

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Imunomagnetická separace buněk

Kateřina Němečková

Bakalářská práce

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE

Department of Biological and Biochemical Sciences

Immunomagnetic separation of cells

Kateřina Němečková

Thesis

2018

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Němečková**
Osobní číslo: **C11325**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Imunomagnetická separace buněk**
Zadávací 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. Seznamte se s literaturou týkající se imunomagnetické separace buněk, zaměřte se na možnosti využití této metody od oblasti vědecko - výzkumné až po uplatnění metody v běžné klinické praxi.
2. Vypracujte literární rešerši o imunomagnetické separaci buněk.
 - a) Zpracujte základní informace o metodě: principy, pozitivní a negativní selekce, možnosti eluce separovaných buněk, jejich viabilita, atd. Krátce zmiňte možnosti metod laboratorní přípravy magnetických imunisorbentů.
 - b) Podrobně nastudujte využití metody imunomagnetické separace u prokaryotických buněk, k čemu se využívá, s jakými dalšími technikami je separace nejčastěji kombinována, jaké jsou její přednosti.
 - c) Nastudujte využití metody pro separaci buněk eukaryotických, vytvořte přehled buněk, které se touto metodou izolují.
3. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry, jaké výhody a jaká úskalí s sebou přináší imunomagnetická separace buněk oproti jiným separačním technikám.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

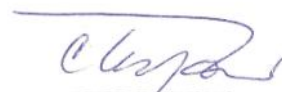
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

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



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.7.2018

Kateřina Němečková

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za její odbornou pomoc, cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a příteli za podporu.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce je podat přehled o současných možnostech využití imunomagnetické separace od oblasti vědecko-výzkumné až po uplatnění v běžné klinické praxi. Práce se dále zaměřuje na shrnutí metodik a strategií, které lze použít pro separaci cílových buněk pomocí magnetického pole. Součástí práce jsou také příklady využití metod imunomagnetické separace u prokaryotických a eukaryotických buněk. Závěrem této práce jsou uvedeny výhody, které s sebou přináší imunomagnetická separace buněk oproti jiným separačním metodám.

KLÍČOVÁ SLOVA

imunomagnetická separace buněk, prokaryotické buňky, eukaryotické buňky

TITLE

Immunomagnetic separation of cells

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis is to give an overview of the current possibilities of using immunomagnetic separation from the field of scientific research to the application in common clinical practice. The thesis focuses on a summary of methodologies and strategies that can be used to separate target cells using the magnetic field. The thesis also contains the examples of immunomagnetic separation methods in prokaryotic and eukaryotic cells use. The conclusion of the work provides the advantages of immunomagnetic cell separation compared to other separation methods.

KEYWORDS

immunomagnetic cell separation, prokaryotic cells, eukaryotic cells

OBSAH

ÚVOD	12
1 PRINCIP IMUNOMAGNETICKÉ SEPARACE.....	13
1.1 Pozitivní a negativní metoda imunomagnetické separace	14
1.2 Magnetické částice	16
1.2.1 Syntéza magnetických částic	17
1.3 Funkcionalizace a stabilizace povrchu magnetických částic	18
1.4 Způsoby imobilizace ligandů	18
1.4.1 Přímá fyzikální sorpce ligandu na nosič	19
1.4.2 Zabudování biomolekul do magnetické gelové matrice	19
1.4.3 Imobilizace ligandu kovalentní vazbou na nosič	19
1.4.4 Vazba ligandu na povrch magnetických částic nekovalentní vazbou.....	20
1.5 Magnetické separátory	20
1.5.1 Stacionární separátory.....	21
1.5.2 Průtokové magnetické separátory	21
1.5.3 Systémy třídění buněk	22
1.6 Metoda magneticky stabilizovaného fluidního lože	24
2 IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE PROKARYOTICKÝCH BUNĚK.....	26
3 PŘÍKLADY SEPARACE EUKARYOTICKÝCH BUNĚK.....	34
4 ZÁVĚR	38
POUŽITÁ LITERATURA	39
WEBOVÉ ZDROJE	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Magnetická separace buněk.	13
Obrázek 2: Pozitivní izolace buněk.	15
Obrázek 3: Negativní izolace buněk.	16
Obrázek 4: Různé velikosti magnetických separátorů pro zkumavky.....	21
Obrázek 5: Magnetický separátor mikrotitrační desky.....	21
Obrázek 6: MidiMACS Separátor od firmy Miltenyi Biotec.	22
Obrázek 7: AutoMACS Pro Separátor od firmy Miltenyi Biotec.	22
Obrázek 8: Diagramy znázorňující běžné metody.....	23
Obrázek 9: MACS Tip pro imunomagnetickou separaci.....	24
Obrázek 10: Postup magnetických částic v mikrofluidním systému.....	25
Obrázek 11: Příklad detekce bakterií ve fluidním loži.	25
Obrázek 12: Princip imunomagnetické separace mikroorganismů.	26
Obrázek 13: Schéma principu detekce E. coli O157: H7.	29
Obrázek 14: Sendvičový test ELISA využívající magnetické částice.....	33

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady imunomagnetické separace mikrobiálních buněk.	27
Tabulka 2: Vybrané aplikace imunomagnetických technik.....	32
Tabulka 3: Příklady izolace lidských, živočišných a rostlinných buněk s magneticky značenými antigeny.	36
Tabulka 4: Ostatní typy lidských buněk.	37

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

IMS – Imunomagnetická separace (z angl. „ImmunoMagnetic Separation“)

IMN – Imunomagnetické nanočástice (z angl. „ImmunoMagnetic Nanoparticles“)

MNs – Magnetické nanočástice (z angl. „Magnetic Nanoparticles“)

MACS – Magneticky aktivované třídění buněk (z angl. „Magnetic-Activated Cell Sorting“)

HGMS – Magnetický separátor s vysokým gradientem (z angl. „High Gradient Magnetic Separator“)

FACS – Fluorescence aktivovaného třídění buněk (z angl. „Fluorescence-Activated Cell Sorting“)

AST – Testování antibiotické citlivosti (z angl. „Antibiotic Susceptibility Testing“)

CFU – Kolonie tvořící jednotky (z angl. „Colony Forming Units“)

QDs – Kvantové tečky (z angl. „Quantum Dots“)

RT-PCR – Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. „Real-Time Polymerase Chain Reaction“)

CTC – Cirkulující nádorové buňky (z angl. „Circulating Tumor Cells“)

MSFB – Magneticky stabilizované fluidní lože (z angl. „Magnetically Stabilized Fluidized Beds“)

ÚVOD

Separace specifických molekul se používá ve všech oblastech biologických věd. Jednou z metod, jak separovat specifické buňky, je magnetická separace buněk. V biologických aplikacích je využívána pro izolaci aktivních látek, specifických buněk a buněčných komponent. Izolované buňky pak mohou být dále využívány pro analýzy.

Principem magnetické separace je vazba buněk na magnetické částice a následné oddělení těchto komplexů od zbytku směsi. V současné době představují magnetické částice cestu relativně snadné a rychlé separace buněk. Buňky jsou separovány na základě jejich specifické vazby na povrch magnetické částice za vzniku imobilizovaných komplexů. Tyto komplexy je poté možné odseparovat z daného prostředí díky magnetickým vlastnostem částic.

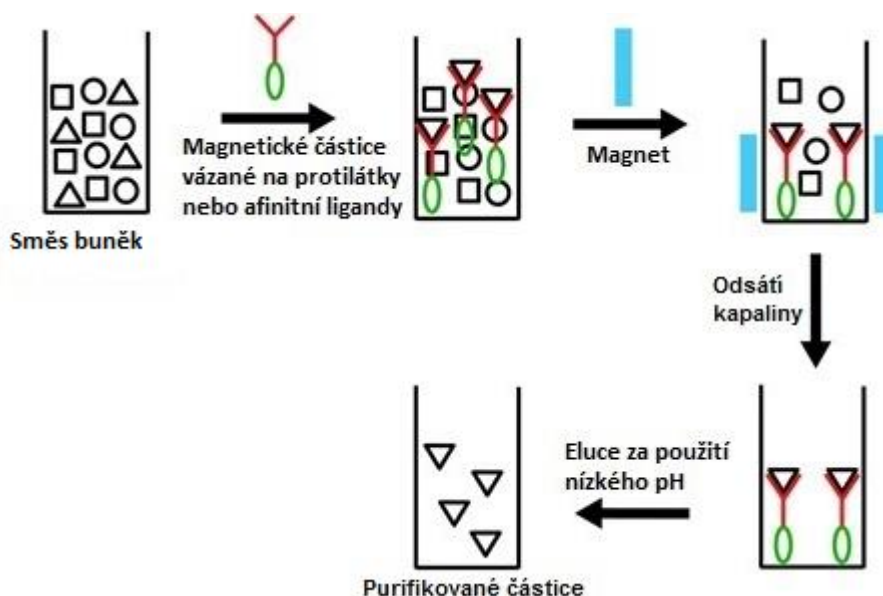
Separace magnetických buněk jsou výhodné, pokud jde o přímou izolaci cílových buněk ze surových vysoce komplexních biologických vzorků, jako je krev, kostní dřev, stolice, potraviny, suroviny pro výrobu potravin, odpadní voda, apod. Izolované buňky jsou čisté, životaschopné, nezměněné a je možná automatizace celého procesu. Magnetické částice v případě dalších kultivačních kroků nemusí být od izolovaných (zachycených) mikrobiálních buněk odděleny, protože jejich vazba na povrch magnetických částic nemá žádný vliv na jejich růst a buňky se mohou nadále množit.

Imunomagnetická separace, kde je ligandem specifická protilátka navázaná na povrch magnetických částic, se uplatnila zejména pro detekci patogenních mikroorganismů v potravinářství, veterinární a environmentální mikrobiologii. Jako příklady lze uvést stanovení mikrobiálních patogenů, jako je například *E-coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* v potravinách (Horák et al., 2007).

1 PRINCIP IMUNOMAGNETICKÉ SEPARACE

Magnetická separace pomocí magnetických částic se stala rutinní metodikou pro oddělení klíčových buněčných populací od biologických suspenzí. Manipulace s magnetickými částicemi je nyní standardizovaným krokem v mnoha procesech v oblasti tkáňového inženýrství, medicíny a biologického výzkumu (Plouffe et al., 2015).

Metoda imunomagnetické separace využívá vysoce afinitní ligandy spojené s magnetickými částicemi. Během doby inkubace se cílené buňky váží na magnetické částice. Vazba magnetických kuliček selektivně umožňuje izolaci specifických cílových molekul. Celý magnetický komplex se následně oddělí od vzorku pomocí magnetického pole (He et al., 2014; Iranmanesh & Hulliger, 2017). Proces magnetické separace pro buňky je zobrazen na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Magnetická separace buněk. Převzato a upraveno z Saraswat et al., 2013

Při práci s buňkami lze rozlišit dva typy magnetické separace. V prvním typu vykazují buňky, které mají být odděleny, dostatečný vnitřní magnetický moment, proto magnetické separace mohou být provedeny bez jakékoliv modifikace. Zde patří pouze dva typy takových buněk v přírodě a to jsou magnetotaktické bakterie obsahující malé magnetické částice a červené krvinky (erythrocyty) obsahující vysoké koncentrace paramagnetického hemoglobinu. Ve druhém typu musí být jeden nebo více nemagnetických složek buňky označeny magnetickou částicí. Obvykle se používají protilátky proti povrchovým epitopům specifických buněk, ale mohou být použity i jiné specifické ligandy. Nově vytvořené

komplexy mohou být odděleny pomocí vhodného magnetického separátoru (Häfeli et al., 1997; Šafařík & Šafaříková, 1997).

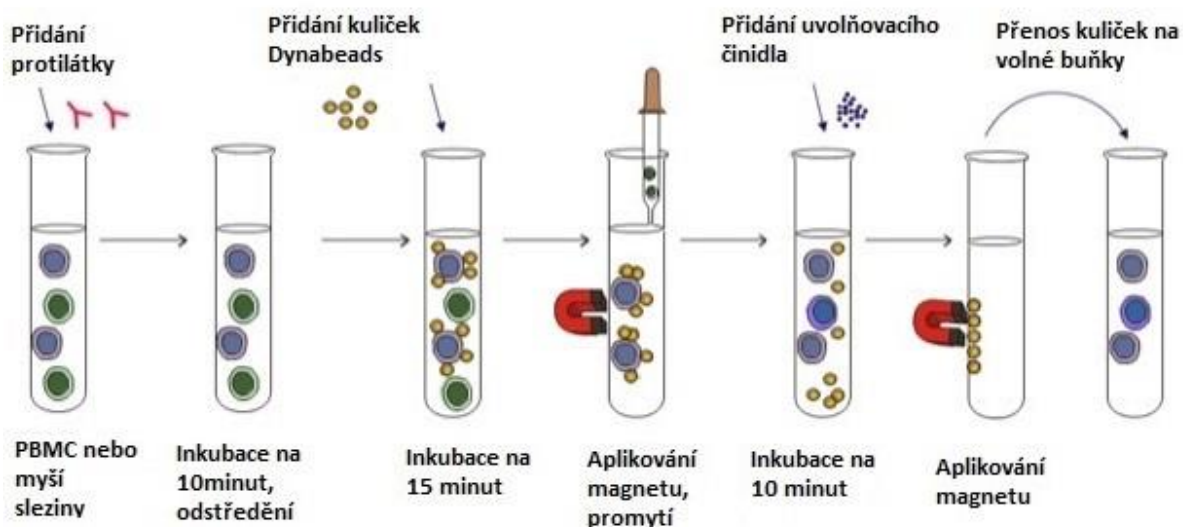
Obecně lze magnetickou separaci provádět pomocí přímé nebo nepřímé metody. V přímé metodě je vhodný afinitní ligand přímo připojen k magnetickým částicím nebo biopolymerům vykazujícím afinitu k cílové sloučenině. Následně je přidán přímo do buněk obsahujících vzorek. Během inkubace se magnetické částice váží na cílové buňky a vytvářejí stabilní magnetické komplexy, které pak mohou být získány pomocí magnetických separátorů (He et al., 2014; Šafařík & Šafaříková, 2004; Šafařík & Šafaříková, 1999). V nepřímé metodě se buňky senzibilizované pomocí primárního afinitního ligandu nejprve inkubují s primární protilátkou proti cílové struktuře a vzniklý konjugát je pak zachycen vhodným afinitním magnetickým nosičem s imobilizovanou sekundární protilátkou. Nosič může být funkcionalizován s proteinem A nebo proteinem G, které se vážou na protilátku konjugátu (Horák et al., 2007).

Přímá technika je rychlejší, více kontrolovatelná a vyžaduje méně protilátek (He et al., 2014). Nepřímý postup může fungovat lépe, jestliže afinitní ligandy mají slabou afinitu k cílové sloučenině a doporučuje se, pokud má cílová buňka nízkou hustotu povrchových antigenů (Šafařík & Šafaříková, 2004, Šafařík & Šafaříková, 1999). U pozitivního výběru se buňky, které jsou předmětem zájmu, shromažďují jako cílové populace. Tento způsob výběru je nejčastější technikou pro separaci buněk. Techniky negativního výběru izolují nespecifické buňky z heterogenních suspenzí a zanechávají za sebou cílové buňky v suspenzi. I když velké množství (> 95%) nežádoucích buněk může být odebráno z daného vzorku, zůstává malá populace nežádoucích buněk v suspenzi cílových buněk, která vede k nízké čistotě (Plouffe et al., 2015).

1.1 Pozitivní a negativní metoda imunomagnetické separace

Pozitivní izolace je metoda pro separaci jedné specifické cílové buněčné populace ze vzorku. Magnetické částice pokryté cílovými specifickými protilátkami se budou vázat pouze na buňky s odpovídajícím povrchovým antigenem vyjádřeným na povrchu cílových buněk. Pracovní postup pozitivní izolace s uvolněním kuliček je shrnut v následujícím obrázku č. 2 (Thermo Fisher Scientific, 2016).

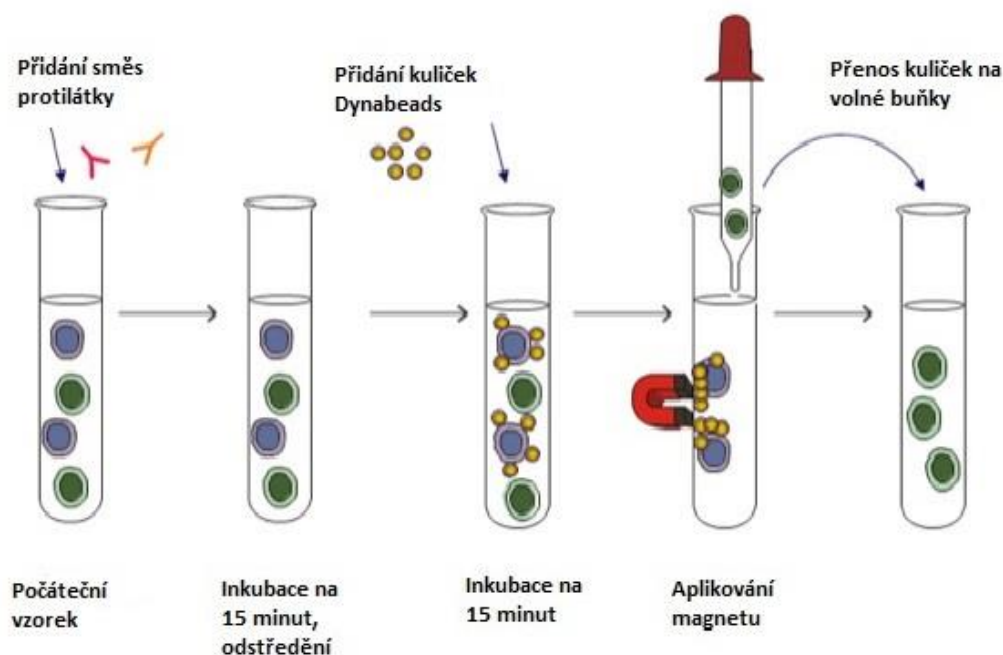
Pozitivní izolace buněk



Obrázek 2: Pozitivní izolace buněk. Schéma magnetické separace buněk, kde jsou protilátky použity jako afinitní ligandy a Dynabeads jako magnetické částice. Převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific, 2016

Při negativní separaci jsou ze suspenze vychytány všechny buňky, které je možno odstranit. Buňky tedy prochází kolonou, aniž by se vážali na specifické protilátky, které jsou navázané na povrchu magnetických kuliček. Magnetické kuličky používané v negativní izolaci jsou buď potaženy streptavidinem (pokud jsou protilátky ve směsi biotinylovány) nebo sekundárními protilátkami (pokud jsou protilátky ve směsi z jediného hostitelského druhu). Negativní separace je dražší, protože zde je zapotřebí více druhů specifických protilátek. Tato technika se velmi často používá pro izolaci buněk CD34 a subpopulaci lymfocytů (Šafařík & Šafaříková, 1995; Sobczak et al., 2010; Thermo Fisher Scientific, 2016) Pracovní postup negativní izolace je znázorněn na obrázku č. 3.

Negativní izolace buněk



Obrázek 3: Negativní izolace buněk. Převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific, 2016

Imunomagnetická separace je jednoduchá, specifická a účinná metoda. Může probíhat jen s několika manipulačními kroky v jediné zkumavce. Tento proces může být použit pro izolaci cílových bakterií přímo z původních nebo předem obohacených vzorků bez potřeby odstředění nebo filtrace. Tento druh separace je výhodný pro rychlou analýzu (Šafařík & Šafaříková, 2004; Su et al., 2004). Navíc magnetické separační postupy jsou účinné a výkonné zvláště pro rozsáhlé operace (He et al., 2014).

Magnetická separace obecně nabízí vysokou účinnost a specifčnost ve srovnání s centrifugačními nebo filtračními metodami (Rossi et al., 2014). Mezi výhody použití magnetických separačních technik ve srovnání s jinými postupy patří vysoká univerzálnost, možnost pracovat bez předběžného zpracování účinného materiálu i v heterogenních médiích a opětovná využitelnost sorbentů po magnetické separaci (Holá et al., 2015).

1.2 Magnetické částice

Magnetické nosiče jsou buď připraveny v laboratoři, nebo mohou být použity komerční nosiče. Obvykle jsou dostupné ve formě magnetických částic připravených z různých syntetických polymerů, biopolymerů nebo porézního skla (Šafařík & Šafaříková, 2004). Biokompatibilní magnetické oxidy železa magnetit a maghemit (případně jejich směsi)

jsou nejčastější materiály pro přípravu magnetických nosičů biologicky aktivních látek. Řadí se tam také různé typy feritů ve formě prášků nebo magnetických kapalin (Pečová et al., 2011). Konečná velikost a tvar distribuce velikosti syntetizovaných částic závisí na způsobu přípravy, reakční teplotě, pH, iontové síle, použitém obalovém materiálu apod. (Zapletalová et al., 2014)

Výhody používání magnetických částic spočívají v jednoduché manipulaci a minimálním ztrátám nosiče v průběhu promývání. Mezi rychlou a snadnou možností patří schopnost oddělit izolovaný analyt od zbytku reakční směsi bez nutnosti centrifugace a minimálního zředování analytu (Šafařík & Šafaříková, 1999).

Mikročástice jsou složeny z fero- nebo ferimagnetické složky, která je zodpovědná za interakci s vnějším magnetickým polem a většinou diamagnetické (nemagnetické) složky, která zajišťuje požadovanou interakci s biologickým systémem (např. s buněčnou suspenzí). Jejich výhodou je možnost cílené manipulace působením vnějšího magnetického pole (Pečová et al., 2011). Magnetické částice se chovají jako superparamagnetické, což znamená, že magnetické vlastnosti vykazují pouze po vložení do magnetického pole, ale neinteragují v nepřítomnosti magnetického pole (Šafařík & Šafaříková, 2004).

Magnetické mikročástice jsou účinně používány v mnoha oblastech biologických věd, biotechnologie a medicíny. Magneticky citlivé materiály mohou být používány pro různé aplikace, protože vykazují několik typů reakcí na externí magnetické pole a tudíž mohou být selektivně oddělené od obtížně ovladatelných prostředí pomocí magnetického separátoru (Šafařík et al., 2016).

Existuje mnoho společností, které vyrábějí výhradně magnetické částice pro různé aplikace, včetně separace buněk. Mezi největší globální poskytovatele magnetických částic patří BD Sciences (Spojené státy americké, San Jose), Bang Laboratories (Spojené státy americké, Fishers) a Thermo Fisher Scientific (Spojené státy americké, Waltham). Celkově je separace magnetických buněk rostoucím odvětvím a je velkým příslibem pro pokračující budoucí inovace (Plouffe et al., 2015).

1.2.1 Syntéza magnetických částic

Mezi metody přípravy různých typů magnetických mikročástic patří spolusrážecí (koprecipitační) reakce solí železa, sol-gel reakce, heterogenní polymerizační techniky, sonochemické syntézy aj. (Horák et al., 2007).

Spolusrážecí reakce

Tato metoda je nejjednodušší a nejčastější způsob přípravy magnetických částic oxidu železa z vodného roztoku. Velikost a tvar vzniklých oxidů železa záleží na typu použité soli, pH, reakční teplotě a iontové síle. Vznikají většinou částice s různou velikostí. Monodisperzity částic je dosaženo přidáním chelatajících organických aniontů (např. kyseliny citronové), nebo polymerů jako je dextrans, poly(vinylalkohol) či škrob (Pečová et al., 2011; Plouffe et al., 2015). Hlavní výhodou spolusrážení je to, že magnetické částice lze snadno syntetizovat ve velkém měřítku (He et al., 2014).

1.3 Funkcionalizace a stabilizace povrchu magnetických částic

U biologických aplikací musí být prováděna povrchová biofunkcionalizace magnetických mikročástic s hydrofobními skupinami, afinitními skupinami a protilátkami na povrchu, aby se umožnila jednoduchá adsorpce nebo specifická vazba biomolekul (He et al., 2014).

Magnetické částice se pokrývají vnější vrstvou přírodních či syntetických polymerů z důvodu stabilizace, aby nemohlo docházet k jejich oxidaci a jiným nežádoucím interakcím s okolím. U funkcionalizovaných magnetických částic musí být potlačeny vzájemné interakce a musí být umožněna chemická modifikace nezbytná pro následnou imobilizaci biomolekul (Pečová et al., 2011).

Mezi typické funkční skupiny používané pro primární funkcionalizaci patří hydroxylové skupiny (např. PEG, polysacharidy), aminové skupiny (např. polyethylenimin, chitosan) a karboxylové skupiny (např. citrát, kyselina polyakrylová, alginát) (Holá et al., 2015).

Magnetické částice mohou být modifikovány silanizací. Jako silanizační činidla se často používají (3-aminopropyl) triethoxysilan nebo glycidylxypropyltriethoxysilan. Je možno použít tři základní metody silanizace, a to z vodné fáze (kdy vzniká vrstva stabilnější ve vodném prostředí), z organické fáze nebo odpařováním daného silanu. Funkční skupiny silanizovaných magnetických částic (např. $-NH_2$) je následně možné využít pro vazbu různých typů biologických afinantů (Pečová et al., 2011).

1.4 Způsoby imobilizace ligandů

Obvykle se pro imobilizaci používají funkční skupiny dostupné na povrchu magnetických částic, jako je $-COOH$, $-OH$ nebo $-NH_2$ (Šafařík & Šafaříková, 2004).

Je důležité, aby při imobilizaci protilátek bylo rozpoznávací místo (tzv. Fab oblast) vhodně orientováno a byla tak zachována plná biologická funkce. Proto je možno dosáhnout lepších výsledků, pokud jsou nejdříve na částicích imobilizovány sekundární protilátky, které fungují jako spojkové prvky a poté primární (Pečová et al., 2011).

1.4.1 Přímá fyzikální sorpce ligandu na nosič

Někdy lze pro imobilizaci využít přímou fyzikální sorpci na nosič, která je jednou z nejstarších metod a stala se ekonomicky výhodným a snadným postupem, je však méně spolehlivá a málo stabilní (Pečová et al., 2011).

1.4.2 Zabudování biomolekul do magnetické gelové matrice

Další používanou fyzikální technikou imobilizace je zabudování biologicky aktivních látek, případně celých buněk, do magnetické gelové matrice. Gelové matrice mají schopnost zadržovat vodu, což je nutné pro uchování biologické aktivity imobilizovaných látek. Matrice jsou tvořeny proteiny (želatina, kolagen), dále syntetickými polymery jako jsou polyakrylamid, polyurethany a polysacharidy (agar, agarosa). Prostředí gelů je blízké fyziologickým podmínkám a tak jsou zachovány biologické funkce zakotveného biologického materiálu, avšak nevýhodou je jejich postupné uvolňování (Pečová et al., 2011).

1.4.3 Imobilizace ligandu kovalentní vazbou na nosič

Kovalentní vazba je nejčastěji používanou technikou pro imobilizaci (Malygin et al., 1993). Kovalentní vazba lze vytvořit reakcí mezi specifickými funkčními skupinami (např. -COOH, -NH₂, -CONH₂, -OH skupinami) na povrchu nosiče a -NH₂ nebo -SH skupin na proteinových molekulách v přítomnosti konjugačního činidla (např. glutaraldehyd, karbodiimid). Kovalentní vazba monoklonálních protilátek přes jejich nejreaktivnější aminové skupiny je jedním z nejběžnějších postupů, které mohou vést k jejich náhodné orientaci tak, že se může objevit ztráta rozpoznávací aktivity (He et al., 2014).

Při imobilizaci ligandu na nosič je potřeba vzít v úvahu jeho prostorovou orientaci na nosiči, aby mohl ligand i po vazbě aktivně vázat příslušný analyt ze vzorku. Pokud dojde k imobilizaci více ligandů blízko sebe, tak to způsobí nepřístupnost vazebného místa ligandu pro analyt nebo může dojít k navázání ligandu více než jednou vazbou k nosiči, které opět způsobí nepřístupnost vazebného místa ligandu pro analyt ze vzorku (Magdeldin, 2012).

Tato metoda je v dlouhodobém horizontu finančně výhodnější, protože stabilita

připravených nosičů je vyšší a nevyžaduje regeneraci nosiče (Kim & Hage, 2006). Kovalentní vazba protilátek na reaktivní skupiny aktivovaných, komerčně dostupných částic je levný a rychlý způsob připojení protilátky k pevné fázi.

1.4.4 Vazba ligandu na povrch magnetických částic nekovalentní vazbou

Streptavidin (avidin) – biotin komplex

Užitečná technika pro imobilizaci řady látek je založena na využití magnetických částic s imobilizovaným avidinem nebo streptavidinem, které vykazují vysokou afinitu k biotinu (vitamín B7, vitamín H). Častěji se používá streptavidin, což je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidini*, jedná se o tetramer, který vykazuje nižší nespecifické interakce. Avidin je glykoprotein vaječného bílku, složený ze čtyř stejných podjednotek s vysokou afinitou pro biotin. Komplex biotinu a streptavidinu (resp. avidinu) je velmi pevný a odolává i velmi tvrdým reakčním podmínkám (Pečová et al., 2011).

1.5 Magnetické separátory

Magnetické separátory jsou nezbytné pro oddělení magnetických částic. Magnetické částice o průměru větším než cca 1 μm lze snadno oddělit pomocí jednoduchých magnetických separátorů, zatímco separace menších částic (magnetické koloidy s velikostí částic v rozmezí desítek až stovek nanometrů) může vyžadovat použití magnetických separátorů s vysokým gradientem (Šafařík & Šafaříková, 2004). V dnešní době existuje několik typů magnetických separátorů. Hlavní výběr závisí nejen na velikosti částic, které budou separovány, ale také na celkovém objemu, ze kterého mají být odstraněny. Nejčastěji jsou založeny na využití silných permanentních magnetů nebo elektromagnetů. V praxi se dají separátory jednoduše rozdělit na dva typy, stacionární a průtokové (Šafařík & Šafaříková, 1999).

Je třeba zvolit zdroj magnetického pole pro zařízení mezi permanentním magnetem a elektromagnetem. Elektromagnety mají výhody v tom, že konstrukce lze snadno zapnout/vypnout, aby se usnadnilo zachycování a uvolňování buněk. Elektromagnety mají omezené využití, protože vytvářejí spíše slabá magnetická pole. Jiné konstrukce využívají permanentní magnety, které mají nastavenou sílu magnetického pole a mají omezenou kontrolu nad velikostí generování magnetického toku. Permanentní magnety jsou snadno dostupné a jejich implementace do schématu magnetické separace buněk je poměrně jednoduchá (Plouffe et al., 2015).

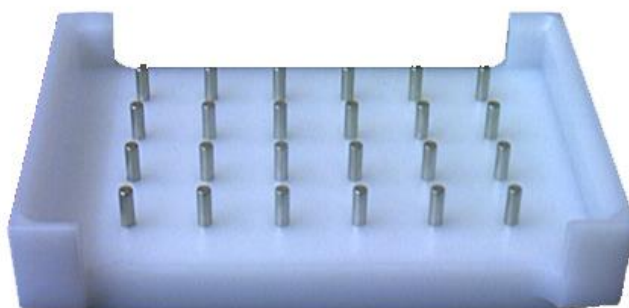
1.5.1 Stacionární separátory

Častějším a jednodušším typem jsou stacionární magnetické separátory. Tyto separátory jsou ve tvaru destiček či stojánků s otvory pro různé velikosti zkumavek viz obrázek č. 4 a 5. Silné magnety potřebné pro separaci jsou umístěné ve stojanech na zkumavky. Po vložení zkumavky do stojánku se komplexy s navázanými cílovými strukturami rychle přitáhnou k její stěně (Thermo Fisher Scientific, 2016).

Pro mobilní aplikace



Obrázek 4: Různé velikosti magnetických separátorů pro zkumavky. Převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific, 2016



Obrázek 5: Magnetický separátor mikrotitrační desky. Převzato a upraveno z RayBiotech, 2007-2018

1.5.2 Průtokové magnetické separátory

Průtokové magnetické separátory jsou obvykle dražší. Mezi typické příklady patří magnetické separátory s vysokým gradientem (HGMS). HGMS se skládá z kolony, která je umístěna mezi póly silného permanentního magnetu a je vyplněná magnetickou maticí (ocelovou vlnou). Při průtoku suspenze kolonou dochází ke vzniku silných lokálních gradientů magnetického pole, která způsobují zachycení i velmi malých magnetických částic.

Suspenze se čerpá přes sloupec a magnetické částice se zadržují uvnitř matrice. Po odstranění kolony z magnetického pole jsou částice získány proudem (Šafařík & Šafaříková, 2004, Šafařík & Šafaříková, 1995). Na obrázku č. 6 je zobrazen HGMS separátor od firmy Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, 2018).



Obrázek 6: MidiMACS Separátor od firmy Miltenyi Biotec. Převzato a upraveno z Miltenyi Biotec, 2018

Také existují různé druhy automatizovaných separátorů, které nabízejí efektivní separaci buněk pro zvýšení propustnosti a produktivity. Základním automatickým separátorem je například AutoMACS Pro Separátor na obrázku č. 7 (Miltenyi Biotec, 2018).

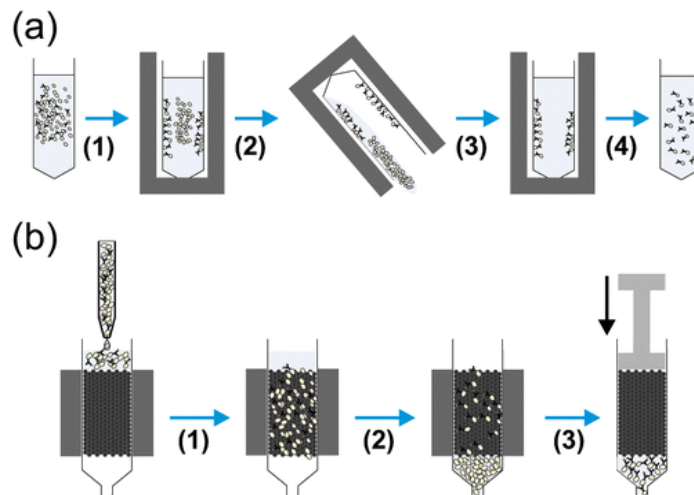


Obrázek 7: AutoMACS Pro Separátor od firmy Miltenyi Biotec. Převzato a upraveno z Miltenyi Biotec, 2018

1.5.3 Systémy třídění buněk

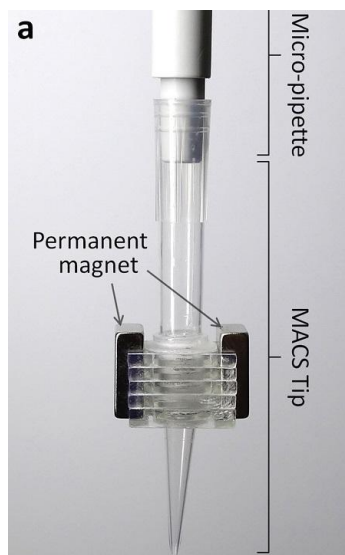
Metody vázající protilátky obecně odkazují na běžně používané techniky fluorescence aktivovaného třídění buněk (FACS) a třídění magneticky aktivovaných buněk (MACS). Obě technologie využívají antigeny buněčného povrchu. Separace FACS závisí na konjugaci fluorescenčních značek s protilátkami, zatímco MACS používá konjugaci oxidu železa.

MACS vyžaduje, aby buňky byly umístěny v magnetickém poli; neoznačené buňky se eluují a značené buňky se uchovávají v poli, dokud nejsou odstraněny z magnetu, čímž se vytvoří oddělené populace. MACS lze považovat za metodu, v níž nelze analyzovat každou jednotlivou buňku, na rozdíl od FACS. Na obrázku č. 8 jsou diagramy znázorňující běžné metody používané k separaci magnetických buněk. (A) magneticky značené buněčné suspenze v kónické zkumavce (B) magneticky značená buněčná suspenze, která je vstříkována do kolony (Tomlinson et al., 2012).



Obrázek 8: Diagramy znázorňující běžné metody. Převzato a upraveno z Tomlinson et al., 2012

Magnetické aktivované třídění buněk (MACS) umožňuje paralelní zachycování a uvolňování velkého množství cílových buněk. V konvenčních MACS přístupech, jsou cílové buňky připojeny na funkcionalizované magnetické částice a pak zachyceny v koloně s náplní ocelových kuliček. Separační kolona umožňuje vysoce gradientní magnetické separace a obnovu cílových buněk pomocí jednoduchého pipetování, ale nepravidelná a hustá feromagnetická matrice může vést ke komplikacím (Oh et al., 2018).



Obrázek 9: MACS Tip pro imunomagnetickou separaci. Skládá se z vrstev niklu, které mohou být zmagnetizované s permanentními magnety. Převzato a upraveno z Oh et al., 2018

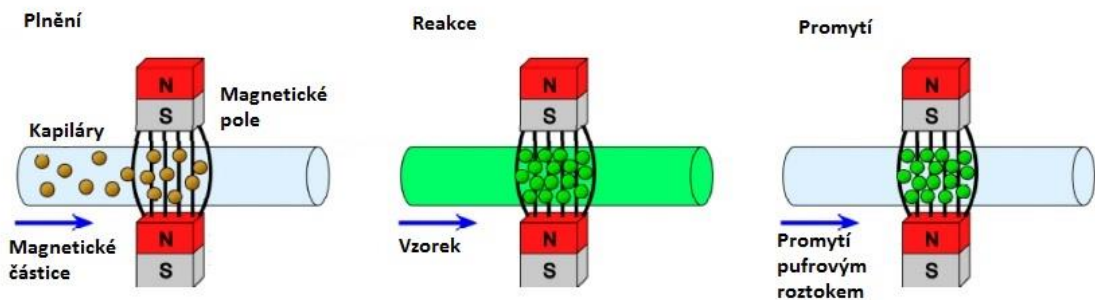
K určení klinické užitečnosti byl MACS Tip použit jako nástroj pro přípravu vzorků pro detekci bakterií kontaminovaných v krvi. Jako modelový systém byly *E. coli* značeny magnetickými nanočásticemi konjugovanými s lektinem vázajícím manózu a následně byly přidány do ředěné plné krve. Bakteriální vzorek prošel přes MACS Tip. Bakterie byly získány demagnetizací MACS Tipu (Oh et al., 2018).

1.6 Metoda magneticky stabilizovaného fluidního lože

Bioafinitní chromatografie využívající magnetické částice může být dělena na základě uspořádání stacionární fáze na kolonovou, vsádkovou a mikrofluidní.

Mikrofluidní uspořádání je využíváno díky vyšší účinnosti separace a nižším nákladům pro analýzy. Toto uspořádání je možné použít pro superparamagnetické částice mikrometronových nebo nanometrových rozměrů. Magnetické částice mohou být magneticky stabilizovány ve fluidním loži tzv. MSFB (Magnetically Stabilized Fluidized Bed) nebo mohou být použity ve formě kompaktního "plugu" (zátky). Při použití magnetické zátky jsou magnetické částice drženy mezi dvěma magnety v určité části kapiláry a poté je k zachyceným částicím aplikován vzorek. V další části dochází k promytí a eluci příslušného analytu. Postup je zobrazen na obrázku č. 10 (Phurimsak et al., 2016). Buňky se odchyľují od směru proudění na základě jejich magnetických vlastností v reakci na magnetické pole (Iranmanesh & Hulliger, 2017). Externí permanentní magnet vytváří gradient magnetického pole uvnitř komory ve tvaru trojúhelníku, což má za následek orientaci magnetické síly

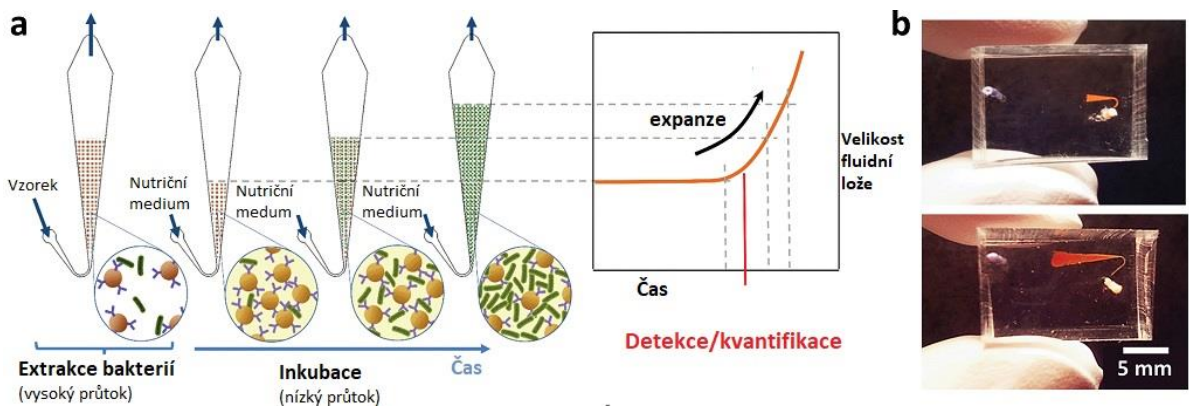
směrem ke vstupu komory. Celková délka fluidního lože je přímo závislá na aplikované průtokové rychlosti v důsledku změny pórovitosti lože (Pereiro et al., 2017).



Obrázek 10: Postup magnetických částic v mikrofluidním systému. Převzato a upraveno z Phurimsak et al., 2016

Ve studii (Pereiro et al., 2017) je prezentována mikrofluidní metoda pro specifické zachycení a detekci infekčních bakterií. Metoda zahrnuje fluidní lože s mikroskopií, v níž jsou magnetické a tažné síly vyrovnány tak, aby se udržely protilátky funkcionalizované superparamagnetickými kuličkami v komoře během perfúze vzorku. Byla provedena úspěšná detekce *S. Typhimurium* s účinností vyšší než 70 % a specificitou vyšší než 500/1 ve srovnání s jinými bakteriemi. Univerzálnost metody byla prokázána detekcí jiných druhů bakterií *Escherichia coli O157: H15* a *Enterobacter cloacae* (Pereiro et al., 2017).

V Obrázku č. 11 je znázorněno (a) postupné zachycování a oplachování vzorků, po té bylo provedeno měření expanze fluidního lože (b) mikrofluidní čip na začátku a na konci typického experimentu s pozitivním výsledkem (Pereiro et al., 2017).



Obrázek 11: Příklad detekce bakterií ve fluidním loži. Převzato a upraveno z Pereiro et al., 2017

2 IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE PROKARYOTICKÝCH BUNĚK

Imunomagnetické separace nalezly mnoho využití zejména v potravinářské, klinické, veterinární a environmentální mikrobiologii. Základní úlohou těchto technik je detekce patogenních mikroorganismů. Jednou z možností zkrácení doby izolace a detekce je nahrazení fáze selektivního obohacení postupem, který není spojen s růstem. Toho lze dosáhnout pomocí specifické magnetické separace cílového organismu přímo ze vzorku nebo předem obohaceného média. Izolované buňky mohou být identifikovány standardními mikrobiologickými postupy. IMS je nejen rychlejší, ale také obvykle dává vyšší počet pozitivních nálezů (Cudjoe et al., 1994). Princip IMS cílových mikroorganismů je schematicky znázorněn na obrázku č. 12.



Obrázek 12: Princip imunomagnetické separace mikroorganismů. Převzato a upraveno z Horton et al., 1989

Pomocí IMS je rovněž možno separovat a následně stanovit i subletálně poškozené cílové mikrobiální buňky. IMS neovlivňuje životaschopnost zachycených buněk, a proto magneticky separované buňky mohou být kultivovány na selektivních agarech nebo tekutých živých médiích a testovány standardním způsobem. Výhodné pro mikrobiologické rozbory je použití kombinace IMS a PCR, které přináší několik výhod jako např. možnost zkoncentrování cílových buněk s využitím magnetických částic. (Šafařík & Šafaříková, 2011).

Vlastní imunomagnetickou separaci je možno provést v jakékoli mikrobiologické laboratoři. V nejčastějším uspořádání se testovaný materiál suspenduje ve vhodném neselektivním pomnožovacím médiu a po dobu 6 až 24 hodin probíhá kultivace při vhodné teplotě (nejčastěji v rozmezí 30 až 42°C). Poté je odebrán 1 ml kultivačního média a smíchán

s 10 nebo 20 µl suspenze příslušných imunomagnetických částic. Následuje 10 až 30 minutová inkubace, kdy dochází k navázání cílových buněk na imunomagnetické částice. Poté jsou magnetické částice s navázanými buňkami pomocí magnetu odseparovány ke stěně mikrozkušky a médium je opatrně odstraněno. Následuje opakované promytí magnetických částic vhodným pufrem, kdy jsou (po magnetické separaci mikročástic) odstraněny doprovodné buňky a případně přítomné zbytky analyzovaného materiálu (Šafařík & Šafaříková, 2011).

Mnoho mikroorganismů bylo izolováno pomocí IMS, je patrné z tabulky č. 1. Pro detekci nejdůležitějších mikrobiálních patogenů jsou komerčně dostupné specifické imunomagnetické částice (Šafařík & Šafaříková, 1999).

Tabulka 1: Příklady imunomagnetické separace mikrobiálních buněk. Převzato a upraveno z Šafařík & Šafaříková, 1999

Mikroorganismus	Magnetické částice	Primární protilátka	Analyzovaný vzorek	Reference
<i>Bacillus anthracis</i> spores	Dynabeads M-280 streptavidin	Biotinylovaná koží anti-B. anthracis spora Ab	Modelové vzorky	(Gatto-Menking et al., 1995)
<i>Clostridium difficile</i>	Magnisort	Myší MAb proti C. difficile	Vzorky stolice	(Wolfhagen et al., 1994)
<i>Escherichia coli</i> O157	Komerčně dostupné Dynabeads anti-E. coli O157		Vzorky stolice	(Karch et al., 1996)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Dynabeads M-280	MAb proti L. monocytogenes flagella	Vzorky potravin	(Skjerve et al., 1990)
<i>Shigella dysenteriae</i>	Dynabeads M-450	MAb proti O antigenům S. dysenteriae	Vzorky stolice	(Islam et al., 1992)
<i>Salmonella</i> sp.	Komerčně dostupná Dynabeads anti-Salmonella		Vzorky potravin	(Mansfield & Forsythe, 1993)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	BioMag	Abs proti Y. enterocolitica O:3	Vzorky stolice	(Rasmussen et al., 1995)

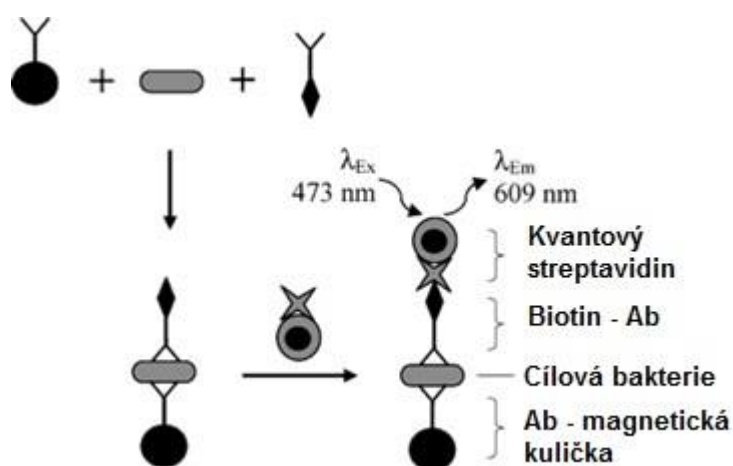
Pro IMS bakterií se obvykle používají různé bakteriální antigeny, jako jsou antigenní determinanty na buněčné stěně (O-antigeny) nebo flagelární a fimbriální antigeny (Šafařík & Šafaříková, 1999).

Protein A, izolovaný ze *Staphylococcus aureus*, váže Fc oblast IgG většiny savčích druhů s vysokou afinitou a ponechává volné místo specifické pro antigen. Protein G, izolovaný ze *Streptococcus sp.*, reaguje s větším počtem izotypů IgG. Má vyšší vazebnou afinitu k imunoglobulinům než protein A, ale také interaguje s Fab oblastmi IgG, ačkoli afinita je desetkrát nižší než u Fc oblasti (Šafařík & Šafaříková, 2004).

Nahrazení metody klasické izolace za „drop-plating“ je výhodná s ohledem na čas. Byly použity polyklonální anti-*F. tularensis* nebo anti-*Y. pestis* protilátky konjugované s magnetickými částicemi k selektivnímu zachycení *F. tularensis*. Tento postup umožnil izolaci dostatečného množství *F. tularensis* pro AST v nejkratším časovém období pro všechny zkoumané krevní kultury v rozmezí přibližně od 10^3 CFU/ml do více než 10^9 CFU/ml. Výsledky naznačují, že tato metoda obsahuje účinný a rychlý postup, který může být použit pro rychlou izolaci bakterií *F. tularensis* a *Y. pestis* (Aloni-Grinstein et al., 2017).

Potenciální hrozba spor antraxu používaných jako biologická zbraň vyžaduje rychlé a spolehlivé prostředky detekce, které jsou přenosné, nákladově efektivní a snadno ovladatelné. Byla vyvinuta amperometrická imunoanalýza za použití imunomagnetické separace za účelem zachycení spor a odstranění potenciálních interferencí z testovaných vzorků s následným amperometrickým měřením na přenosném přístroji. Konjugované magnetické částice a glukózooxidázou konjugované protilátky byly použity pro zachycení a detekci cílových spor. Aktivita glukózoxydasy byla měřena nepřímo pomocí amperometrie po inkubaci s glukózou a peroxidázou. Zachytávání bylo zprostředkováno polyklonálními anti-*B. anthracis* protilátkami, zatímco glukózooxidázou konjugované monoklonální protilátky byly použity pro generování signálů. Tato strategie maximalizovala citlivost a zároveň poskytovala dobrou specificitu pro spory *Bacillus anthracis*. Inkubace detekčních protilátek a rychlý vývoj substrátu má za následek krátkou dobu odběru vzorků (méně než hodinu). Amperometrie je nízkonákladová a představuje praktickou metodu pro detekci spor antraxu. Citlivější detekční metody, jako ELISA nebo PCR, obvykle používají časově náročné protokoly a nástroje, které nejsou vhodné pro použití v terénu, nebo vyžadují před testováním obohacení nebo čištění vzorků. Tento test byl vyvinut jako rychlá a citlivá metoda pro detekci sporových antraxů v polních podmínkách. Tato metoda je schopna měřit až 500 spór za méně než jednu hodinu celkového času stanovení a má kvantitativní detekční rozsah od 5×10^3 do 5×10^6 CFU/ml. Specificita testu pro spory *B. anthracis* závisí na použitých protilátkách. Tato metoda je slibným nástrojem pro budoucí detekci spor antraxu v terénu (Waller et al., 2016).

Citlivá, specifická a rychlá metoda pro detekci *E. coli* O157: H7 byla prokázána použitím kvantových teček (QD) jako fluorescenčního markeru spojeného s imunomagnetickou separací (Su et al., 2004). Magnetické částice potažené anti-*E. coli* O157 byly použity pro selektivní zachycení cílové bakterie. Následně byly přidány protilátky konjugované s biotinem za vzniku imunokomplexů. Po magnetické separaci byly imunokomplexy značeny QD tečkami pomocí vazby biotin-streptavidin. Obrázek č. 13 znázorňuje princip detekce *E. coli* O157: H7 s QD jako indikátorem. Dále byla změřena fluorescence. Maximální intenzita fluorescenčního záření byla úměrná počáteční koncentraci buněk *E. coli* O157: H7 v rozmezí 10^3 - 10^7 CFU/ ml. Celková doba detekce byla kratší než 2 hodiny.



Obrázek 13: Schéma principu detekce *E. coli* O157: H7. Převzato a upraveno z Su et al., 2004

Žádná významná interference nebyla pozorována u *E. coli* nebo *S. typhimurium*. Popsaná koncepce může být modifikována pro detekci více patogenů současně (Su et al., 2004). Křížová reaktivita je reakce protilátky s jiným antigenem, odlišným od toho, který byl použit k imunizaci a vyvolal tvorbu této protilátky. K vazbě dochází díky strukturním podobnostem.

Výskyt potravinových infekcí způsobených *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* a *Staphylococcus aureus* v čerstvém vepřovém masu se každoročně zvyšuje, což představuje velkou potenciální hrozbu pro veřejné zdraví. Ve studii (Ma et al., 2014) byla vyvinuta rychlá a současná detekce těchto tří patogenů z čerstvých vepřových vzorků kombinací imunomagnetické separace (IMS) ve spojení s multiplexním PCR v reálném čase (RT-PCR). Magnetické kuličky potažené specifickými protilátkami byly použity k zachycení a purifikaci patogenů. Poté byla aplikována multiplexní RT-PCR se třemi sadami specifických primerů a

sond. Hranice detekcí byla hodnocena u 67 vzorkovaných vepřových vzorků a pro *S. salmonella* byla 2,0 CFU/ g, 6,8 CFU/ g pro *Shigella* a 9,6 CFU/ g pro *S. aureus*. Konvenční testy pro tyto tři patogeny v běžném použití jsou založeny na mikrobiologických technikách. Přestože jsou tyto metody účinné pro rozpoznávání mikroorganismů, jsou časově náročné. Tato metoda má vysokou citlivost, specifitu a přesnost pro bakterie *Salmonella*, *Shigella* a *S. aureus* ve srovnání s běžně používanými kultivačními metodami. Dále tato metoda může významně snížit čas (méně než 8 hodin) detekce těchto patogenů v laboratořích, což nabízí potenciál pro rychlou reakci v případě nouze při detekci těchto bakterií (Ma et al., 2014).

Ve studii (Chen et al., 2015) byl popsán nový impedanční biosenzor kombinující imunomagnetickou separaci s ureázovou katalýzou pro citlivou detekci potravinářských bakterií za použití *Listeria monocytogenes* jako model a imobilizační mikroelektroda jako detektor. Monoklonální protilátky byly imobilizovány na povrchu magnetických nanočástic systémem biotin-streptavidin pro specifickou a účinnou separaci bakterie *Listeria*. Polyklonální protilátky a ureáza byly imobilizovány na povrch nanočástic zlata a následně byly použity k reakci s bakterií *Listeria* za vzniku komplexů. Ureáza katalyzovala hydrolyzu močoviny na uhličitán amonný a to vedlo ke zvýšení iontové síly média, které bylo detekováno mikroelektrodou. Účinnost magnetické separace pro *L. monocytogenes* v koncentracích v rozmezí od $3,0 \times 10^1$ do $3,0 \times 10^4$ CFU/ ml byla u čistých kultur nad 95%. Bylo zjištěno, že dolní detekční limit tohoto biosenzoru pro *L. monocytogenes* činí 300 CFU/ ml. Ukázalo se, že mikroelektroda mohla být znovu použita s důkladným čištěním deionizovanou vodou více než 50krát. Tento biosenzor ukázal svůj potenciál poskytnout jednoduchou, levnou a citlivou metodu pro rychlý „screening“ patogenních potravin. Impedanční biosenzor je typický elektrochemický biosenzor, který se obecně opírá o měření změny elektrochemické impedance na rozhraní elektrody. Často se vyznačuje rychlou detekcí a poměrně nízkou cenou. Tento biosenzor vykazoval vyšší nebo stejnou citlivost ve srovnání s jinými způsoby detekce *L. monocytogenes*. To bylo způsobeno zejména následujícími důvody: (1) účinnost separace *Listeria* byla vysoká; (2) katalýza ureázy významně zesiluje detekční signál a produktem močoviny je uhličitán amonný, který je silným elektrolytem a je citlivý na vodivost roztoku; (3) dále byly použity polyklonální protilátky pro získání více vazebných míst pro antigen; (4) v poslední řadě bylo použito interdigitální pole mikroelektrod s vysokou citlivostí elektrochemické impedance (Chen et al., 2015).

V práci Sanna et al. z roku 2014 byly polyklonální protilátky proti dvěma povrchovým proteinům *Mycoplasma agalactiae* (P80 a P55) kovalentně navázány na magnetické částice.

Buňky *Mycoplasma agalactiae* byly zachyceny specifickou reakcí antigen-protilátka a magnetickou separací. Imunomagnetické zachycení bylo použito k izolaci a koncentraci *M. agalactiae* v uměle kontaminovaném mléce k usnadnění následné detekce pomocí PCR. 375-bp fragment *M. agalactiae* byl amplifikován použitím páru primerů specifických pro *M. agalactiae* v PCR. Tato studie ukázala účinné využití rychlého a spolehlivého imunomagnetické zachycení kombinovaného s PCR testem pro detekci životaschopných *M. agalactiae*. Tato metoda poskytuje alternativu ke konvenční metodě mikrobiologické detekce a může být použita pro rychlou detekci *M. agalactiae* v rutinních vzorcích ovčího mléka (Sanna et al., 2014).

Ve studii (Ozalp et al., 2013) byly imobilizovány protilátky proti buňkám druhu *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* na magnetické kuličky pomocí reakce glutaraldehydu. IMS systém úspěšně oddělil buňky *Salmonella*, když koncentrace cílové (tj. *Salmonella*) a interferující (tj. *E. coli*) buňky byly na stejné úrovni. Byly provedeny testy polymerázové řetězové reakce (PCR) jako specifická selekce pro přesné potvrzení přítomnosti mikroorganismů *E. coli* a *Salmonella*. IMS a multiplexní metody PCR mohou být použity pro specifickou a kvantitativní detekci patogenů z potravinových vzorků. Tato studie tedy vyvinula spolehlivý a přímý systém pro rychlou detekci *Salmonella* a *E. coli* ve vzorcích potravin. Navíc metoda IMS může být snadno přizpůsobena k detekci jiných patogenů výběrem příslušné protilátky (Ozalp et al., 2013).

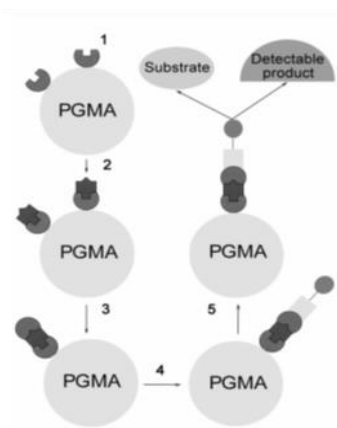
Tabulka 2: Vybrané aplikace imunomagnetických technik. Převzato a upraveno z Šafařík & Šafaříková, 2011

Mikro-organismus	Analyzovaný vzorek	Magnetické částice	Další detaily	Výsledek IMS	Reference
<i>Escherichia coli</i> O157	kuřecí maso z obchodní sítě v Turecku	Dynabeads anti <i>E. coli</i> O157	IMS a vyočkování na selektivní agar	2 vzorky ze 190 byly kontaminovány	(Akkaya et al., 2006)
<i>Escherichia coli</i> O157	živé nosnice (Itálie)	Dynabeads anti <i>E. coli</i> O157	kombinace IMS a PCR	26 nosnic ze 720 bylo infikováno	(Dipineto et al., 2006)
<i>Listeria monocytogenes</i>	drůbeží produkty pro přímou spotřebu (Alabarna, USA)	Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	kombinace IMS a RT-PCR	4 drůbeží produkty ze 135 byly kontaminovány	(Abdelgadir et al., 2009)
<i>Listeria</i>	drůbeží maso	Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	IMS a vyočkování na PALCAM agar	25 vzorků z 51 bylo kontaminováno	(Karpíšková & Holasová, 1999)
<i>Salmonella</i>	kuřecí maso (Nizozemsko)	Dynabeads anti- <i>Salmonella</i>	IMS a vyočkování na XLD a BGA agary	5 vzorků z 10 bylo kontaminováno	(Cudjoe et al., 1994)
<i>Salmonella</i>	vejce	Dynabeads anti- <i>Salmonella</i>	IMS a vyočkování	11 vzorků z 55 bylo kontaminováno	(Karpíšková & Holasová, 1999)

Studie Hochel z roku 2009 se zabývá detekcí termofilních kampylobakterií, které jsou založeny na interakci antigenu se specifickou protilátkou. Aglutinační reakce se stala základem několika komerčně dostupných testů. Všechny využívají latexových částic s imobilizovanými imunoglobuliny, které byly připraveny proti: 1) antigenům různých druhů rodu *Campylobacter* tj. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* (Campyslide); 2) flagelárnímu antigenu *C. jejuni* (Meritec-Campy); 3) různým sérotypům *C. jejuni* (Microscreen, Mercia Diagnostics). Hodinka a Gilligan prokázali, že Campyslide pozitivně reagoval se 110 izoláty kampylobakterií, avšak vykazoval rovněž křížové interakce s některými kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Nachamkin a Barbagallo testovali systém Meritec-Campy, který reagoval se všemi 77 kmeny *C. jejuni*, 17 kmeny *C. coli* a 2 kmeny *C. upsalensis*, avšak selhal při detekci 6 kmenů *C. lari* a 3 kmenů *C. fetus subsp. fetus*. Další autoři testovali komerční test „Microscreen“ a zjistili, že systém reaguje s kmeny druhu *C. jejuni* a *C. coli*, avšak také poskytuje slabou odezvu s ostatními druhy rodu *Campylobacter* a *Helicobacter*, pokud je koncentrace buněk ve vzorku vyšší než 10^5 cfu ml⁻¹. Komerčně dostupné aglutinační testy byly použity pro detekci kampylobakterií v kuřecím mase. Falešně negativní výsledky byly

pozorovány u vzorků s vysokou koncentrací doprovodné mikroflóry v nabohacovacím médiu (Hochel, 2009).

Magneticky zachycené buňky mohou být také detekovány pomocí metody ELISA. Jako příklad lze uvést, sendvičový test ELISA pro detekci *Campylobacter jejuni* v potravinách nebo klinických a environmentálních vzorcích za použití magnetických (PGMA) poly(glycidyl methakrylátových) mikrokuliček s kovalentně vázanými IgY protilátkami, který je znázorněn na obrázku č. 14. Ve srovnání s konvenčními mikrobiologickými metodami separace, které přibližně trvají 5 dní, jsou pracné a časově náročné, a to jak na počet promývacích kroků, tak na celkový čas, se detekce pomocí této metody podstatně časově sníží. Detekční limit metody byl $4,8 \cdot 10^6$ cfu ml⁻¹ (Hochel, 2009).



Obrázek 14: Sendvičový test ELISA využívající magnetické částice. Převzato a upraveno z Horák et al., 2007

Prvním krokem na obrázku č. 14 je kovalentní připojení protilátky (IgG) k magnetickým mikrokuličkám PGMA, nasycení povrchu pevné fáze s BSA; druhý krok: inkubace se vzorkem; třetí krok: přidání druhé protilátky (IgY); čtvrtý krok: přidání komplexu anti-IgY protilátka-enzym; pátý krok: přidání enzymového substrátu, odstranění mikrokuliček a absorbance měření (Horák et al., 2007).

3 PŘÍKLADY SEPARACE EUKARYOTICKÝCH BUNĚK

Magnetické částice se stále častěji používají k izolaci suspenze lidských buněk přímo z krve a jiných buněčných zdrojů. Jako příklady mohou sloužit B lymfocyty, endotelové buňky, granulocyty, hematopoetické progenitorové buňky, Langerhansovy buňky, leukocyty, monocyty, T-lymfocyty, spermie a mnoho dalších (Šafařík & Šafaříková, 1999). Je zajímavým a užitečným faktem, že zdravé červené krvinky jsou magnetické díky jejich významnému obsahu železa (Plouffe et al., 2015).

Ve studii (Cotter et al., 2001) popisujeme novou metodu založenou na negativní imunomagnetické separaci, která poskytuje vysoce čisté populace myších neutrofilů. Krev se inkubuje s protilátkami proti specifickým buněčným markerům a poté se sekundárními protilátkami potaženými magnetickými kuličkami. Po spuštění magnetického pole se značené buňky zadržují a odebírá se suspenze bohatá na neutrofile. Tato metoda poskytuje více jak 95% čistou suspenzi a 97 % životaschopných neutrofilů. Průtoková cytometrická analýza ukazuje malý rozdíl v expresi povrchu L-selektinu a CD18 na izolovaných neutrofilů ve srovnání s neutrofilem v plné krvi, což ukazuje, že neutrofile jsou minimálně aktivovány izolačním procesem. Stimulace pomocí forbol-12-myristát-13-acetátu redukovala L-selektin a zvýšila expresi CD18. Tato zjištění ukazují, že neutrofile izolované za použití této metody mohou být použity pro zánětlivé studie *in vitro* a *in vivo* (Cotter et al., 2001).

V práci Kantzer et al. z roku 2017 jsou astrocyty nejhojnější buněčný typ centrálního nervového systému a pokrývají širokou škálu funkcí. Zde je uvedeno generování nové monoklonální protilátky anti-astrocytového buněčného povrchu antigenu-2 (Anti-ACSA-2). Anti-ACSA-2 protilátka byla připojena k superparamagnetickým mikročásticím pro separaci ACSA-2 pozitivních astrocytů. Životaschopné astrocyty z myší mozkové tkáně byly získány imunomagnetickou izolací s použitím mikročástic Anti-ACSA-2. Izolované životaschopné astrocyty byly následně kultivovány. Po 3 dnech kultivace vykazovaly ACSA-2 pozitivní buňky hustou buněčnou vrstvu dvojité pozitivních astrocytů GLAST (ACSA-1⁺ a GFAP). ACSA-2 je nový povrchový marker pro astrocyty, neurální kmenové buňky a progenitorové buňky, což otevírá možnost dalšího rozpoznání vlastností astroglálních subpopulací a linií. (Kantzer et al., 2017).

Například ze studie Tanga (Plouffe et al., 2015) vyplývá že, detekce cirkulujících nádorových buněk (CTC), druh "tekuté biopsie", představuje potenciální alternativu k neinvazivní detekci, charakterizaci a sledování karcinomu. Mnoho předchozích studií

ukázalo, že počet CTC má významný vztah s fází rakoviny. Nicméně obohacení a detekce CTC zůstávají obtížné, protože jsou extrémně vzácné v krevním řečišti. V tomto případě, pomocí mikrofluidního zařízení, byl aplikován imunomagnetický separační systém pro účinné zachycení a *in situ* identifikaci cirkulujících nádorových buněk. Magnetické nanočástice (MNs) byly modifikovány pomocí protilátky proti epiteliální buňce k výrobě imunomagnetických nanočástic (IMN). IMN byly pak naneseny do mikrofluidního čipu řízeného magnetickým polem, aby vytvořily jednotné IMN vzory. Vzory IMN si zachovaly dobrou stabilitu během celého procesu včetně obohacování, mytí a identifikace. Získané mikrofluidické zařízení bylo schopno zachytit CTC z krevního oběhu s účinností vyšší než 94 %. Zachycené buňky by mohly být přímo vizualizovány obráceným fluorescenčním mikroskopem *in situ* pomocí imunocytochemie, která účinně snížila úbytek buněk. Kromě toho by CTC mohly být zcela odstraněny pouze promýváním po odstranění permanentních magnetů. Bylo zjištěno, že všechny procesy vykazovaly zanedbatelný vliv na životaschopnost buněk (životaschopnost až 93%) a že zachycené buňky by mohly být znovu kultivovány po více než 5 pasážích po uvolnění bez oddělení IMN. Zařízení bylo navíc aplikováno na klinické vzorky a téměř všechny vzorky od pacientů vykazovaly pozitivní výsledky, což naznačuje, že by mohlo sloužit jako cenný nástroj pro obohacování a detekci CTC (Tang et al., 2016). CTC mají také potenciál indikovat účinnost léčby a to i v případě, že neexistují detekovatelné metastázy a nabízet poznatky o mechanismech rezistence vůči lékům (Plouffe et al., 2015).

Antigeny imobilizované na magnetických kuličkách a koloidech mohou být použity pro izolaci buněk exprimujících protilátky nebo antigeny specifických buněk. Tento přístup byl úspěšně použit pro selekci antigen-specifických buněk z hybridomových objemových kultur, specifických antigenů B buněk z myší sleziny nebo lidské periferní krve. Tabulka č. 4 ukazuje vybrané příklady izolace lidských, živočišných a rostlinných buněk s magneticky značenými antigeny (Šafařík & Šafaříková, 1999).

Tabulka 3: Příklady izolace lidských, živočišných a rostlinných buněk s magneticky značenými antigeny. Převzato a upraveno z Šafařík & Šafaříková, 1999

Buňky	Magnetické částice	Antigen	Zdroj Buněk	Reference
Antigen specifické T-lymfocyty	Dynabeads, M-500	Antigenní peptid vázány na hlavní histokompatibilní molekuly	lymfatické uzliny	(Luxembourg et al., 1998)
Hybridomy sekretující lidské chorionické gonadotropinové protilátky	Dynabeads, M-450	Lidský chorionický gonadotropin	Imunizované splenocyty fúzované k buňkám myelomu	(Horton et al., 1989)
Fibrinový fragment D dimer hybridomů vylučujících protilátky	Dynabeads, IgG potažené MAb proti antigenu	Fibrinový fragment, D dimer	Slezinné myší buňky fúzované s buňkami myšího myelomu X-63	(Bennick et al., 1993)
Buňky lymfatických uzlin	Erytrocyty	Aminokyselinový polymer	lymfatické uzliny	(Owen et al., 1982)
B-buňky specifické pro tetanový toxin	Dynabeads, M-450	C fragment rekombinantního tetanového toxinu	Periferní krev	(Oshiba et al., 1994)

Tabulka 4: Ostatní typy lidských buněk. Převzato a upraveno z Dynal, 1996

Typy buněk	Zdroj buňky / orgánu / tkáň	Izolační metoda	Cílové antigeny	Výtěžnost účinnosti; čistota	Reference
Endometriální žlázné buňky	biopsie	negativní	Thy-1	n.d.; 82%	(Fernández-Shaw et al., 1992)
Enterocyty	biopsie sliznice	negativní	CD45	2-20 x 10 ⁵ ; > 98%	(Lundqvist et al., 1992)
Epitelové buňky, játra	žlučovod	pozitivní	34 kD gp epiteliální ag	10 ⁵ buněk/g; 98%	(Joplin et al., 1989)
Fibroblasty	endometriální biopsie	vyčerpání	Thy-1	Thy-1 buňky snižené z 50 na 18%	(Fernández-Shaw et al., 1992)
Epitelové lymfocyty	biopsie sliznice	negativní	epiteliální antigen	1-20 x 10 ⁵ na cm ² ; > 95%	(Lundqvist et al., 1992)
Buňky vázající ICAM-1	PBMC	pozitivní	LFA-1	n.d.; n.d.	(Hedman et al., 1992)
Velký granulární lymfocyt	PBMC	negativní	CD14, CD3	n.d.; 80-90%	(Malygin et al., 1993)
Maligní buňky	krevní nádory kostní dřeně	pozitivní, vyčerpání	Variety	několik log. vyprázdnění	(Canals et al., 1992, GLADWIN et al., 1990)
Stomie buňky	plicní tkáň	pozitivní	2. doména c-kit proto-onkogenního produktu	41.9%; 85%	(Okayama et al., 1994)
Megakaryocyty	filtrované BM buňky	pozitivní	GPIIb / IIIa	76%; >98%	(Gladwin et al., 1990)
	hustota sep. BM buněk	pozitivní	GPIIb / IIIa	n.d.; >99%	(Louache et al., 1991)
Osteoklasty	buněčná linie	pozitivní	membrána ag	n.d.; n.d.	(James et al., 1991)
Trombocyty	PBMC	pozitivní	GPIIb / IIIa	n.d.; n.d.	(Aakhus et al., 1990)
	plazma	negativní	CD45	90% lymfocyt	(Häcker-Sahin & Giannitsis, 1991)
Virově infikované buňky	Buňky MOLT4 /HTL VIII B	vyčerpání	HIV-1 ag	77%; n.d.	(Ushijima et al., 1990)

4 ZÁVĚR

Magnetická separace buněk je jednoduchý, rychlý a specifický postup, který umožňuje, aby byly cílové buňky izolovány přímo ze surových vzorků obsahujících velké množství buněk nebo buněčných fragmentů. Separací proces může být poměrně snadno zvětšen a tím lze izolovat velké množství buněk. Existuje také mnoho možností kombinace procesu magnetické separace buněk s jinými technikami, jako je PCR.

V této práci je popsán princip magnetické separace, stavba a funkcionalizace magnetických částic. V poslední části jsou uvedeny příklady využití imunomagnetické separace u prokaryotických a eukaryotických buněk.

Imunomagnetická separace je jednoduchá, specifická a účinná metoda, která se uplatnila k detekci patogenních mikroorganismů v potravinářské, klinické, veterinární a environmentální mikrobiologii. Mezi její výhody patří univerzálnost, možnost pracovat bez předběžného zpracování účinného materiálu a opětovná využitelnost sorbentů.

Imunomagnetická separace se dostává do popředí zájmu vědeckých pracovníků ve snaze dosáhnout optimalizace a zavedení do rutinní praxe, kde může znamenat další posun a vylepšení stávajících standardů.

POUŽITÁ LITERATURA

AAKHUS A. M., STAVEM P., HOVIN T., PEDERSEN T. M., SOLUM N. O. Studies on a patient with thrombocytopenia, giant platelets and a platelet membrane glycoprotein Ib with reduced amount of sialic acid. *British Journal of Haematology*. 1990, 74(3), s. 320-329.

ABDELGADIR A. M. M. A., SRIVASTAVA K. K., REDDY P. G. Detection of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 2009, 4(4), s. 101-107.

AKKAYA L., ATABAY H. I., KENAR B., ALISARLI M. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2006, 50, s. 513-516.

ALONI-GRINSTEIN R., SCHUSTER O., YITZHAKI S., AFTALION M., MAOZ S., STEINBERGER-LEVY I., BER R. Isolation of *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* from Blood Cultures by Plasma Purification and Immunomagnetic Separation Accelerates Antibiotic Susceptibility Determination. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8(312), s. 1-11.

BENNICK A., BROSSTAD F. A Rapid Method for Selecting Specific Hybridoma Clones using Paramagnetic Dynabeads®. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1993, 38(3), s. 212-214.

CANALS C., PUNTI C. PICÓN M., AMILL B., TUGUES D., SANCHEZ T., BADELL I., PARDO N., ORTEGA J., VIVANCOS P., GARCIA J. Immunomagnetic purifying in autologous bone marrow transplantation: Experience in fourteen patients. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1992, 377, s. 289-296.

COTTER M. J., NORMAN K. E., HELLEWELL P. G., RIDGER V. G. A Novel Method for Isolation of Neutrophils from Murine Blood Using Negative Immunomagnetic Separation. *The American Journal of Pathology*. 2001, 159(2), s. 473-481.

CUDJOE K. S., KRONA R., OLSEN E. IMS: a new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1994, 23(2), s. 159-165.

DIPINETO L., SANTANIELLO A., FONTANELLA M., LAGOS K., FIORETTI A., MENNA L. F. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, 43(2006), s. 293-295.

DYNAL Technical Handbook Second edition. *Cell Separation and Proteion Purification*. Oslo: Dynal A.S, 1996.

FANG W., CHEN X., ZHENG N. Superparamagnetic core-shell polymer particles for efficient purification of his-tagged proteins. *Journal of Materials Chemistry*. 2010, 20, s. 8624–8630.

FERNÁNDEZ-SHAW S., SHORTER S.C., NAISH C.E., BARLOW D.H., STARKEY P.M. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Human Reproduction*. 1992, 7(2), s. 156-161.

GATTO-MENKING D. L., YU H., BRUNO J. G., GOODE M. T., MILLER M., ZULICH A. W. Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrocheminescence sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 1995, 10(6-7), s. 501-507.

GLADWIN A. M., CARRIER M. J., BEESLEY J. E., LELCHUK R., HANCOCK V., MARTIN J. F. Identification of mRNA for PDGF B-chain in human megakaryocytes isolated using a novel immunomagnetic separation method. *British Journal of Haematology*. 1990, 76, s. 333-339.

GLADWIN A. M., CARRIER M. J., BEESLEY J. E., LELCHUK R., HANCOCK V., MARTIN J.F. Identification of mRNA for PDGF B-chain in human megakaryocytes isolated using a novel immunomagnetic separation method. *British Journal of Haematology*. 1990, 76, s. 333-339.

HÄCKER-SAHIN B., GIANNITSIS A. Neues Verfahren zur Lymphozytendepletion von Thrombozytenkonzentraten durch immunmagnetische Beads. *Beitr Infusionsther*. 1991, 28, s. 220-222.

HÄFELI U., SCHÜTT W., TELLER J., ZBOROWSKI M. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 1997, ISBN 978-1-4757-6482-6.

HE J., HUANG M., WANG D., ZHANG Z., LI G. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, 101, s. 84-101.

HEDMAN H., BRÄNDEN H., LUNDGREN E. Physical separation of ICAM-1 binding cells. *Journal of Immunological Methods*. 1992, 146, s. 203-211.

HOCHÉL, I. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. *Chemické Listy*. 2009, 103, s. 814-822.

HOLÁ K., MARKOVÁ Z., ZOPPELLARO G., TUČEK J., ZBOŘIL R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. *Biotechnology Advances: 2. část*. 2015, 33(6), s. 1162-1176.

HORÁK D., BABIČ M., MACKOVÁ H., BENEŠ M. J. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, 30, s. 1751-1772.

HORTON, J. K., EVANS, O.M., SWANN K., SWINBURNE S. A new and rapid method for the selection and cloning of antigen-specific hybridomas with magnetic microspheres. *Journal of Immunological Methods*. 1989, 124(2), s. 225-230.

CHEN Q., LIN J., GAN C., WANG Y., WANG D., XIONG Y., LAI W., LI Y., WANG M. A sensitive impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for rapid detection of *Listeria monocytogenes* using an immobilization-free interdigitated array microelectrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 74(15), s. 504-511.

IRANMANESH M., HULLIGER J. Magnetic separation: its application in mining, waste purification, medicine, biochemistry and chemistry. *Chemical Society Reviews*. 2017, s. 10.

ISLAM D., LINDBERG A. A. Detection of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri* in feces by immunomagnetic isolation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, 30(11), s. 2801-2806.

JAMES I. E., WALSH S., DODDS R. A., GOWEN M. Production and characterization of osteoclast-selective monoclonal antibodies that distinguish between multi-nucleated cells derived from different human tissues. *The Journal of Histochemistry and cytochemistry*. 1991, 39(7), s. 905-914.

JOPLIN R., STRAIN A.J., NEUBERGER J.M. Immuno-isolation and culture of biliary epithelial cells from normal human liver. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 1989, 25, s. 1189-1192.

KANTZER C. G., BOUTIN C., HERZIG I. D., WITTEWER C., REISS S., TIVERON M. C., DREWES J., ROCKEL T. D., OHLIG S., NINKOVIC J., CREMER H., PENNARTZ S.,

- JUNGBLUT M., BOSIO A. Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia*. 2017, 65(6), s. 990-1004.
- KARCH H., JANETZKI-MITTMANN C., ALEKSIC S., DATZ M. Isolation of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 Strains from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome by Using Immunomagnetic Separation, DNA-Based Methods, and Direct Culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996, 34(3), s. 516-519.
- KARPÍŠKOVÁ R., HOLASOVÁ M. The use of immunomagnetic separation in detection of Salmonella and Listeria from foodstuffs. *Veterinární Medicína*. 1999, 44(8), s. 225-228.
- KIM H., HAGE D. Handbook of affinity chromatography: *Immobilization methods for affinity chromatography*. 2006, s. 35-78.
- LOUACHE F., DEBILI N., CRAMER E., BRETON-GORIUS J., VAINCHENKER W. Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood*. 1991, 77(2), s. 311-316.
- LUNDQVIST C., HAMMARSTRÖM M-L., ATHLIN L., HAMMARSTRÖM S. Isolation of functionally active intraepithelial lymphocytes and enterocytes from human small and large intestine. *Journal of Immunological Methods*. 1992, 152, s. 253-263.
- LUXEMBOURG A. T., BORROW P., TEYTON L., BRUNMARK A. B., PETERSON P. A., JACKSON M. R. Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+T cells usable in immunotherapy. *Nature Biotechnology*. 1998, 16, s. 281-285.
- MA K., DENG Y., BAI Y., XU D., CHEN E., WU H., LI B., GAO L. Rapid and simultaneous detection of Salmonella, Shigella, and Staphylococcus aureus in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*. 2014, 42, s. 87-93.
- MAGDELDIN S., *Affinity chromatography*. 1. vydání. Rijeka: InTech, 2012. ISBN 978-953-5103-257.
- MALYGIN A. M., MERI S., TIMONEN T. Regulation of natural killer cell activity by transforming growth factor- and prostaglandin E₂. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1993, 37, s. 71-76.
- MANSFIELD L. P., FORSYTHE S. J. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for Salmonella detection. *Letters in Applied Microbiology*. 1993, 16, s. 122-125.

- OKAYAMA Y., HUNT T. C., KASSEL O., ASHMAN L. K., CHURCH M. K. Assessment of the anti-C-kit monoclonal antibody YB5.B8 in affinity magnetic enrichment of human lung mast cells. *Journal of Immunological Methods*. 1994, 169, s. 153-161.
- OSHIBA A., RENZ H., YATA J., GELFAND E. W. Isolation and Characterization of Human Antigen-Specific B Lymphocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994, 72(3), s. 342-349.
- OWEN C. S., BABU U. M., COHEN S. W., MAURER P. H. Magnetic enrichment of antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods*. 1982, 51(2), s. 171-181.
- OZALP V. C., BAYRAMOGLU G., ARICA M. Y., OKTEM H. A. Design of a core-shell type immuno-magnetic separation system and multiplex PCR for rapid detection of pathogens from food samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(21), s. 9541–9551.
- PEČOVÁ M., ZAJONCOVÁ L., POLÁKOVÁ K., ČUDA J., ŠAFAŘÍKOVÁ M., ŠEBELA M., ŠAFAŘÍK I. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, 105, s. 524-530.
- PEREIRO I., BENDALI A., TABNAOUI S., ALEXANDRE L., SRBOVÁ J., BÍLKOVÁ Z., DEEGAN S., JOSHI L., VIOVY J.-L., MALAQUIN L., DUPUY B., DESCROIX S. A new microfluidic approach for the one-step capture, amplification and label-free quantification of bacteria from raw samples. *Chemical Science*. 2017, 8(2), s. 1329–1336.
- PHURIMSAK CH., TARN M., PAMME N. Magnetic Particle Plug-Based Assays for Biomarker Analysis. *Micromachines*. 2016, 7(5), s. 77.
- PLOUFFE B. D., MURTHY S. K., LEWIS L. H. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Reports on Progress in Physics*. 2015, 78(1), s. 38.
- RASMUSSEN H. N., RASMUSSEN O. F., CHRISTENSEN H., OLSEN J. E. Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995, 78(5), s. 563-568.
- ROSSI L. M., COSTA N. J. S., SILVA F. P., WOJCIESZAK R. Magnetic nanomaterials in catalysis: advanced catalysts for magnetic separation and beyond. *Green Chemistry*. 2014, 16, s. 2906-2933.

- SANNA G., LECCA V., FODDAI A., TOLA S. Development of a specific immunomagnetic capture-PCR for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples. *Journal of Applied Microbiology*. 2014, 117(6), s. 1585–1591.
- SARASWAT M., MUSANTE L., RAVIDÁ A., SHORTT B., BYRNE B., HOLTHOFER H. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. *BioMed Research International*. 2013, s. 18.
- SKJERVE E., RØRVIK L. M., OLSVIK Ø. Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods by Immunomagnetic Separation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(11), s. 3478-3481.
- SOBCZAK M., DARGATZ J., HRZANOWSKA-WODNICKA M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *Journal of visualized experiments*. 2010, 14(46), s. 2316.
- ŠAFAŘÍK I., POSPÍŠKOVÁ K., BALDÍKOVÁ E., ŠAFAŘÍKOVÁ M. Magnetically responsive biological materials and their applications. *Advanced Materials Letters*. 2016, 7(4), s. 254-261.
- ŠAFAŘÍK I., ŠAFAŘÍKOVÁ M. Imunomagnetické techniky pro detekci mikroorganismů v drůbežích produktech. *Veterinářství*. 2011, 61(4), s. 199-202.
- ŠAFAŘÍK I., ŠAFAŘÍKOVÁ M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999, 722, s. 33-53.
- ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology*. 2004, 2(7), s. 17.
- ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: Overview of magnetic separations used in biochemical and biotechnological applications. 1997, s. 324-340. ISBN 978-1-4419-3283-9.
- ŠAFAŘÍKOVÁ M., ŠAFAŘÍK I. Magnetické separace v přírodních vědách a biotechnologiích. *Chemické Listy*. 1995, 89, s. 280-287.
- TANG M., WEN C. Y., WU L. L., HONG S. L., HU J., XU C. M., PANG D. W., ZHANG Z. L. A chip assisted immunomagnetic separation system for the efficient capture and *in situ* identification of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*. 2016, 16, s. 1214-1223.

- TOMLINSON M. J., TOMLINSON S., YANG X. B., KIRKHAM J. Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of Tissue Engineering*. 2012, 4(2013), s. 14.
- USHIJIMA H., HONMA H., TSUCHIE H., KITAMURA T., TAKAHASHI I. Removal of HIV antigens and HIV-infected cell *in vitro* using immunomagnetic beads. *Journal of Virological Methods*. 1990, 29, s. 23-32.
- WALLER D. F., HEW B. E., HOLDAWAY C., JEN M., PECKHAM G. D. Rapid Detection of Bacillus anthracis Spores Using Immunomagnetic Separation and Amperometry. *Biosensors*. 2016, 6(4), s. 61.
- WOLFHAGEN M. J., FLUIT A. C., TORENSMA R., POPPELIER M. J., VERHOEF J. Rapid detection of toxigenic Clostridium difficile in fecal samples by magnetic immuno PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, 32(7), s. 1629-1633.
- YANG Z. Y., SHIM W. B., KIM K. Y., CHUNG D. H. Rapid detection of enterotoxigenic Clostridium perfringens in meat samples using immunomagnetic separation polymerase chain reaction (IMS-PCR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58(12), s. 7135-7140.
- YU H., AHMED H., VASTA G. R. Development of a Magnetic Microplate Chemifluorimmunoassay for Rapid Detection of Bacteria and Toxin in Blood. *Analytical Biochemistry*. 1998, 206, s. 1-7.
- SU X. L., LI Y. Quantum dot biolabeling coupled with immunomagnetic separation for detection of Escherichia coli O157:H7. *Analytical Chemistry*. 2004, 74(16), s. 4806–4810.
- OH S., JUNG S. H., SEO H., MIN M-K., HAHN Y. K., KANG H., CHOI S. Magnetic activated cell sorting (MACS) pipette tip for immunomagnetic bacteria separation. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, 272, s. 324-330.
- ZAPLETALOVÁ H., PÍŽOVÁ K., MALOHLAVA J., VŮJTEK M., KOLÁŘOVÁ H. Analýza povrchu magnetických mikročástic prostřednictvím mikroskopie atomárních sil. *Lékař a technika*. 2014, 44(2), s. 34-41.

WEBOVÉ ZDROJE

Miltenyi Biotec GmbH. Fully automated cell separation for walk-away convenience. MACS Miltenyi Biotec [online]. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec GmbH, ©2018. [cit. 2017-10-26]. Dostupné z: <https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/products/macs-cell-separation/instruments/automacs-pro-separator.html>.

Miltenyi Biotec GmbH. Versatile magnetic separators for cell isolation. MACS Miltenyi Biotec [online]. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec GmbH, ©2018. [cit. 2018-06-30]. Dostupné z: <https://www.miltenyibiotec.com/IS-en/products/macs-cell-separation/separator/macs-manual-separators-overview.html>.

RayBiotech Inc. Microtiter Plate Magnetic Separator. RayBiotech: Empowering Your Proteomics [online]. RayBiotech Inc., ©2007-2018. [cit. 2018-07-03]. Dostupné z: <https://www.raybiotech.com/microtiter-plate-magnetic-separator/>

Thermo Fisher Scientific Inc. Dynabeads Cell Isolation and Expansion Support-Getting Started. Thermo Fisher Scientific [online]. Thermo Fisher Scientific Inc., ©2016. [cit. 2017-10-26]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/technical-reference-library/cell-culture-support-center/dynabeads-cell-isolation-expansion-support/dynabeads-cell-isolation-expansion-support-getting-started.html>.

Thermo Fisher Scientific Inc. Magnets for Molecular and Cell Separation Applications. Thermo Fisher Scientific [online]. Thermo Fisher Scientific Inc., ©2016. [cit. 2017-10-26]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/product-brand/dynal/magnets.html>.