEL-HAMID, P. ATANASOV a E. WILKINS. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999, **14**, 599–624.
  15. JURINKE, Ch., P. OETH a D. VAN DEN BOON. MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular Biotechnology*. 2004, **26**(2), 147-163. DOI: 10.1385/MB:26:2:147.
  16. KIMMEL, D. W., M. E. MESCHIEVITZ a D. E. CLIFFEL. Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical chemistry*. 2013, **84**(2), 685–707. DOI: 10.1021/ac202878q.
  17. KOYDEMIR, H. C., H. KÜLAH, A. ALP, A. H. ÜNER, G. HASÇELIK a C. ÖZGEN. A fully microfabricated electrochemical sensor and its implementation for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ieee Sensors Journal*. 2014, **14**(6), 1844-1851. DOI: 10.1109/JSEN.2014.2305152.
  18. KOYUN, A., E. AHLATCIOGU a Y. K. İPEK. Biosensors and their principles In *A roadmap of biomedical engineers and milestones*, Prof. Sadik Kara, Intech, 2012, s. 115-142. ISBN 978-953-51-0609-8. Dostupné z <http://cdn.intechopen.com/pdfs/37345.pdf> [cit. 2017-06-12].
  19. KRISMASTUTI, F. S. H., A. CAVALLARO, B. PRIETO-SIMON a N. H. VOELCKER. Toward multiplexing detection of wound healing biomarkers on porous silicon resonant microcavities. *Advanced Science*. 2016, **3**(6), 1-8. DOI: 10.1002/advs.201500383.
  20. LAY, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*. 2001, **20**(4), 172-194. DOI: 10.1002/mas.10003.

21. LAZCKA, O., F. J. DEL CAMPO a F. X. MUNOZ. 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.
22. MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004, **10**(3), 190-212. DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.
23. MALIC, S., K. E. HILL, A. HAYES, S. L. PERCIVAL, D. W. THOMAS a D. W. WILLIAMS. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology*. 2009, **155**, 2603-2611. DOI: 10.1099/mic.0.028712-0.
24. MCGUCKIN, M., R. GOLDMAN, L. BOLTON a R. SALCIDO. The clinical relevance of microbiology in acute and chronic wounds. *Skin and Wound Care*. 2003, **16**(1), 12-23.
25. MELENDEZ, J. H., Y. M. FRANKEL, A. T. AN, L. WILLIAMS, L. B. PRICE, N.-Y. WANG a J. M. ZENILMAN. Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010, **16**(12), 1762–1769. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03158.x.
26. MOBLEY, H. L. a R. BELAS. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends in Microbiology*. 1995, **3**(7), 280-284.
27. MOTER, A. a U. B. GÖBEL. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 2000, **41**(2), 85-112.
28. MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 1990, **3**(1), 46-65. DOI: 10.1128/CMR.3.1.46.
29. PATEL, R.. Matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Medical Microbiology*. 2013, **57**(4), 564-572. DOI: 10.1093/cid/cit247.
30. POHANKA, M. a P. SKLÁDAL. Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*. 2008, **6**(2), 57–64. ISSN 1214-0287.
31. POPPERT, S., A. ESSIG, B. STOEHR, A. STEINGRUBER, B. WIRTHS, S. JURETSCHKO, U. REISCHL a N. WELLINGHAUSEN. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, **43**(7), 3390–3397. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3390–3397.2005.
32. PRICE, C. M. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Reviews*. 1993, **7**(2), 127-134.

33. RHOADS, D. D., R. D. WOLCOTT, Y. SUN a S. E. DOWD. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, **13**(3), 2535-2550. DOI: 10.3390/ijms13032535. ISSN 1422-0067.
34. RONKAINEN, N. J., H. B. HALSALL a W. R. HEINEMAN. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(5), 1747-1763. DOI: 10.1039/b714449k.
35. SENG, P., M. DRANCOURT, F. GOURIET, B. LA SCOLA, P. E. FOURNIER, J. M. ROLAIN a D. RAOULT. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(4), 543-551. DOI: 10.1086/600885.
36. SHARP, D., S. FORSYTHE a J. DAVID. Carbon fibre composites: integrated electrochemical sensors for wound management. *The Journal of Biochemistry*. 2008, **144**(1), 87-93. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvn045>.
37. SHARP, D., P. GLADSTONE, R. B. SMITH, S. FORSYTHE a J. DAVIS. Approaching intelligent infection diagnostics: carbon fibre sensor for electrochemical pyocyanin detection. *Bioelectrochemistry*. 2010, **77**(2), 114-119. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2009.07.008.
38. SISMAET, H. J., A. BANERJEE, S. McNISH, Y. CHOI, M. TORRALBA, S. LUCAS, A. CHAN, V. K. SHANMUGAM a E. D. GOLUCH. Electrochemical detection of *Pseudomonas* in wound exudate samples from patients with chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 2016, **24**(2), 366–372. DOI: 10.1111/wrr.12414.
39. SIDDIQUI, A. R. a J. M. BERNSTEIN. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2010, **28**, 519-526. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2010.03.009.
40. SU, L., W. JIA, Ch. HOU a Y. LEI. Microbial biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(5), 1788–1799. DOI: 10.1016/j.bios.2010.09.005.
41. ŠETKUS, A., A. J. GALDIKAS, Z. A. KANCLERIS, A. OLEKAS, D. SENULIENE, V. STRAZDIENE, R. RIMDEIKA a R. BAGDONAS. Featuring of bacterial contamination of wounds by dynamic response of SnO<sub>2</sub> gas sensor array. *Sensors and Actuators B*. 2006, **115**(1), 412–420. DOI: 10.1016/j.snb.2005.10.003.
42. THET, N. T. a A. T. A. TOBY. An electrochemical sensor concept for the detection of bacterial virulence factors from *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrochemistry Communications*. 2015, **59**, 104 – 108. DOI: 10.1016/j.elecom.2015.01.001.



43. THÉVENOT, D. R., K. TOTH, R. A. DURST a G. S. WILSON. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, **16**(1-2), 121–131. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4).
44. WANG, Z., L. RUSSON, L. LI, D. C. ROSER a S. R. LONG. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry*. 1998, **12**(8), 456–464. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19980430)12:8<456::AID-RCM177>3.0.CO;2-U.
45. YANG, S., S. LIN, G. D. KELEN, T. C. QUINN, J. D. DICK, Ch. A. GAYDOS a R. E. ROTHMANN. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, **40**(9), 3449–3454. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3449–3454.2002.
46. YANG, S., P. RAMACHANDRAN, A. HARDICK, Y. H. HSIEH, C. QUIANZON, M. KUROKI, J. HARDICK, A. KECOJEVIC, A. ABEYGUNAWARDENA, J. ZENILMAN, J. MELENDEZ, V. DOSHI, CH. GAYDOS a R. E. ROTHMAN. Rapid PCR-based diagnosis of septic arthritis by early gram-type classification and pathogen identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008, **46**(4), 1386–1390. DOI: 10.1128/JCM.02305-07.
47. YUSUF, N., A. A. ABDULLAH, M. I. OMAR, A. ZAKARIA, L. M. KAMARUDIN, A. Y. M. SHAKAFF, A. H. ADOM, M. J. MASNAN, Y. E. JUAN, A. OTHMAN a M. S. YASSIN. Comparison of various pattern recognition techniques based on e-nose for identifying bacterial species in diabetic wound infections. *Advances in Intelligent Systems*. 2014, **53**, 43-59. DOI: 10.2495/Intelsys130061. ISSN 1743-3517.
48. ZHANG, Y. a S. TADIGADAPA. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004, **19**(12), 1733-1743. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.01.009>.
49. ZHOU, J., T. N. TUN, S. H. HONG, J. D. MERCER-CHALMERS, M. LAABELI, A. E.R. YOUNG a A. T. A. JENKINS. Development of a prototype wound dressing technology which can detect and report colonization by pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **30**(1), 67-72. DOI: 10.1016/j.bios.2011.08.028.