

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Annemarie Svozilová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Biosenzory pro detekci patogenních mikroorganismů v potravinách

Annemarie Svozilová

Bakalářská práce

2019

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Annemarie Svozilová**
Osobní číslo: **C18570**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Biosenzory pro detekci patogenních mikroorganismů
v potravinách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Nastudovat literární údaje týkající se detekce patogenních mikroorganismů v potravinách. Rešerši zaměřit nejprve na výčet nejčastějších patogenních mikroorganismů v potravinách a přehled rutině využívaných metod pro jejich průkaz jako jsou klasické kultivační metody, polymerázová řetězová reakce a imunochemické metody. Ve druhé části pak velký důraz klást na detekci výše zmíněných patogenů s využitím elektrochemických biosenzorů, jako slibného nástroje pro zlepšení a urychlení detekce.
 2. Vše přehledně zpracovat, doplnit obrázky a schémata. Z nastudovaných informací vyvodit závěry týkající se porovnání biosenzorů a rutině využívaných metod pro detekci patogenních mikroorganismů z pohledu citlivosti, specifity a využitelnosti v praxi.
-

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 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. 2019

Annemarie Svozilová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce paní RNDr. Lucii Korecké za její trpělivost, vstřícné jednání a odborné vedení bakalářské práce.

ANOTACE

Hlavní náplní této práce je shrnutí dostupných informací o možnostech detekce vybraných bakterií pomocí biosenzorů, které se jeví jako slibný nástroj pro včasnou detekci nežádoucích mikrobů. V první části jsou stručně zmíněni nejčastější původci kontaminace potravin. Hlavní část je pak zaměřena na popis základních vlastností a součástí biosenzorů, a dále jsou zmíněny konkrétní příklady biosenzorů, které byly zkonstruovány pro detekci bakterií.

KLÍČOVÁ SLOVA

imunosenzory, biosenzory, patogeny potravin

TITLE

Biosensors for detection of foodborne pathogen

ANNOTATION

The main task of this thesis is to summarize available informations about detection of selected bacterias by biosensors which are promising tool for early detection of undesirable microbes. In the first part there are briefly mentioned most common food contamination agents. The main part is focused on the description of basic properties and components of biosensors. And further there are concrete examples of biosensors which have been constructed for the detection of bacterias.

KEYWORDS

immunoassays, biosensors, foodborne pathogen

OBSAH

Úvod.....	12
1 Mikrobiologie potravin	13
1.1 Základní charakteristika bakterií	13
1.2 Mikroorganismy vyskytující se nejčastěji v potravinách	14
1.3 Charakteristika vybraných mikroorganismů	16
1.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
1.3.2 <i>Salmonella</i> spp.	16
1.3.3 <i>Escherichia coli</i>	17
1.3.4 <i>Campylobacter</i> spp.....	19
2 Metody a techniky stanovení patogenů v potravinách.....	20
2.1 Metody kultivace a počítání kolonií	20
2.2 Příklady kultivačních médií.....	20
2.3 Tradiční metody identifikace a konfirmace mikroorganismů a rychlé metody stanovení	21
2.3.1 Biochemické metody.....	21
2.4 Imunochemické metody	21
2.4.1 ELISA – Enzymová imunoanalýza na pevné fázi.....	21
2.4.2 LFIA – Imunochromatografické testy.....	22
2.5 Polymerázová řetězová reakce	23
2.5.1 Stanovení <i>Listeria monocytogenes</i> pomocí PCR	23
2.5.2 Stanovení <i>Campylobacter</i> spp. pomocí PCR.....	24
3 Biosenzory	25
3.1 Úvod do biosenzorů.....	25
3.2 Historie	26
3.3 Klasifikace biosenzorů	27
4 Bioreceptory.....	28

4.1.1	Protilátkové bioreceptory	28
4.1.2	Enzymové bioreceptory	30
4.1.3	DNA bioreceptory	30
4.1.4	Buněčné bioreceptory	31
4.1.5	Biomimetické receptory	31
4.1.6	Bakteriofágy	32
5	Převodníky	33
5.1	Optické biosenzory	33
5.1.1	Infračervená Ramanova spektroskopie	33
5.1.2	Fluorescence	34
5.1.3	Povrchová plazmonová rezonance	34
5.2	Elektrochemické biosenzory	35
5.2.1	Amperometrické biosenzory	35
5.2.2	Potenciometrické biosenzory	36
5.2.3	Konduktometrické biosenzory	37
5.3	Impedimetrické biosenzory	37
5.4	Hmotnostní biosenzory	37
5.5	Elektronický čichový senzor	38
6	Závěr	39
	Použitá literatura	40

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	- Přehled vybraných mikroorganismů	15
Tabulka 2	- Typy patotypů <i>E. coli</i>	18
Tabulka 3	- Vlastnosti a výhody biosenzorů	26
Tabulka 4	- Druhy nepoužívanějších převodníků v biosenzorech	33

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Gram negativní a gram pozitivní bakterie	13
Obrázek 2 - <i>Listeria monocytogenes</i>	16
Obrázek 3 - <i>Salmonella</i> spp.....	17
Obrázek 4 - <i>Escherichia coli</i>	17
Obrázek 5 - <i>Campylobacter jejuni</i>	19
Obrázek 6 - Sendvičová ELISA	22
Obrázek 7 - Schéma LFIA.....	23
Obrázek 8 - PCR proces	24
Obrázek 9 - Schématický diagram biosenzoru	25
Obrázek 10 - Klasifikace biosenzorů	27
Obrázek 11 - Schéma klíč a zámek - antigen a protilátka	28
Obrázek 12 - Schéma strategie imobilizace	29
Obrázek 13 - Schéma elektrochemického biosenzoru.....	35
Obrázek 14 - Schéma amperometrického senzoru	36

SEZNAM ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
PCR	Polymerázová reakce, z angl. Polymerase chain reaction
ELISA	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi, z angl. Enzyme linked immunosorbent assay
HACCP	Analýza rizik a tvorba kritických kontrolních bodů, z angl. Hazard Analysis and Critical Control Point
HUS	Hemolyticko - uremický syndrom, z angl. Haemolytic Uremic Syndrom
BHI	Mozko - srdeční infúze, z angl. Brain heart infusion
LFIA	Imunochromatografické testy, z angl. Lateral Flow ImmunoAssay
MIP	Molekulárně vtištěný polymer, z angl. Molecular imprinted polymer
PDA	Polydiacetylen
SPR	Povrchová plazmonová rezonance, z angl. Surface plasmon resonance
CFU	Jednotky tvořící kolonie, z angl. Colony Forming Units

Úvod

Práce se zabývá biosenzory pro včasnou detekci patogenů v potravinách, které by mohly být vhodnou alternativou k běžně využívaným metodám, které jsou časově náročné. Nejprve je práce zaměřena na popis vlastností a součástí biosenzorů, a následně na konkrétní příklady detekce patogenů.

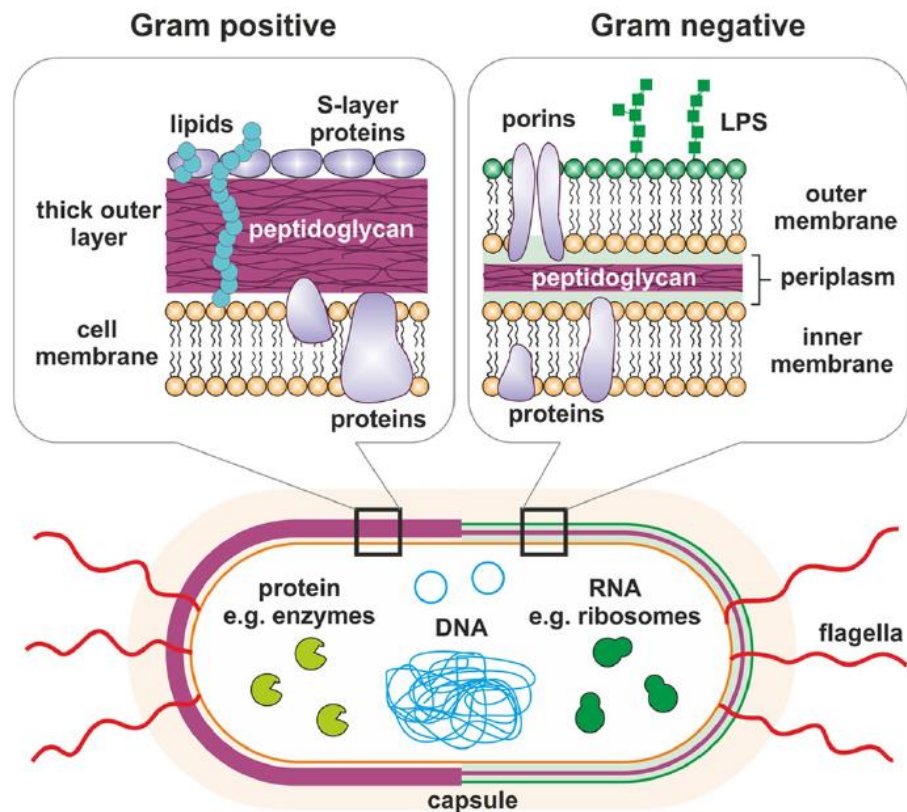
Kontrola kvality potravin a průkaz případné bakteriální kontaminace je důležitý kvůli stále rostoucímu počtu onemocnění způsobených kontaminací potravin [1]. Zatímco většina mikrobů hraje v přírodě důležitou roli, některé potenciálně škodlivé mikroby mohou kontaminovat potraviny a vodu, a způsobit tak řadu infekčních onemocnění jak u zvířat, tak u lidí [2]. Pokud se infekce včas neléčí, může dojít až k fatálním následkům. Nejhorší incident otravy z jídla, který se stal ve Spojených státech, byl z měkkých sýrů kontaminovaných *Listeria monocytogenes*. Vedla k 47 úmrtí a přibližně 6 měsíců trvala identifikace zdroje nákazy [3]. Proto se zavedl na podzim 2007 systém tzv. „*Plán o ochraně potravin*“, který zmiňuje úmyslnou kontaminaci [4].

Ke kontrole přítomnosti nežádoucích mikroorganismů v potravinách a potravinářských technologiích se používají tradiční mikrobiologické kultivační metody. S nástupem moderní koncepce kontroly potravin a potravinářských technologií, *Analýza rizik a tvorba kritických kontrolních bodů* (HACCP), vznikla potřeba nejrychlejšího průkazu, zda je či není přítomen nežádoucí mikroorganismus. HACCP systém má zajistit nulové zdravotní riziko z potravin. Klade důraz na odhalení nebezpečí z oblasti epidemiologie. Je spojen s kultivací, sklizní, technologickým procesem, distribucí, přípravou a použitím surového materiálu a potravinářských výrobků a stanovení kritických kontrolních bodů. Lze říci, že jde o jakýsi systém preventivních opatření, která slouží k zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a pokrmů během všech činností souvisejících s výrobou, zpracováním, skladováním, manipulací, přepravou a prodejem konečnému spotřebiteli. V ČR byl tento systém od 1. 1. 2000 povinně zaveden pro všechny výrobce potravin (vyhláška Ministerstva zemědělství 147/1998 Sb.) [5].

1 Mikrobiologie potravin

1.1 Základní charakteristika bakterií

Bakterie jsou prokaryotické buňky o velikosti v rozmezí 0,5 – 5 μm a mají různé morfologie např. sférické koky, tyčinkovité bacily nebo spirochety. Na rozdíl od eukaryotických buněk, většina bakterií je zapouzdřena buněčnou stěnou, která je přítomna na vnější straně cytoplazmatické membrány. Buněčná stěna obsahuje hlavně peptidoglykany, což je negativně nabitá polymerní matrice obsahující řetězce amino – cukrů, zejména N – acetylglukosaminu. Bakterie mohou být klasifikovány jako Gram pozitivní nebo Gram negativní, v závislosti na stavbě a tloušťce buněčné stěny [3].



Obrázek 1 - Gram negativní a gram pozitivní bakterie (převzato z [3])

Buněčná stěna G^+ bakterií obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanu, která také obsahuje lipidy a další proteinové složky obklopující lipidovou membránu. G^- bakterie mají mnohem tenčí peptidoglykanovou vrstvu mezi dvěma buněčnými membránami (Obrázek 1) [3].

Vnější membrána obsahuje proteiny např. poriny, které slouží k zamezení vstupu antibiotik [3,6]. Vnitřní membrány u obou typů obsahují proteiny [3].

1.2 Mikroorganismy vyskytující se nejčastěji v potravinách

V potravinách se vyskytují čtyři kategorie mikroorganismů. První jsou prospěšné mikroorganismy, které vlastní výhodné organoleptické změny např. kvasinky v alkoholu a plísně v sýrech. Druhou skupinou jsou mikroorganismy způsobující neprospěšné organoleptické změny např. kyselé mléko. Po pozření nevyžadují lékařskou pomoc. Pouze ve velkém množství nám mohou způsobit střevní potíže. Třetí skupinou jsou indikátorové organismy. Tyto organismy vytváří v potravinách takové podmínky, které pak umožní rostoucímu patogenu kontaminaci. Ten může představovat zdravotní riziko. Proto je třeba tyto střevní bakterie izolovat a následně je detegovat. Čtvrtou skupinou jsou patogeny způsobující gastrointestinální problémy. Mohou být způsobeny po požití potravy preformovaným toxinem, toxinem ze střevního traktu nebo z rostoucího patogenu [7].

Testování některých patogenů obvykle nepředstavuje riziko. Patří sem např. *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp. a *Staphylococcus aureus*. Avšak existují i takové testy bakterií, které jsou velice rizikové a nesmí se vynášet z laboratoří např. *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Clostridium botulinum* nebo *Brucella melitensis* [7].

V následující tabulce (Tabulka 1) je přehled vybraných mikroorganismů, které se nejčastěji vyskytují v potravinách.

Tabulka 1 - Přehled vybraných mikroorganismů (převzato z [8,9])

Bakterie	Čeď	Gramovo barvení	Vliv kyslíku pro jejich růst	Morfologie	Teplota růstu	Velikost	Vlastnosti	Výskyt v potravinách	Nemoci
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriaceae	G ⁺	Aerobní, fakultativně anaerobní	Kokoidní tyčinky	37°C	0,4-1,5 μm	Nejsou acidorezistentní, nevytváří spory, jsou odolné vůči nízkým teplotám a rostou i při vyšších koncentracích solí	Mléčné výrobky, saláty, maso, uzené ryby, kontaminovaná zelenina	Tzv. Listeriáza – způsobuje zánež mozkových blan, potrat, septikémie. Onemocnění postihuje lidi s oslabenou imunitou, těhotné
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	G ⁻	Fakultativně anaerobní	Tyčinka se zaoblenými konci, na povrchu má bičíky	37°C, špatně rostou při teplotě pod 10°C a nad 45,5°C	1-3 μm	Nesporulující, dává pozitivní katalázu a negativní oxidázu, fermentuje glukózu a laktózu	Při porážce nebo dojení zvířat se mohou dostat do potravin a kontaminovat je, dále se vyskytuje ve vodě	Akutní střevní infekce provázené průjmem, bolesti svalů
<i>Salmonella</i> spp.	Enterobacteriaceae	G ⁻	Fakultativně anaerobní	Tyčinka s pohyblivými bičíky, ty jsou rozmístěny po celém povrchu buňky	5°C až 47°C, ideální je 37°C	2-5 μm	Bakterie se řadí podle svých antigenů	Věpřové maso, mléko, drůbež, vejce	Salmonelóza – zoontická infekce, u lidí způsobuje průjmy
<i>Campylobacter</i> spp.	Campylobacteriaceae	G ⁻	Vyžadují atmosféru obsahující 3 - 5 % O ₂ a 10 - 15 % CO ₂	Malé spirálkovitě zahnuté tyčinky	42°C, minimální je 32°C a maximální 45°C	0,5 - 0,8 μm	Nefermentují a ni neoxidují sacharidy	Drůbeží maso - nejvíce v letních měsících při špatné manipulaci se syrovým masem	Akutní střevní infekce provázené bolestmi břicha

1.3 Charakteristika vybraných mikroorganismů

1.3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (viz. Obrázek 2) je patogenním mikroorganismem, který nejčastěji kontaminuje mlékárenské a masné výrobky. Dobře přežívá ve zrajících sýrech (typu Camembert a Brie). K další kontaminaci a pomnožení listerií může dojít v průběhu přípravy pokrmů a jejich uchovávání při pokojové teplotě. Onemocnění, které tato bakterie způsobuje, je tzv. listerióza. Postihuje převážně staré lidi, děti, těhotné ženy a osoby s oslabenou imunitou [10]. Velmi nebezpečná je neonatální infekce, kde je zdrojem nákazy matka, neboť listerie pronikají placentou a infikují plodovou vodu. Nejčastější symptomy listeriózy jsou: horečka, únava, nevolnost. 90 % pacientů je nutné hospitalizovat, z toho 30 % jich na následky umírá. Tato bakterie je známá teprve od roku 1980 a o její rychlou detekci v posledních letech stále roste zájem. Příčinou jsou epidemie, které se objevují stále častěji [11].



Obrázek 2 – *Listeria monocytogenes* z optického mikroskopu (převzato z [12])

1.3.2 *Salmonella* spp.

Je to nejčastější bakterie, která je uváděna jako příčina nemoci způsobené potravinami (Obrázek 3). Objevil jí americký vědec Daniel E. Salmon, který na počátku 20. století objevil *Salmonella choleraesuis* ve střevě vepřů. Základy sérotypizace salmonel položili mezi lety 1920 - 1940 Kaufmann a White, podle nichž bylo nazváno schéma dělení salmonel. Na základě tělového O, kapsulárního Vi a bičíkového H antigenu se salmonely dělí do dvou skupin označovanými písmeny A-Z, která zahrnují více než 2500 sérotypů salmonel.

Salmonely se běžně vyskytují ve střevě celé řady zvířat. K přenosu dochází požitím kontaminovaných potravin, především vajec a produktů z nich připravených, nedostatečně tepelně zpracovaným masem, zejména drůbežím, možný je i přenos kontaminovanými

mléčnými produkty, kontaminovanou zeleninou, ovocem a vodou. Interpersonální přenos je možný, ale vzácný, protože infekční dávka nutná k nákaze je vysoká.

Prevence spočívá především v zabránění kontaminace potravin a jejich dostatečné tepelné úpravě. Opatrnosti je třeba především při konzumaci vajec a drůbeže z domácích chovů. V komerčních chovech se totiž provádí vakcinace. V naprosté většině léčba nevyžaduje antibiotika [13].

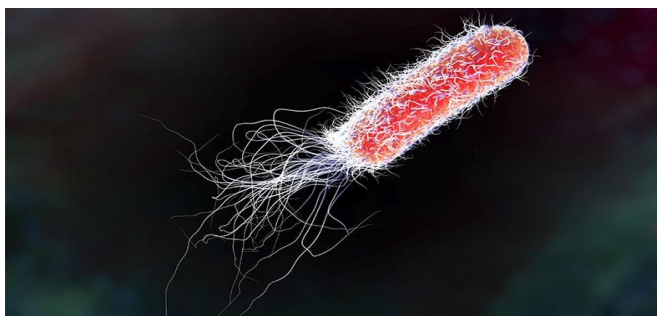


Obrázek 3 – 3D ilustrace *Salmonella* spp. (převzato z [14])

1.3.3 *Escherichia coli*

Většina kmenů *E. coli* je za běžných podmínek nepatogenní, za určitých okolností (oslabení organismu, nemoc, atd.) mohou způsobovat akutní i chronické zánětlivé procesy [15]. Patogenní kmeny *E. coli* jsou rozděleny do patotypů. Šest patotypů je spojeno s průjmem a jsou označovány jako průjmové *E. coli* (Tabulka 2). Tyto typy se nejčastěji přenáší kontaminovanou vodou, potravou nebo kontaktem se zvířaty či osobami [16].

Onemocnění způsobené *E. coli* nevyžaduje speciální léčbu. Antibiotika totiž mohou být kontraindikována. Studie potvrdily, že podporují rozvoj HUS – hemolyticko - uremický syndrom, což se projevuje tzv. akutní nedostatečností ledvin [17]. Příznaky HUS spočívají v bolesti břicha, průjmu, zástavě močení a sníženém obsahu krevních destiček, což způsobuje krvácení [16].



Obrázek 4 – 3D ilustrace *Escherichia coli* (převzato z [18])

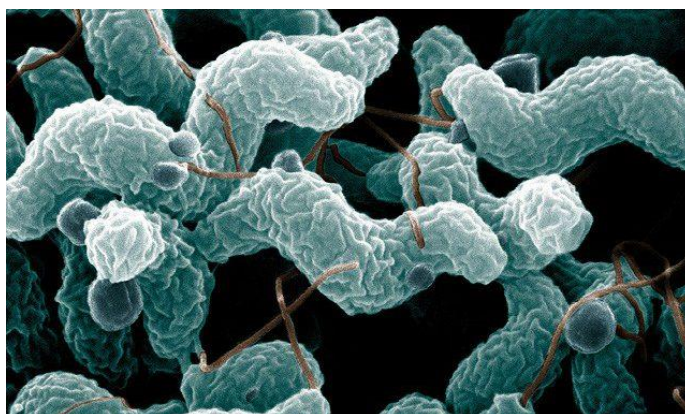
Tabulka 2 – Patotypy *E. coli* (převzato z [19])

Patotypy	Predominantní sérotypy	Interakce hostitele	Virulence	Nemoci
Shiga toxigenní/Enterohemoragické <i>E. coli</i> (STEC/EHEC)	O157, O26, O103, O111, O113 a další	Navázání na střevní buňky	Stx1, Stx2, Stx2c a Stx2d	Hemoragické kolitidy (krvavé průjmy), HUS, horečka, nevolnost
Enteropatogenní (EPEC)	O18ab, O18ac, O26, O44, O55, O86, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142	Navázání na střevní buňky	Žádné toxiny, 4 typy tvoří svazky kmenu EPEC	Průjem, který může způsobit dehydrataci a může být až fatální
Enterotoxigenní (ETEC)	O6, O15, O25, O27, O63, O78, O115, O148, O153, O129	Navázání na střevní buňky, vyvolání vylučování chloridů do střevních buněk	Tepelně labilní enterotoxin, tepelně stabilní enterotoxin, fimbria	Cestovní horečka: vodnatý průjem, nízká teplota, nevolnost, tzv. cholera
Enteroinvazivní (EIEC)	O28ac, O29, O112ac, O121, O124, O135, O144, O152, O167, O173	Napadá buňky a dále se šíří	Invazivní a adhezivní proteiny	Úplavice, zimnice, bolest hlavy a svalů
Enteroagregativní (EAEC)	O3, O44, O51, O77, O86, O99, O111, O126	Váže se v agregačních shlucích v tenkém střevě, kde produkuje toxiny	Malá fimbriální adheziva, toxiny transkripce	Trvalý průjem u dětí
Difúzně adherentní (DAEC)	O1, O2, O121, O75	Identifikovány fimbriální a nefimbriální adheziva	AIDA adhezivu, rodinné afimbrální adhezivum	Močové infekce, dětský průjem, septikémie

1.3.4 *Campylobacter* spp.

Bakterie rodu *Campylobacter* mohou u člověka způsobit onemocnění gastrointestinálního traktu zvané kamylobakteri6za. Kamylobakteri6za je akutn6 prŮjmov6 gastroenteritida doprov6zen6 bolestmi bŮrcha a horečkou [20]. Ačkoliv kamylobakteri6za nen6 život ohrožuj6c6 onemocn6n6, z6važn6j66 jsou komplikace, popŮr6pad6 postinfekcn6 n6sledky jako je masivn6 stŮevn6 krv6c6n6, hepatitida, pankreatida, uremick6 syndrom, Guillain – Barr6ho postinfekcn6 syndrom (GBS) [21]. GBS je akutn6 neurologick6 onemocn6n6 vyznačuj6c6 se vzestupnou paraliz6ou zpŮsobenou demyelinizac6 (ztr6ta myelinu z nervov6ch vl6ken axonŮ) perifern6ch nervŮ [9].

PŮvodcem aliment6rn6ho onemocn6n6 jsou termotolerantn6 kamylobaktery a mezi hlavn6 patogeny řad6me *Campylobacter jejuni* (Obr6zek 5) a *Campylobacter coli*. Po požit6 kontaminovan6 potravu pronikaj6 bakterie do tenk6ho stŮeva, kde se množí. Nejčast6j66m zdrojem infekce je konzumace nedostatečně tepeln6 upraven6ho kuŮec6ho masa [20].



Obr6zek 5 - *Campylobacter jejuni*, sn6mek z elektronkov6ho mikroskopu (pŮevzato z [22])

2 Metody a techniky stanovení patogenů v potravinách

Konvenční metody detekce patogenů spočívají především ve specifické mikrobiologické a biochemické identifikaci. Nejvyužívanější metody jsou: kultivační metoda počítáním kolonií, imunologické metody založené na interakci antigenu a protilátky nebo polymerázová řetězová reakce (PCR), která využívá detekci specifické bakteriální DNA. I když jsou tyto metody citlivé a dávají kvalitativní i kvantitativní informace o organismech, jsou značně omezeny dlouhým testovacím časem, přípravou vzorku, konkrétními činidly, zařízením a relativně vysokou cenou [23, 9].

2.1 Metody kultivace a počítání kolonií

Konvenční metody kultivace a počítání kolonií zůstávají nejspolehlivějšími a přesnými metodami detekce patogenních původců. Jejich nevýhodou je však doba celého procesu. K dosažení požadovaného výsledku je třeba i 7 dní [23].

Provede se homogenizace vzorku, abychom dosáhli takové koncentrace mikroorganismů v inokulu (přenesené buňky) tak, aby se počet kolonií narostlých po kultivaci dobře počítal (nebylo jich hodně). Požadovaný stupeň ředění se provádí dle normy nebo se určuje předpokládaný počet mikroorganismů. Poté se mikroorganismy přenesou do živného média a očkujeme 2 způsoby – roztěrem nebo přelivem [24]. Inkubuje se v podmínkách ideálních pro danou bakterii (viz Tabulka 1, str. 15), kdy optimální doba bývá 24 – 48 hodin, a poté se narostlé kolonie spočítají a provede se optická metoda pomocí mikroskopu, kde se pozoruje morfologie mikroorganismu, abychom mohli potvrdit, že se jedná o danou bakterii, kterou zkoumáme [23, 25].

2.2 Příklady kultivačních médií

Pro růst mikroorganismů se v laboratoři používají různá kultivační média. Půdy se dělí do skupin podle několika parametrů.

Podle konzistence mohou být média tekutá nebo pevná. Tekutá zahrnují různé druhy bujonů, cukrové vody založené na peptonové vodě, selektivně - pomnožovací média určená k zachytu vybraného druhu mikrobů a další. Pevné půdy se připravují ztužením bujonového základu přidáním 1-2 % agarů. Ten není využíván mikroorganismy jako zdroj živin, proto je vhodný pro ztužování tekutých médií.

Podle použití se rozlišují půdy základní, diagnostické, selektivní, půdy k anaerobní kultivaci, půdy ke stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám, půdy transportní a k uchování kultur [9].

2.3 Tradiční metody identifikace a konfirmace mikroorganismů a rychlé metody stanovení

Po izolaci jednotlivých kolonií jsou mikroorganismy dále identifikovány. Tyto metody využívají principy biochemie, imunochemie či molekulární biologie [9].

2.3.1 Biochemické metody

Tyto metody jsou široce využívané v mikrobiologických metodách. Princip je založený na konkrétním enzymu, který mikroorganismus produkuje či neprodukuje. V diferenciacních, diagnostických a selektivně-diagnostických kultivačních médiích jsou biochemické vlastnosti používány jako složka diferenciacní nebo diagnostická, zatímco fyziologické vlastnosti např. stavba buněčné stěny jako složka selektivní. Prvotním úkonem při biochemické identifikaci mikroorganismů je zařazení do některé typické skupiny. Mezi základní vlastnosti patří Gramovo barvení a tvar buněk. Z biochemických znaků je u G^+ koků sledována přítomnost katalázy a u G^- tyčinek přítomnost oxidázy a schopnost anaerobně fermentovat glukózu. Dalším sledovaným znakem může být typ hemolýzy [9].

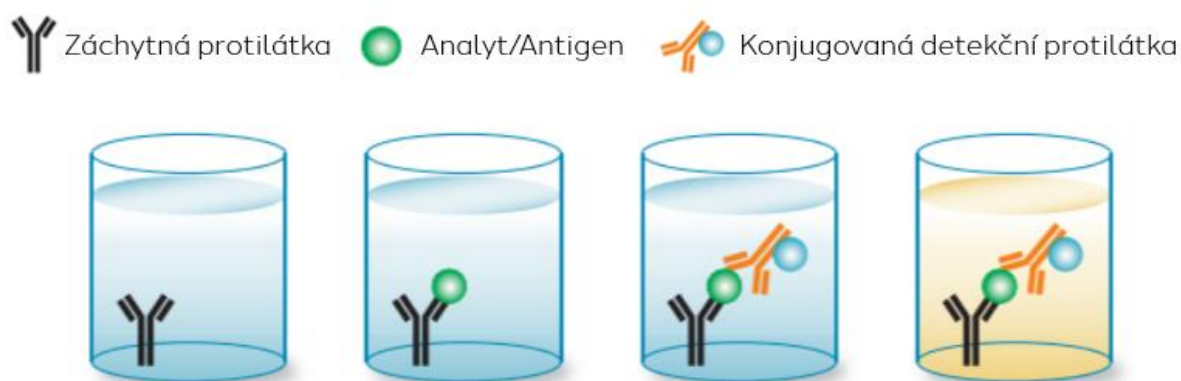
2.4 Imunochemické metody

Imunochemické metody využívají k detekci interakce mezi protilátkou a antigenem. Protilátky jsou bílkoviny krevního séra i jiných tělních tekutin vykazující specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož podnět se v organismu vytvořily. K výhodám těchto metod patří rychlost, jednoduchost provedení a možnost zpracování velkého množství vzorků najednou, detekce mikroorganismů v poměrně komplexní matici a nenáročnost. K úskalím patří nutnost přípravy specifických protilátek s vysokou afinitou k danému analytu, jejichž kvalita přímo ovlivňuje detekci. Jako imunizační činidla (agens) sloužící pro přípravu specifických protilátek jsou nejčastěji využívány bakteriální virulentní proteiny [9].

2.4.1 ELISA – Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

Nejčastěji využívanou imunochemickou metodou pro detekci bakterií je enzymová imunoanalýza na pevné fázi, neboli ELISA. Při této metodě je jeden z imunoreaktantů imobilizován na pevný nosič, kterým může být membrána, skleněná podložka, stěna zkumavky nebo dno mikrotitrační destičky. Detekce druhého imunoreaktantu je zprostředkována enzymovou reakcí. Tento imunoreaktant je látkou (tzv. substrátem), která vstupuje do reakce a váže se na povrch enzymu [26]. Nejčastěji je pro detekci bakterií využíván přímý nekompetitivní tzv. sendvičový formát (Obrázek 6). Prvním krokem je imobilizace protilátky na pevnou bázi. Poté je přidán vzorek obsahující buňky mikroorganismů, které interagují s navázanou protilátkou. Po odstranění nenavázaných složek následuje aplikace druhé

protilátka, která je značená enzymem (nejčastěji peroxidáza) a reaguje s jinými skupinami na odlišné části molekuly antigenu. Finální detekce je založená na enzymatické reakci, při které je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt. Pro aplikaci této metody je nezbytné, aby měl daný antigen alespoň dva epitopy interagující s protilátkami. Také je nutné, aby bakterie ve vzorcích byly namnoženy pomocí kultivačních metod [9].



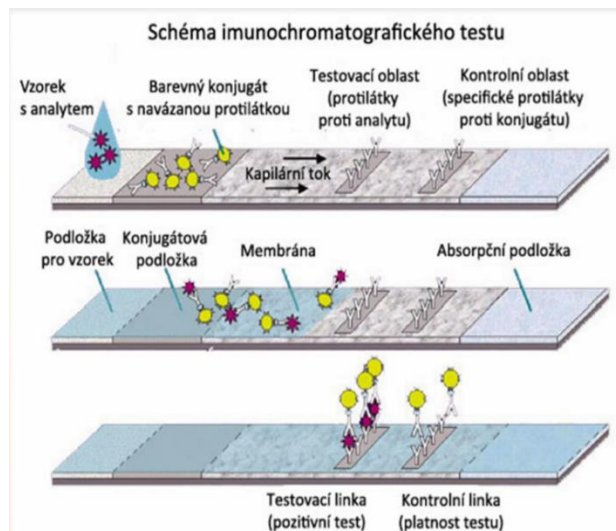
Obrázek 6 - Sendvičová ELISA (převzato z [27])

Detekce *Listeria monocytogenes* pomocí ELISA

Tento postup se skládá z několika po sobě jdoucích kroků, kdy v tom první, jsou na tuhou fázi imobilizovány protilátky. Poté se přidá vzorek, který obsahuje bakterie např. *Listeria monocytogenes*. Její buňky interagují s protilátkou. Vyskytnou se některé nenavázané složky, které se musí odstranit (např. promytím), aby mohla následovat aplikace protilátky značené enzymem. Poté je pomocí enzymové reakce substrát přeměněn na barevný produkt [10].

2.4.2 LFIA – Imunochromatografické testy

Další rozšířenou metodou jsou imunochromatografické testy, neboli LFIA. Tyto metody jsou rychlé, jednoduché a nenáročné na přístrojové vybavení. Testovaný vzorek je nanesen na nitrocelulóзовou membránu, kde postupuje testem a v určité části je imobilizován jeden z imunoreaktantů (protilátka). Protilátka se dostává do kontaktu s barevným konjugátem a tím pokračuje až k testovací zóně, kde výsledkem je barevný proužek. Využívá se přímý nekompetitivní formát (sendvič, viz Obrázek 7), který používá dva typy protilátek specifických pro stanovovaný protein. Hodnocení je prováděno vizuálně. Na trh bylo uvedeno několik LFIA pro detekci rodů *Salmonella* a *Listeria* [9, 10].



Obrázek 7 - Schéma LFIA (převzato z [28])

2.5 Polymerázová řetězová reakce

Tato metoda může detekovat jednu kopii cílové sekvence DNA. Proto se využívá část genomu, která je pro danou bakterii charakteristická. Metoda je slibná, protože cílová DNA může být méně než hodinu milionkrát amplifikována, proto stačí malé množství nukleové kyseliny. Ta slouží jako templát pro PCR. Při použití PCR se nejprve DNA izoluje přímo z analyzovaného vzorku např. z kolonie narostlé po kultivaci. Do reakční směsi jsou poté přidány primery (krátké sekvence nukleotidů [29]), které jsou navrženy tak, aby umožňovaly amplifikaci úseku DNA specifického pro konkrétní mikroorganismus (Obrázek 8) [9, 30].

Po proběhnutí PCR reakce následuje horizontální elektroforéza v agarózovém gelu. Úsek DNA, který je specifický pro daný mikroorganismus se v gelu detekuje barvivem (např. ethidium bromid, SYBR green, atd.), které se váže do dvouřetězcové DNA. Po odbarvení následuje vizualizace gelu pod UV lampou nebo pod modrým LED světlem (SYBR Safe) [9, 30].

2.5.1 Stanovení *Listeria monocytogenes* pomocí PCR

Vlastní PCR předchází nejprve izolace bakterie ze zkoumaného vzorku, její pomnožení v tekutém médiu a lýza (rozklad buněk v důsledku rozpadu jejich vnější membrány). Lýzované buňky jsou pak analyzovány PCR. Každý cyklus má 3 fáze s odlišnými teplotami. Cyklus se opakuje 25 – 35x [1].

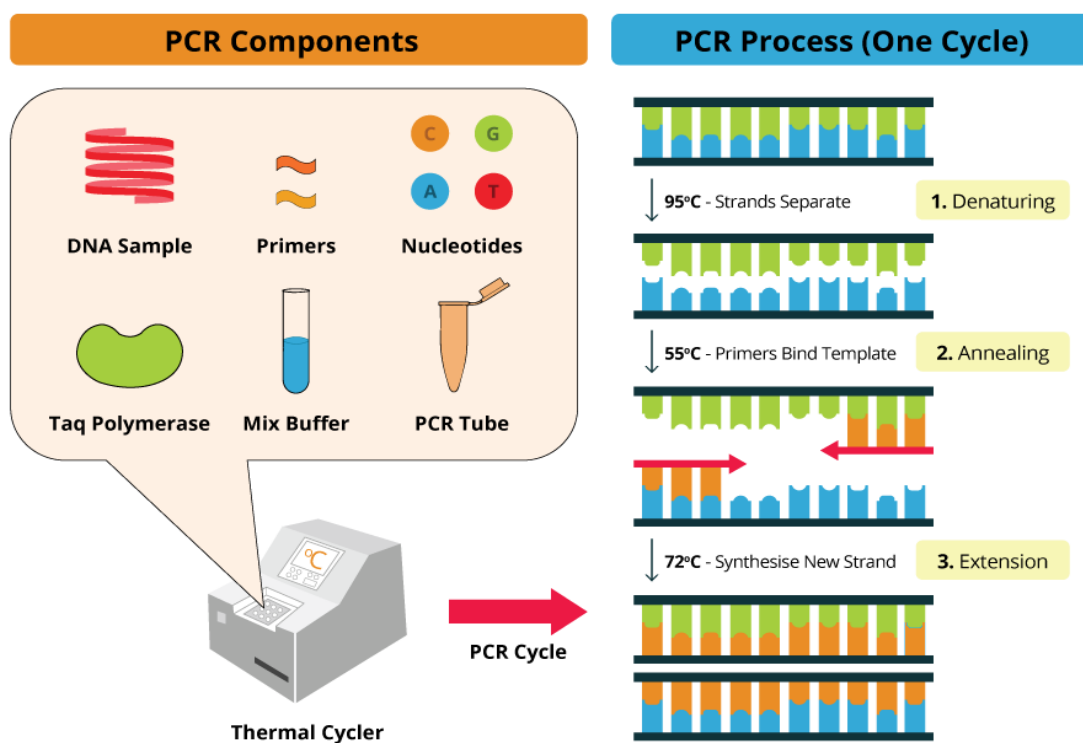
Nejprve dochází k oddělení vlákna dvoušroubovice DNA teplotní denaturací (při teplotě 90°C). Poté následuje hybridizace primeru ke komplementárnímu úseku DNA (45 - 65°C) a extenze připojeného primeru termostabilní DNA polymerázou (72°C), kdy probíhá syntéza druhého řetězce DNA. Produkty PCR jsou nejčastěji detekovány elektroforézou v agarózovém gelu.

Metoda je vysoce citlivá v případě čistých kultur, proto je nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat (např. filtrací) [10].

2.5.2 Stanovení *Campylobacter* spp. pomocí PCR

Je-li požadovaná detekce pouze na úrovni rodu, využívají se vysoce konzervativní úseky 16S rRNA, v případě požadavku na rozpoznání jednotlivých druhů se využívají druhově specifické geny. Např. pro *C. jejuni* se používají mapA pro membránový protein.

Birkenhead a spol. vyvinuli techniku PCR založenou na primerech odvozených z genu flaA kódující flagelin, což je stavební bílkovina bakteriálního bičíku [21, 32].



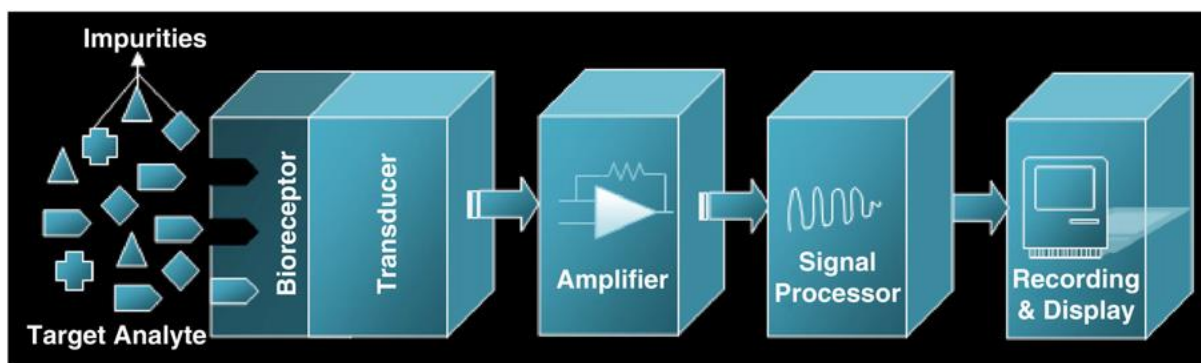
Obrázek 8 - PCR proces, 1. denaturace - dochází k separaci, 2. žihání - primery se váží na templát, 3. šíření - syntéza nového vlákna (převzato z [33])

3 Biosenzory

3.1 Úvod do biosenzorů

Biosenzor je analytický přístroj, který přemění biologickou odpověď na elektrický signál. Je spojen dvěma složkami: bioreceptorem a převodníkem. Bioreceptor má za úkol rozpoznat druh analytu a převést na převodník, který ho zpracuje tak, aby byl snadno měřitelný jako elektrický signál [32].

Na obrázku 9 je uvedeno schematicky uspořádání biosenzoru. Nejprve bioreceptor rozpoznává analyt až na molekulovou úroveň, a tato úroveň je poté pomocí převodníku na základě vlastnosti sledované látky (vlivem reakce) převedena na elektrický signál. Zesilovač v biosenzoru reaguje na malý vstupní signál z převodníku a mění ho na velký výstupní signál, který obsahuje základní vlastnosti vstupního signálu. Zesílený signál je poté zpracován signálovým procesorem, kde může být později uložen, zobrazen a analyzován [32,33].



Obrázek 9 - Schématický diagram biosenzoru (převzato z [32])

V potravinářském průmyslu z hlediska analytů převládá stanovení sacharidů, některých vitaminů a detekce bakteriální kontaminace [32].

Biosenzory mají řadu výhod, proto se berou jako slibný nástroj k detekci mikroorganismů v potravinách (Tabulka 3).

Tabulka 3 - Vlastnosti a výhody biosenzorů (převzato z [34])

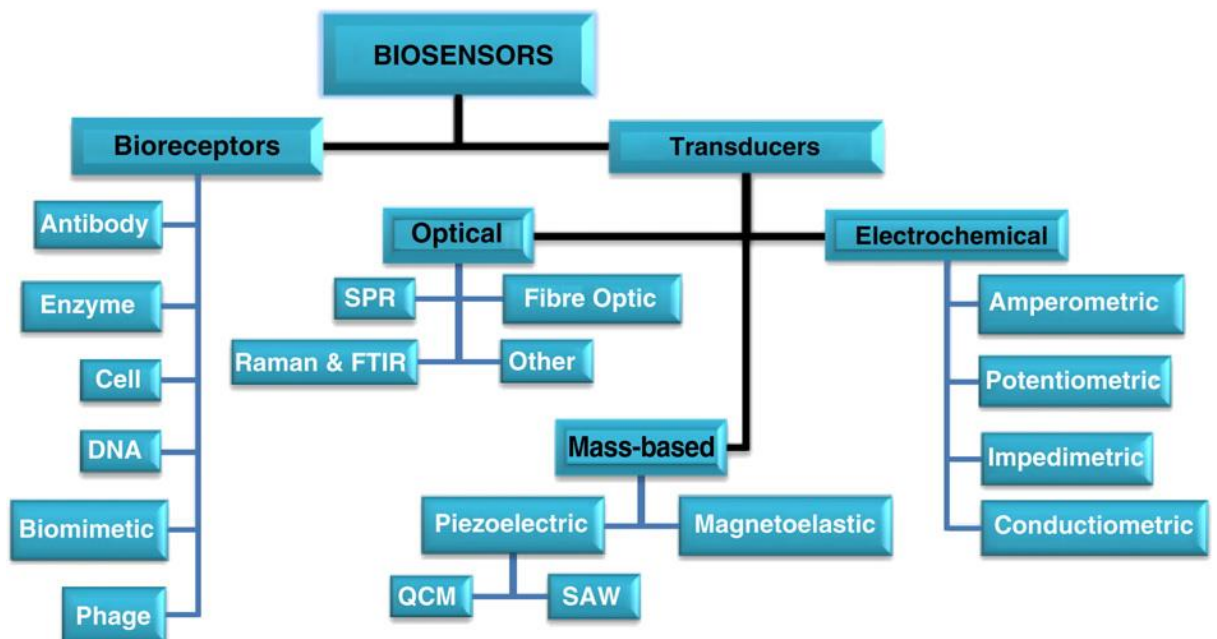
Vlastnosti	Výhody
Cílová specifčnost	Univerzálnost (identifikace jedné sloučeniny, ale i dalších)
Elektrická integrace	Kompaktní přístroj, který je navržen tak, aby byl snadno použitelný i v terénu
Práce v komplexních maticích	Reprodukovatelnost a jednoduchost, z toho vyplývá, že není potřeba vzorek předem složitě připravovat
Rychlá odpověď	Lze provádět rychlou kontrolu na místě
Neustálý signál	Upozornění na případnou chybu
Malá velikost	Přenosný, levný
Materiál	Praktický, levný, dostupný

3.2 Historie

V roce 1975 biosenzory ovlivnily řadu vědních odvětví díky objevu Kohlera a Milsteina. Ti dokázali připravit první monoklonální protilátky. Levné protilátky s dostatečnou afinitou vůči antigenu umožnily rozvinout novým typům biosenzorů, tzv. imunosenzorů. Jejich konstrukce značně ovlivnila i první piezoelektrické biosenzory. Na současném trhu jsou komerčně dostupná různá zařízení s integrovaným biosenzorem a jsou konstruovány tak, aby detekovaly patogenní mikroorganismy [35].

3.3 Klasifikace biosenzorů

Biosenzory mohou být klasifikovány podle svého bioreceptoru nebo podle typu snímače (Obrázek 10).



Obrázek 10 - Klasifikace biosenzorů (převzato z [32])

Bioreceptory jsou protilátkové, enzymové, buněčné, DNA, biomimetické a bakteriofágy. Převodníky se mohou dělit na optické (SPR – povrchová plazmonová rezonance, optické vlákno, Ramanova spektroskopie a jiné), hmotnostní (piezoelektrické – QCM - quartz crystal microbalance nebo SAW – surface acoustic wave, magnetoelastické), elektrochemické (amperometrické, potenciometrické, impedimetrické a konduktometrické) biosenzory [32].

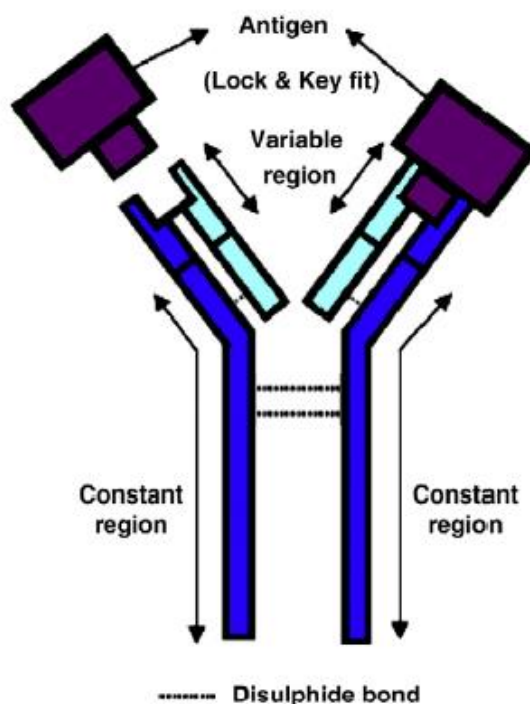
4 Bioreceptory

Bioreceptor je biomolekula, která rozpoznává cílový analyt. Dělí se do pěti hlavních kategorií. Jsou to protilátky, enzymy, DNA, buňky, biomimetika a bakteriofágy. Avšak nejrozšířenější a nepoužívanější jsou hlavně první tři kategorie [32].

4.1.1 Protilátkové bioreceptory

Protilátky jsou univerzální bioreceptory, které jsou používány v biosenzorech. Protilátka je imunoglobulin ve tvaru Y (Ig), který je tvořen dvěma těžkými (H) a lehkými (L) řetězci [36]. Mohou být polyklonální, monoklonální a rekombinantní, typ rozhoduje o jejich selektivních a syntetických vlastnostech. V každém případě jsou substráty na nich imobilizovány. Substrátem je chemická látka, která reaguje s enzymem a tím změní svou barvu. Mohou být povrchem detektoru, jeho okolím nebo nosičem. Princip interakce antigenu a specifické protilátky je podobná zámku a klíči (Obrázek 11). Zapadají do sebe specifickým způsobem, díky trojrozměrné struktuře antigenu, a tím se molekuly protilátek přizpůsobí danému tvaru [37, 38].

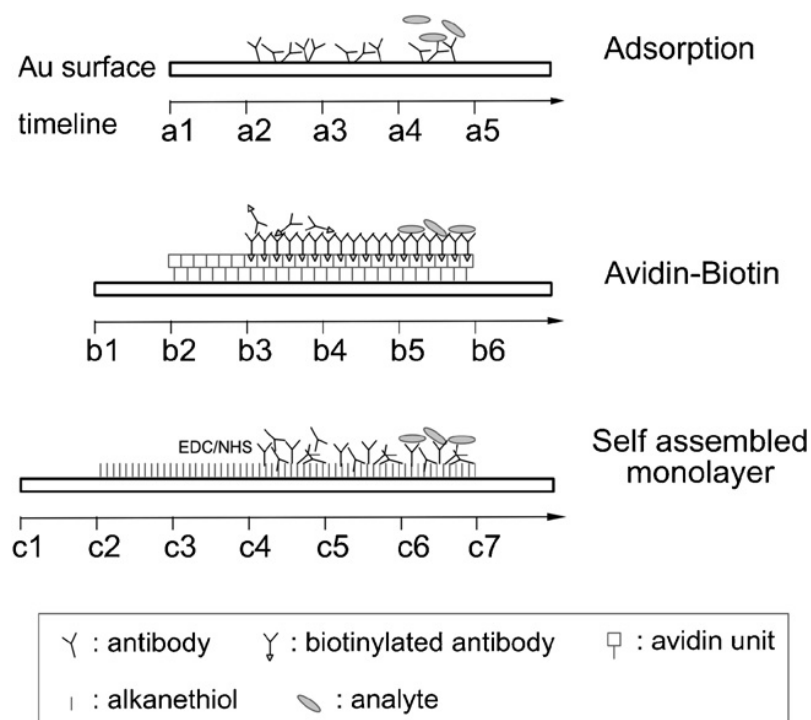
Protilátky mohou být kovalentně imobilizovány několika způsoby tak, aby vyhovovaly konkrétnímu testu. Mnoho imunologických metod zahrnuje použití značených protilátek. Nejčastěji to bývají biotin, fluorofory a radioaktivní izotopy, které poskytují signál detekce v biologických testech [32].



Obrázek 11 - Schéma klíč a zámek - antigen a protilátka (převzato z [32])

Biologické rozpoznávací prvky a strategie imobilizace se zabývají zlatými substráty z důvodu jeho významu v oblasti imunosenzorů a sond DNA, které tvoří základ většiny bakteriálních biosenzorů. Nejčastější imobilizace protilátek jsou adsorpce na zlato, systém avidin – biotin a SAM - samonosné monovrstvy (Obrázek 12). Adsorpce na zlato je nejjednodušší a nejrychlejší způsob metody. Je vhodná k zobrazení biologických makromolekul vázaných kovalentní vazbou. Její nevýhoda je pořizovací cena materiálu. Systém avidin – biotin je založen na způsobu ukotvení biomolekul na povrchu potaženém avidinem. Výhodou je vazba nekovalentní povahy, což umožňuje vícenásobné použití (díky derivátům avidinu lze snížit nespecifické interakce). Nevýhoda je vysoká cena použitých činidel [2].

SAM, neboli samonosné monovrstvy, což je vrstva vytvořená na tuhém povrchu spontánních molekul, se získají ponořením zlaté desky do roztoku, který obsahuje vhodnou povrchově aktivní látku. Nejoblíbenější jsou ponoření zlata do ethanolového roztoku obsahující disulfidy nebo thioly [2].



Obrázek 12 - Schéma strategie imobilizace (převzato z [2])

Weller a Coons. (1942) použili nepřímou dvoustupňovou metodu, ve které neznačená primární protilátka reagovala s antigenem a značená sekundární protilátka reagovala s primární protilátkou. Sekundární protilátka byla většinou značená enzymem nebo fluorescenčním barvivem. Tato metoda je stále populární [44].

4.1.2 Enzymové bioreceptory

Enzymy jsou vybrány na základě jejich specifických vazebných schopností a jejich katalytických aktivit. Vybraný enzym (např. alkalická fosfatáza), který je přizpůsobivý substrátu, by měl poskytovat dostatečný elektronový převod na elektrodu. Téměř všechny enzymy jsou proteiny, s výjimkou ribonukleoproteinových enzymů, kterým má RNA katalytickou schopnost ve srovnání s proteinem. Detekce patogenů využívající enzymy jako bioreceptory neposkytují biosenzory s vysokým stupněm specifity, ale jejich katalytická aktivita může zesilovat detekci a měřitelnost patogenní bakterie díky citlivosti analytu [39].

Chemburu a kol. (2005) aplikovali rozptýlené částice uhlíku, kde použili enzym křenové peroxidázy HRP, který působil jako protilátka pro rozpoznávání patogenů v sendvičovém imunotestu pro detekci *L. monocytogenes*, *E. coli* a *C. jejuni* [36].

4.1.3 DNA bioreceptory

Identifikace nukleové kyseliny jako cílového analytu se dosáhne porovnáním komplementárních párů bází, které jsou často genetickými složkami organismu. Protože každý organismus má jedinečné DNA sekvence, všechny samo-replikující mikroorganismy mohou být snadno identifikovány. Tyto bioreceptory jsou jednoduché, levné a široce užívané pro detekci patogenů. Lze je snadno syntetizovat a regenerovat. Avšak poškození DNA je jedním z nejdůležitějších faktorů, které je třeba vzít na vědomí. Stovky sloučenin se váží a interagují s DNA. Detekce chemikálií může způsobit nevratné poškození DNA tak, že změní její strukturu DNA a sekvenci bází, která narušuje replikaci DNA. Tento druh bioreceptoru se hodně využívá v potravinářství. DNA hybridizační mikročipy jsou navrženy jako platforma pro paralelní detekci více patogenních mikroorganismů v relativně krátkém čase [32].

Kim (2007) vynalezl rychlou metodu pro specifickou identifikaci a kvantifikaci potravinových patogenů. Jednovláknová nukleová kyselina je aptamerem, který se specificky váže na patogen, jenž má vybranou nukleotidovou sekvenci [40]. Aptamery jsou umělé receptory nebo umělé protilátky vytvořené z jednořetězcové DNA nebo RNA. Hlavní nevýhoda je však nízká afinita a jsou náchylné k degradaci nukleázami. Nicméně aptamery byly syntetizovány s afinitou k bakteriím *Salmonella* a *Campylobacter* [41].

Huang a kolektiv zkonstruovali jednoduchý a nízkonákladový elektrochemický biosenzor pro vysoce citlivou detekci, který je založen na amplifikaci spojenou s DNA enzymem napodobujícím peroxidázu. *E. coli* se může specificky vázat na G – kvadruplexové jednotky v aptamer - primerové sondě, což vede k tvorbě četných G – kvadruplexních oligomerů na elektrodě. Díky K^+ a heminu na elektrodě jsou schopny komplexy G – kvadruplex/hemin

generovat extrémně silnou katalytickou aktivitu vůči H_2O_2 , a poté může být detekována silná elektrochemická odezva [42].

4.1.4 Buněčné bioreceptory

Tyto bioreceptory jsou užitečné při určování toxicity vybraných buněk. Používají se celé buňky živých bakterií. Vývoj je však náročný, protože vyžaduje detekci analytů, které jsou mnohem větší než typické molekulární analyty jako jsou proteiny [43]. V buněčných biosenzorech celá buňka slouží jako molekulární rozpoznávací prvek a vyžaduje dvě fáze přenosu. Primární převodník slouží pro konverzi detegovaného analytu na buněčnou odpověď. Druhý převodník je nutný pro převod buněčného signálu na elektronický, který lze zpracovat a analyzovat. Detekce živých buněk má mnoho výhod, jako jsou citlivost, široký rozsah biochemických podnětů, poskytnutí funkčních testů pro biochemická činidla, nízká mez detekce [44]. Bioreceptory byly vyvinuty tak, aby cílily na konkrétní složky např. lektiny [43].

Carlyle a kol. (2002) použili chromatofor (buňka obsahující pigment) pro detekci mikrobiálních patogenů. Chromatofory jsou pigmentovány buňkami odvozených z *Betta splendens*, které procházejí barvou v důsledku agregace. Buňky chromatoforu byly vystaveny purifikovaným bakteriálním toxinům. Jednalo se o kmeny *E. coli*, *Samonella*, *Shigella* [45].

4.1.5 Biomimetické receptory

Receptor, který je vytvořen a navržen tak, aby napodoboval bioreceptor (protilátka, enzym, nukleová kyselina) se často nazývá jako biomimetický receptor. Ačkoli existuje několik metod, jako jsou geneticky konstruované molekuly, umělá membránová výroba, molekulární technika tisku se však ukázala jako nejvíce atraktivním nástrojem pro vývoj umělých rozpoznávacích látek, tzv. molekulově vtištěných polymerů (MIP). Princip spočívá v tvorbě polymeru kolem molekuly, která může být jako šablona. Molekulárně vtištěné polymery mohou být syntetizovány pro jakoukoliv molekulu analytu a jsou schopny vazeb na stejné úrovni jako biologický rozpoznávací prvek. Nicméně je tu i řada nevýhod např. je těžké odstranit templát z MIP – molekulárně vtištěný polymer, protože vtištěný polymer je nerozpustný [44].

Použití biomimetického polymerního senzoru se uplatní především pro spektroskopickou detekci bakterií. Je založena na interakci membránově aktivní sloučeniny vylučované bakteriemi. Nanočástice (částice miniaturních rozměrů [46]), které se nachází v agaru s bakteriemi, obsahují fosfolipidy a chromatický polymer polydiacetylen. PDA – polydiacetylen prochází viditelnou modro-červenou transformací spolu s intenzivní fluorescenční emisí, které jsou indukované molekulami uvolňovaných bakterií. Chromatický přechod je snadno identifikován pouhým okem. Toto může být aplikováno pro detekci G^+ a G^-

bakterií. Tento test však neudává specifčnost konkrétní bakterie, ale může těžit z hodnocení čerstvosti potravin.

Ma a spol. (1998) ukázali, že glykolipidy mohou být vloženy do polydiacetylenové matrice na bázi nekovalentní vazby, kde se použila kyselina 2, 4 – trikosadiynová (2,4 - TCDA). Jako receptor byl použit dioktadecylglycerylether-p-glukosid pro detekci *E. coli* [47]. Nevýhodou byla citlivost 2, 4 – TCDA, protože nedošlo k žádné barevné změně. Až díky Su a spol. (2005), kdy dokázali vyrobit smíšené fosfolipidovo-polydiacetylenové vezikuly s glykolipidem pro kolorimetrickou detekci *E. coli*. Barevná změna byla z modré na červenou a byla viditelná pouhým okem. Test byl kvantifikován absorpční spektroskopií [48].

4.1.6 Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou viry o velikosti 20 – 200 nm, které se vážou na specifické receptory povrchu bakterií, kde vstříkují genetický materiál. Fágy rozpoznávají bakterie receptory přes ocasní proteiny [49].

5 Převodníky

Převodník hraje důležitou roli v procesu detekce. Biosenzory mohou být klasifikovány na základě transdukční metody. Patří sem optické, elektrochemické, akustické a termální (Tabulka 4). Každá z těchto hlavních tříd se dělí na další podtřídy, kde dále rozeznáváme značené a neznačené metody. Značené závisí na detekci specifického štitku, neznačené jsou založeny na přímém měření jevu probíhajícím během biochemické reakce na povrchu snímače [32].

Tabulka 4 - Druhy nejpoužívanějších převodníků v biosenzorech (převzato z [34])

Převodník	Příklady
Elektrochemický	
Amperometrický	Clarkova oxygenová elektroda, chemicky modifikované elektrody
Potenciometrický	Iontově-selektivní elektrody, tranzistory
Konduktometrický	Platinové elektrody
Optický	Optická vlákna
Akustický	Pizelektrické krystaly, akustická vlna
Termální	Termistor

5.1 Optické biosenzory

Tyto senzory pro svou selektivitu a citlivost jsou využívány pro detekci bakterií. Nabízí několik metod, které jsou například založené na absorpci, odrazu, disperzi, Ramanova infračerveného záření, chemiluminiscenci, fluorescenci a fosforescenci. Pro záznam vyžadují vhodný spektrometr [32].

5.1.1 Infračervená Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je optická technika založená na rozptylu světla. Je potřeba, aby se před stanovením bakterie kultivovaly nebo se vyrobilo dostatečné množství biomasy, abychom dosáhli potřebného výsledku.

Schmilovitch a kolektiv (2005) použili disperzní systémový spektrometr, který obsahoval diodový laser o vlnové délce 785 nm. Díky tomu detekovali přítomnost G^+ a G^- bakterie. Systém byl také schopen určit koncentrace bakterií a později nebylo potřeba ani kultivace. Patogeny, které nás zajímaly, byly selektivně izolovány ze vzorku pomocí zachycovacích biomolekul [32].

5.1.2 Fluorescence

Fluorescence nastává, když je excitován valenční elektron do níže energeticky stabilního stavu. Při dostatečné energii dochází k excitaci absorpcí světla. Pokud se elektron vrací do svého původního stavu, emituje se foton nižší energie. Další důležitou vlastností fluorescence jsou malé tepelné ztráty a rychlé vyzařování světla po absorpci. Vyzařované světlo má delší vlnovou délku než absorbované světlo, protože část energie je ztracena v důsledku vibrací. Tato energetická mezera se nazývá Stokesova a měla by být dostatečně velká, aby nedocházelo ke vzájemnému přenosu elektronu mezi excitací a emisními signály [36].

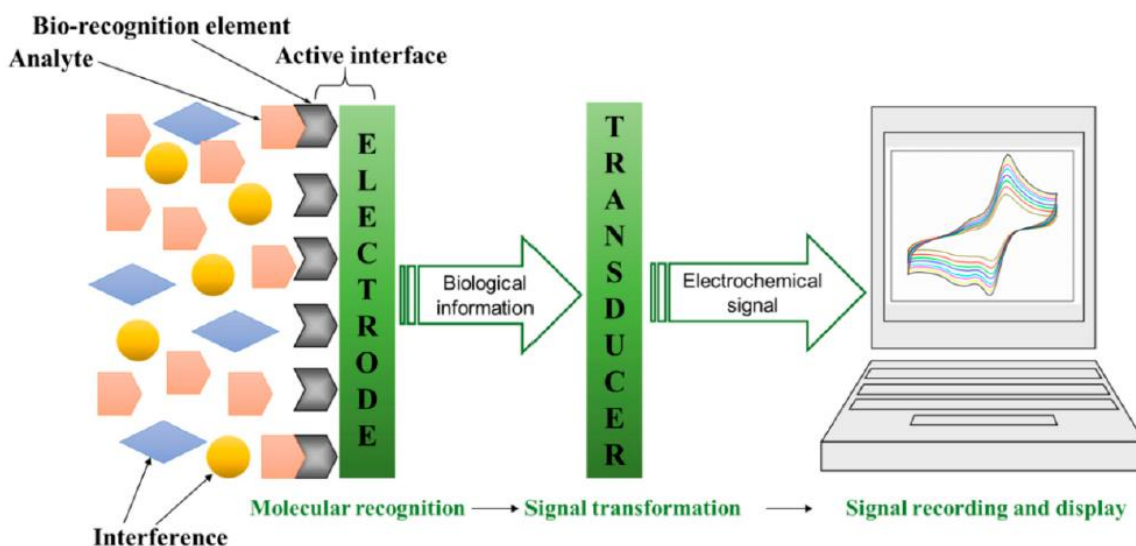
5.1.3 Povrchová plazmonová rezonance

Biosenzory založené na SPR – povrchové plazmonové rezonance využívají nelineární optiku. Jejich velká výhoda je přímé stanovení. SPR využívá světelný svazek, který dopadá přes optický hranol na tenký kovový film (zlatý nebo stříbrný), a poté se odráží. Úhel, při kterém dochází k interakci záření, je závislý na vlastnostech kovového filmu [4, 35].

Akademie věd ČR spolupracovala na evropském projektu PATHOMILK, kde vyvíjeli biosenzor detekující patogenní mikroorganismy v mléce. Biosenzor je založený na rezonanci povrchových plazmonů s vybranými sekvencemi DNA pro přímou detekci úseků nukleových kyselin identifikujících vybrané patogenní bakterie jako jsou *Campylobacter jejuni* a *Listeria monocytogenes* [50].

5.2 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory (Obrázek 13) mohou být klasifikovány na základě pozorovaných parametrů, jako jsou proud, potenciál, impedance a vodivost [32]. V porovnání s optickými metodami, umožňují práci se zakalenými vzorky. Avšak jejich nevýhoda je nižší selektivita, která však jde ovlivnit biorekogničním elementem biosenzoru (např. jod, ferrokyanid nebo permeabilní membrány) [2, 39].



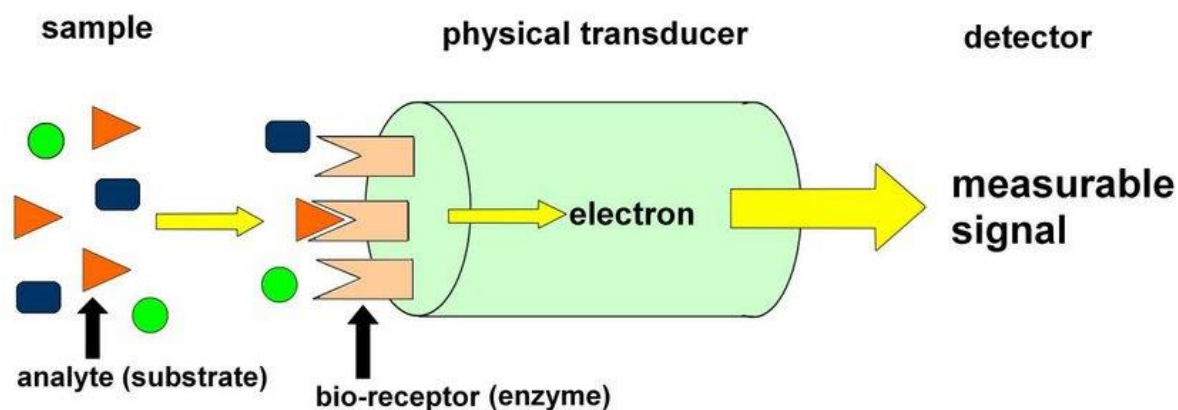
Obrázek 13 - Schéma elektrochemického biosenzoru – po kontaktu analytu s rozpoznávacím prvkem na povrchu biosenzoru, je poskytnuta reakce a transformována na elektrochemický signál. Ten se dále zpracovává k určení koncentrace patogenu. (převzato z [39])

5.2.1 Amperometrické biosenzory

Amperometrické biosenzory (Obrázek 14) jsou nejjednodušší elektrochemické transdukční techniky. Elektrochemický článek se skládá z pracovní elektrody (obvykle vyrobená z uhlíku, zlata a platiny) a referenční elektrody [34].

Amperometrická detekce mikroorganismů zahrnuje měření proudu, který je generován, buď reakcí katalyzovanou enzymy nebo bioafinitní reakce na povrchu pracovní elektrody. Výhoda amperometrických biosenzorů je, že jsou malé a mohou se snadno přenášet, popřípadě s nimi měřit v terénu [2].

Alexander a kol. (2016) pomocí polyklonální protilátky detekovali *Salmonella typhimurium* z mléka amperometrickým biosenzorem. Použili zlatou elektrodu a limit detekce byl 10 CFU/ml [51].



Obrázek 14 - Schéma amperometrického senzoru (převzato z [52])

5.2.2 Potenciometrické biosenzory

Potenciometrické biosenzory využívají iontové elektrody k měření potenciálu roztoku založeného na specifických interakcích s ionty v roztoku. Tato metoda měří rozdíl elektrického potenciálu mezi pracovní elektrodou a referenční elektrodou. Pracovní elektroda prochází významnou změnou svého potenciálu i při malých změnách koncentrace analytu, zatímco potenciál referenční elektrody je neměnný po celou dobu měření. Tyto biosenzory, používané pro detekci patogenů, patří mezi nejméně používané [51]. Pouze LAPS – light addressable potentiometric sensor (světlo adresovatelný potenciometrický senzor), který je založený na FET – field effect transistor (pole tranzistoru) je vhodný pro mikrobiální detekci. Skládá se ze silikonového polovodičového senzoru typu n a izolační vrstvy, která je v kontaktu s vodným roztokem, kde probíhá imunoreakce. Změny potenciálu na křemíkovém rozhraní jsou detekovány jako rozdíl rozložení náboje mezi povrchem izolátoru a FET. LAPS měří střídavý fotoproud, který je generován světelným zdrojem (světelná dioda) [2].

Ercole a spol. (2003) detekovali *E. coli* v rostlinných potravinách (hlávkový salát, nakrájená mrkev) pomocí potenciometrického senzoru LAPS. Detekce *E. coli* byla založena na změnách pH způsobených produkcí NH_3 ureázou. Vzorokly potravin byly promyty peptonovou vodou o pH 6,8, a poté byly smíchány v sonikátoru, aby se oddělily bakteriální buňky. Tato kapalná fáze byla analyzována potenciometricky. Metoda byla rychlá a citlivá. Test trval 1,5 hodiny a koncentrace činila 10 buněk/ml [51].

Gustavo a spol. (2010) detekovali pomocí DNA bioreceptoru *E. coli* v mléku potenciometrickým biosenzorem na bázi aptameru. Limit detekce byl 6 kolonií tvořící jednotky/ml [51].

5.2.3 Konduktometrické biosenzory

Vodivostní biosenzory měří vztah mezi vodivostí a bio-rozpoznávací technikou. Když se elektrolyt disociuje na své iontové složky v kapalině, tak se kapalina stává vodivým médiem. Pokud se použije elektrické pole, dochází k migraci iontů. Když je na elektrodu aplikován potenciál, uvnitř elektrolytu vzniká elektrické pole, kdy záporné náboje se pohybují směrem k anodám a kladné směrem ke katodám. Proud v elektrolytu je tedy způsoben pohybem iontů k elektrodám. Vodivost může být ovlivněna různými faktory včetně teploty [53].

Muhammad – Tahir a Alocilja (2006) vyvinuli vodivostní biosenzor pro detekci patogenů jako je *E. coli* O157: H7 a *Salmonella* spp. v čerstvých produktech např. jahodách. Dolní hranice detekce byla přibližně $7,9 \times 10^1$ CFU/ml. Doba analýzy byla 10 minut. Biosenzor byl založen na elektrochemickém sendvičovém imunotestu [32, 53].

5.3 Impedimetrické biosenzory

Princip této metody je na základě elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Je zde aplikován na elektrodu elektrický stimul v rozsahu 5 - 10 mV, který je aplikován přes frekvenci (5, 10 nebo 20 MHz) a to způsobí tok proudu. Technika se hodně využívá pro bioafinitní interakce na povrchu elektricky vodivých polymerů [32].

Yang a kolektiv (2004) použili interdigitované mikroelektrody jako impedanční senzory pro rychlou detekci životaschopné *Salmonella typhimurium*. Impedance růstové křivky proti impedanci doby růstu bakterie byly zaznamenány ve čtyřech frekvencích (10 Hz, 100 Hz, 1kHz a 10kHz). Ze záznamu bylo pozorováno, že impedance se nezměnila do té doby, než počet buněk nedosáhl 10⁵ – 10⁶ CFU/ml. Největší změna proběhla při 10 Hz [32].

5.4 Hmotnostní biosenzory

Základní princip této metody je ve spojení piezoelektrických krystalů [2]. Piezoelektrické biosenzory jsou založeny na principu akustiky (zvukové vibrace). Při použití produkují mechanické síly. Snímané molekuly jsou připojeny k piezoelektrickému povrchu, ve kterém probíhají interakce mezi analytem a snímanou molekulou. Tím se vytvářejí vibrace, které jsou převedeny na elektrický signál [54].

Su a Li (2005) demonstrovali tzv. QCM (quartz crystal microbalance) imunosenzor pro přímou detekci *S. typhimurium* z kuřecího masa pomocí simultánního měření rezonanční frekvence a pohybové rezistence. Imunosenzor byl vytvořen za použití proteinu A pro imobilizaci látek. Protein A je buněčný povrchový protein. Funguje jako imunoglobulin vázající protein a může to usnadnit přenos bakterií [55]. Výsledek byl 10⁵ – 10⁸ buněk/ml [44].

5.5 Elektronický nos

Tato metoda obsahuje řadu 32 vodivých polymerních senzorů, které byly použity k získání pachových vzorů v horním prostoru masa. Výsledky ukázaly, že systém je schopen identifikovat kontaminované maso *S. typhimurium* při koncentraci 7 CFU/ml.

Pokud je plyn adsorbován senzorem, dochází k odporu organických polymerů a ten je poté snímán [32].

6 Závěr

Tato práce se zabývá biosenzory pro detekci patogenů v potravinách. Biosenzory jsou slibným nástrojem pro včasnou detekci nežádoucích mikroorganismů. Ačkoli některé tradiční metody detekce patogenních původců potravin jsou citlivé, většina z nich jsou také časově náročné (několik dní až týden), což omezuje jejich praktické využití. Proto je stále nezbytné vyvíjet nové metody. Slibně se jeví např. elektrochemické biosenzory, které jsou rychlé a jednodušší než optické, které možná poskytují lepší citlivost, ale jejich náklady a složitost je činí neatraktivními.

Například elektrochemické biosenzory na bázi DNA nebo aptameru vykazují vysokou citlivost a nízkou mez detekce, nicméně by se dala zlepšit stabilita toho přenosu. Velice slibně se jeví i amperometrické biosenzory, které mají malý rozměr, a tudíž jsou skladné a můžou být využívány v terénu.

Ovšem to neznamená, že tradiční metody, které jsou stále normované, budou opomíjeny. Naopak budou sloužit jako kontroly a budou se se screeningovými testy porovnávat.

Použitá literatura

- [1] SHARMA H., MUTHARASAN R. Review of Biosensors for food borne pathogens and toxins. *Sensors Act B: Chem.* **2013**, 183, 535 – 549.
- [2] INVITSKI D., ABDEL-HAMID I., ATANASOV P., WILKINS E. Biosensors for the detection of pathogenic bacteria. *Biosens Bioelectron* **1999**, 14, 599 – 624.
- [3] FOURNIER P-E., DRANCOURT M., COLSON P., ROLAIN J-M., SCOLA BL., RAOULT D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11, 574 –585. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3068>.
- [4] FDA, Food Protection Plan. Department of health and human services. Maryland: U.S. Food and Drug Administration. **2007**.
- [5] DEMNEROVÁ K. Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické Listy*. Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha. **2012**, 106, 920-925.
- [6] Poriny. *Lékařské slovníky* [online]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz>.
- [7] DART R. K. Microbiology for the Analytical Chemist. *The Royal Society of Chemistry*. Cambridge, **1996**, 99 – 100. ISBN 0-85404-524-4.
- [8] GORNER F., VALÍK L. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. *Malé centrum*. Bratislava, **2004** (9). ISBN 80-967064-9-7.
- [9] DEMNEROVÁ K. Laboratoř mikrobiologického zkoumání potravin. VŠCHT. Praha, **2016**. ISBN 978-80-7080-957-0.
- [10] SKLÁDAL P., MACHOLÁN L. Biosensory – současný stav a perspektivy. *Chemické Listy*. Brno, **1997**, 91, 105-113.
- [11] Listeria m. In: *Yumpu* [online]. Dostupné z: <https://www.yumpu.com/en/document/read/10860637/rapidlmonotm-chromogenic-media-bio-rad>.
- [12] Listeria m. In: *Foodnavigator* [online]. Dostupné z: <https://www.foodnavigator.com/Article/2014/05/13/Closing-gaps-for-Listeria-risk-assessment-in-ready-to-eat-foods>.
- [13] LUKÁŠ K., HOCH J. Nemoci střev. *Grada Publishing a.s.* **2018**, 519 - 522. ISBN 9788024713342.
- [14] Salmonella. In: *Livescience* [online]. Dostupné z: <https://www.livescience.com/64031-salmonella.html>.
- [15] Escherichia coli. In: *Bezpecnost potravin* [online]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76555.aspx>.

- [16] Escherichia coli. In: *Stop foodborne illness* [online]. Dostupné z: <https://stopfoodborneillness.org/wp-content/uploads/2015/04/e-coli-clip-art.jpg>.
- [17] Escherichia coli. In: *Biocote* [online]. Dostupné z: <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>.
- [18] E. coli. *Výživa společnosti* [online]. Dostupné z: <https://www.vyzivaspol.cz/mame-se-obavat-bakterii-escherchia-coli/>.
- [19] RIVAS L., MELLOR E. G., FEGAN N. Detection and Typing Strategies for Pathogenic Escherichia coli. *Springer briefs in food, health, and nutrition*. Springer, **2015**, ISBN 9781493923465.
- [20] Campylobacter. *SVSCR* [online]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zivocisne-produkty/onemocneni-z-potravin/kampylobakterioza/>.
- [21] HOCHER I. Metody detekce a charakterizace Campylobacter spp. *Chemické Listy*. **2009** (103), 814-822.
- [22] Campylobacter jejuni. In: *Potravinýx* [online]. Dostupné z: <http://potravinýx.cz/index.php/2015/07/07/campylobacter-jejuni-a-campylobacter-coli/>.
- [23] STEPHAN R., SCHUMACHER S., SZYCHOWSKA MA. The VITR technology for rapid detection of Listeria monocytogenes and other Listeria spp. *Int J Food Microbiol*. **2003**, 89, 287–90.
- [24] *Metody kultivace* [online]. Dostupné také z: <https://www.spspas.cz/ew/1151ca40-4ebf-4254-8047-8528ca932f0e-cs>.
- [25] *Metoda kultivace* [online]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/obecna-mikrobiologie/kultivace-ockovani-a-rust-mo.pdf>.
- [26] Enzymy. E-chembook [online]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/enzymy>.
- [27] ELISA - sendvičový postup. In: *Baria* [online]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>.
- [28] LFIA. In: *VSCHT* [online]. Dostupné z: https://uchpl.vscht.cz/files/uzel/0010733/Bicano_va_SVK2014.pdf?redirected.
- [29] Primer. *Lékařské slovníky* [online]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz>.
- [30] Flagelin. *Lékařské slovníky* [online]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz>.
- [31] PCR. In: *Bosterbio* [online]. Dostupné z: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr>.
- [32] LACZKA O., DEL CAMPO FJ., MUNOZ FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*. **2007**, 22, 1205–17.

- [33] LEE K. M., RUNYON M., HERRMAN T., PHILLIPS R., HSIEH J. Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*. **2014**, 47, 264-276. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.07.011.
- [34] SCOTT A. O. Biosensors for food analysis. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, **1998**. ISBN 0-85404-750-6.
- [35] POHANKA M. *Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens*. Centrum pokročilých studií. Hradec Králové, **2009**, 148 - 152. ISBN 978-80-7231-336-5.
- [36] YUNUS G. Biosensors: An enzyme-based biophysical technique for the detection of foodborne pathogens. Academic Press, **2019**. ISBN 978-0-12-813280-7.
- [37] WILLIS J. R., BRINEY B. S., DELUCA S. L. CROWE J. E., MEILER J. Human Germline antibody gene segments encode polyspecific antibodies. *PLoS Comput Biol*. **2013**, 9 (4): e1003045.
- [38] HOA X. D., KRIK A. G., TABRIZIAN M. Enhanced SPR response from patterned immobilization of surface bioreceptors on nano – gartings. *Biosens Bioelectron*. **2009**, 24, 3043 - 3048.
- [39] VO-DINH T., CULLUM B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem*. **2000**, 366, 540–551.
- [40] WARRINER K., NAMVAR A. Biosensors for foodborne pathogen detection. *Comprehensive Biotechnology (Second edition)*. Pergamon, **2011** (4). ISBN 978-0-08-088504-9.
- [41] KIM S., CHOI YG., EOM JW., OH TJ., LEE KS., KIM SH., ET AL. An outbreak of Salmonella enterica serovar Othmarschen at a funeral service in Guri-si, South Korea. *Jpn J Infect Dis*. **2007**, 60. 412–413.
- [42] GIOVANNI M., SETYAWATI M. I., TAY C. Y., QIAN H., KUAN W. S., LEONG D. T. Electrochemical Quantification of Escherichia coli with DNA Nanostructure. *Adv. Funct. Mater*. **2015**, 25, 3840–3846.
- [43] JOUNG C-K., KIM H-N., LIM M-C., JEON T-J., KIM H-Y., KIM Y-R. A nanoporous membrane-based impedimetric immunosensor for label-free detection of pathogenic bacteria in whole milk. *Biosens. Bioelectron*. **2013**, 44, 210-215.
- [44] BAYER E. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology advances*. **2010**, 28 (2), 232 - 254. ISSN 0734-9750.
- [45] CARLYLE C. A., SVEJCAR M., SKINNER M. M., PRESTON R. R., JAMERSON N. S., FISHER C., ET AL. A cell-based biosensor assay for toxin activity detection of bacterial origin. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol*. **2002**, 102, 369.

- [46] *Nanočástice* [online]. Dostupné z: <http://www.nanocastice.cz/vyuziti-nanocastic/>.
- [47] MA Z. F., LI J. R., LIU M. H., CAO J., ZOU Z. Y., TU J., ET AL. Colorimetric detection of *Escherichia coli* by polydiacetylene vesicles functionalized with glycolipid. *J Am Chem Soc.* **1998**, 120, 12678–9.
- [48] SU YL, LI JR, JIANG L, CAO J. Biosensor signal amplification vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of *Escherichia coli*. *J Colloid Interface Sci.* **2005**, 284, 114–9.
- [49] SINGH A., GLASS N., TOLBA M., BROVKO L., GRIFFITHS M., EVOY S. Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. *Biosens Bioelectron* **2009**, 24, 3645–51.
- [50] PSR [online]. Dostupné z: https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv/detekce-patogennich-bakterii-v-mlece_15522.html.
- [51] ARORA S., AHMED N., SUCHETA, SIDDIQUI S. Detecting food borne pathogens using electrochemical biosensors. *International journal of chemical studies.* **2018**, 6 (1), 1031 - 1039. ISSN 2321-4902.
- [52] *Amperometrický biosenzor* [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Scheme-depicting-the-functional-principles-of-an-amperometric-biosensor_fig6_266266180.
- [53] ADLEY C. C., RYAN M. P. Conductometric biosensors for high throughput screening of pathogens in food. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment: Biosensor Technologies, Hyperspectral Imaging and Practical Applications.* Elsevier. **2015** (1), 315-326. DOI 10.1016/B978-0-85709-801-6.00014-9.
- [54] MALHOTRA, VERMA, TYAGI, KUMAR. Biosensors: principle, types and applications. **2017** (3), 2. ISSN 2395-4396.
- [55] *Protein A* [online]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Protein-A.aspx>.