

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Imunochromatografické testy jako rychlé metody průkazu bakteriální  
kontaminace potravin

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ivana Stará**  
Osobní číslo: **C17214**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Imunochromatografické testy jako rychlé metody průkazu bakteriální kontaminace potravin**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Z dostupných literárních zdrojů vypracovat literární rešerši o možnostech rychlého průkazu bakteriální kontaminace potravin pomocí screeningových imunochromatografických testů. V první části popsat principy těchto testů jejich uspořádání, výhody, nevýhody, a to s ohledem na aplikace pro kontrolu potravinových vzorků. V další části by měly být uvedeny konkrétní příklady aplikací, na úrovni celých bakteriálních buněk, jejich částí, či produkovaných toxinů. Jsou-li takové testy již dostupné na trhu, uvést jejich přehled.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

**Seznam doporučené literatury:**

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy. Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

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

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

V Pardubicích dne 20. 7. 2020

Ivana Stará

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a ochotu. Zároveň děkuji i své rodině a přátelům za podporu během zpracování mé práce.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zaměřuje na možnost průkazu bakteriální kontaminace potravin pomocí screeningových imunochromatografických testů. V práci je popsána jejich konstrukce, uspořádání a využití se zaměřením na detekci patogenů v potravinách. Závěrem jsou zmíněny i některé druhy potravinových bakterií způsobující různá onemocnění.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Imunochromatografické testy, bakteriální kontaminace potravin, potraviny, patogeny, stripové testy, imunochromatografie.

## **TITLE**

Lateral Flow Immunochromatographic Tests as Rapid Methods for Detection of Food Bacterial Contamination.

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis is focused on possibility of detection of bacterial contamination using screening lateral flow immunochromatographic tests. This work describes their construction, organization and usage for pathogen detection. In the end of this work, there are described some of the bacteria and diseases.

## **KEYWORDS**

Immunochromatographic Tests, Lateral Flow Immunochromatographic Test, Bacterial Contamination of Food, Foods, Pathogens, ImmunoStrips, Immunochromatographic.

## OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ</b> .....	9
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	10
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	11
<b>ÚVOD</b> .....	12
<b>1. IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY</b> .....	13
1.1. Princip .....	13
1.2. Konstrukce .....	13
1.2.1. Podložka pro aplikaci vzorku .....	14
1.2.2. Konjugační zóna .....	14
1.2.3. Membrána .....	14
1.2.4. Testovací linie, kontrolní linie .....	15
1.2.5. Absorpční podložka .....	15
<b>2. REAGENČNÍ SLOŽKY</b> .....	16
2.1. Antigen .....	16
2.2. Protilátka .....	16
2.2.1. Monoklonální protilátky .....	17
2.2.2. Polyklonální protilátky .....	18
2.3. Značky .....	18
<b>3. USPOŘÁDÁNÍ IMUNOCHROMATOGRAFICKÉHO TESTU</b> .....	20
3.1. Sendvičové uspořádání .....	20
3.2. Kompetitivní uspořádání .....	21
<b>4. FORMÁTY IMUNOCHROMATOGRAFICKÉHO TESTU</b> .....	23
Proužky pro ponoření .....	23
Kazetky .....	23
Multiplexní testy .....	24
<b>5. VÝHODY A NEVÝHODY LFIA</b> .....	26
<b>6. DETEKCE KONTAMINANTŮ POTRAVIN</b> .....	27
6.1. Analýza potravin pomocí LFIA .....	27
6.2. Studie zaměřené na detekci kontaminantů z potravin .....	27
6.3. Komerční soupravy .....	29
6.4. Víceparametrové testovací proužky .....	29
6.4.1. Disky pro stanovení více druhů sloučenin .....	31

<b>7. POTRAVINOVÉ PATOGENY</b> .....	33
7.1. Enterobacteriaceae .....	33
7.1.1. Detekce Enterobacteriaceae pomocí LFIA .....	34
7.1.1.1. <i>Salmonella</i> spp.....	35
7.1.1.2. Koliformní bakterie .....	37
7.1.1.2.1. Komerční soupravy pro detekci bakterií rodu <i>Escherichia</i> .....	38
7.1.1.3. <i>Yersinia</i> .....	39
7.2. Clostridiaceae.....	39
7.2.1. Detekce bakterií rodu <i>Clostridium</i> pomocí LFIA .....	40
7.3. Listeriaceae .....	41
7.3.1. Detekce bakterií rodu <i>Listeria</i> pomocí LFIA.....	41
7.4. Campylobacteraceae .....	42
7.4.1. Detekce bakterií rodu <i>Campylobacter</i> pomocí LFIA.....	42
7.5. Vibrionaceae .....	43
7.5.1. Detekce bakterií rodu <i>Vibrio</i> pomocí LFIA .....	43
<b>ZÁVĚR</b> .....	44
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	45



## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Typická konfigurace imunochromatografického testu.....	14
Obrázek 2: Struktura IgG ve vazbě s antigenem .....	17
Obrázek 3: Znázornění negativního a pozitivního výsledku u sendvičového uspořádání imunochromatografického testu .....	21
Obrázek 4: Znázornění negativního a pozitivního výsledku u kompetitivního uspořádání imunochromatografického testu .....	22
Obrázek 5: Ukázka stripového imunochromatografického testu.....	23
Obrázek 6: Ukázka kazetového imunochromatografického testu .....	24
Obrázek 7: Různé formáty imunochromatografického testu .....	25
Obrázek 8: Imunochromatografický test pro detekci <i>C. sakazakii</i> ze vzorku kojenecké výživy .....	31
Obrázek 9: 10kanálový imunochromatografický multiplexní test TC-UPT-LF značený upkonverzními fosforovými nanočásticemi s 10 detekčními kanály .....	32
Obrázek 10: Přehled nejzávažnějších bakteriálních onemocnění z potravin.....	33
Obrázek 11: Princip imunochromatografického proužku s kompetitivním uspořádáním pro detekci <i>Salmonella</i> spp. ....	35
Obrázek 12: Ukázka stripového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci <i>Salmonella</i> spp.....	36
Obrázek 13: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci <i>Escherichia coli</i> .....	38
Obrázek 14: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci Shiga toxinu produkovaného <i>Escherichia coli</i> .....	39
Obrázek 15: Konstrukce imunochromatografického testu pro detekci toxinu botulinum neurotoxin.....	40
Obrázek 16: Ukázka kazetového komerčně dodávaného stripového imunochromatografického testu pro detekci <i>Listeria</i> spp.....	41
Obrázek 17: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci <i>Listeria monocytogenes</i> .....	42
Obrázek 18: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci <i>Campylobacter</i> .....	43

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Přehled studií zabývajících se detekcí potravinových patogenních bakterií pomocí imunochromatografických testů .....	28
Tabulka 2: Komerční soupravy s imunochromatografickou detekcí.....	29
Tabulka 3: Nejběžnější lidské patogeny čeledi Enterobacteriaceae .....	34

## SEZNAM ZKRATEK

<b>Ab</b>	Protilátka (Antibody)
<b>BoNT</b>	Botulinum neurotoxin
<b>CFU</b>	Jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)
<b>CNP</b>	Uhlíkové nanočástice (Carbon nanoparticle)
<b>CPE</b>	Enterotoxin <i>Clostridium perfringens</i>
<b>DCN</b>	Diagnostické poradenské sítě (Diagnostic consulting networks)
<b>Fab</b>	Variabilní část protilátky (The antigen-binding fragments)
<b>Fc</b>	Konstantní část protilátky (Crystal fragment)
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiokyanát
<b>GNP</b>	Zlaté nanočástice (Gold nanoparticle)
<b>Ig</b>	Imunoglobulin
<b>IMP</b>	Imunomagnetické částice (Immunomagnetic particles)
<b>LB</b>	Latexové nanočástice (Latex balls)
<b>LFIA</b>	Laterální průtokový imunochromatografický test (Lateral flow immunoassay)
<b>LOD</b>	Limit detekce (Limit of detection)
<b>LPS</b>	Lipopolysacharidy
<b>Stx</b>	Shiga toxin
<b>TC-UPT-LF</b>	10kanálový imunochromatografický test značený UCP (10-channel up-converting phosphor technology-based lateral flow)
<b>UCP</b>	Up-konverzní fosforové nanočástice (Up-converting phosphor particle)
<b>WCLFSA</b>	Proužkové testy pro stanovení celých bakterií (Whole cell-based lateral flow strip assay)
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace (World health organization)

## ÚVOD

Bakteriální kontaminace potravin představuje riziko nejen pro rozvojové země, ale také pro vyspělé. Většina bakteriálních otrav a nálezů, ať už potravinami nebo tekutinami, je způsobena nejčastěji jejich nevhodným skladováním, přípravou nebo distribucí. Další možný způsob nákazy je přes kontaminované suroviny či vodu sloužící k přípravě pokrmů.

Předejít těmto problémům jde z velké části hlavně dodržováním základních hygienických pravidel, vhodným skladováním a dostatečnou tepelnou úpravou pokrmů. Detekce potravinových mikroorganismů je možná mnoha způsoby, ovšem ne každý způsob je stejně tak rychlý jako kvalitní. Imunochromatografické testy jsou poslední dobou čím dál více upřednostňovány z důvodu rychlé a spolehlivé detekce. Jejich kvalitativní vyhodnocení je doplněno o kvantitativní metody, nicméně pro rychlý záchyt případné kontaminace jsou tyto testy přínosné.

Bakalářské práce se zaměřuje na konstrukci a princip imunochromatografických testů. Dále je věnována pozornost jejich uspořádání, od kterého se odvíjí vyhodnocení. Jsou zmíněny i výhody a nevýhody těchto testů.

Práce zahrnuje i příklady praktického využití imunochromatografických testů v oblasti hodnocení kvality potravin – k detekci kontaminantů z potravin. Jsou uvedeny potravinové mikroorganismy, pro které jsou tyto typy testů dostupné.

# 1 IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY

Imunochromatografické testy nebo také laterální průtokové imunochromatografické testy, z angl. Lateral-flow immunoassay (LFIA) jsou jednoduché, rychlé a levné testy. Oblíbeny jsou zejména v biomedicíně, zemědělství, v aplikacích v oblasti bezpečnosti potravin a monitorování životního prostředí (Koczula, 2016, Eltzov, 2015).

Díky rychlému získání výsledků jsou LFIA testy důležité pro diagnostické účely. V současnosti je nejrozšířenějším imunochromatografickým systémem testovací proužek. Testovací proužky se nejčastěji používají pro potvrzení těhotenství (Dzantiev, 2014). Dále se LFIA testy uplatňují například ke zjištění kontaminace vzorku specifickými patogeny, přítomnosti toxických látek v potravinách, krmivech nebo v životním prostředí, nebo pro průkaz drog a návykových látek nebo jejich metabolitů v biologických vzorcích (Posthuma-Trumpie, 2009). Testovaným materiálem může být moč, dále sliny, pot, sérum, plazma, plná krev, vzorky tekutin a potraviny (Koczula, 2016, Naik, 2013).

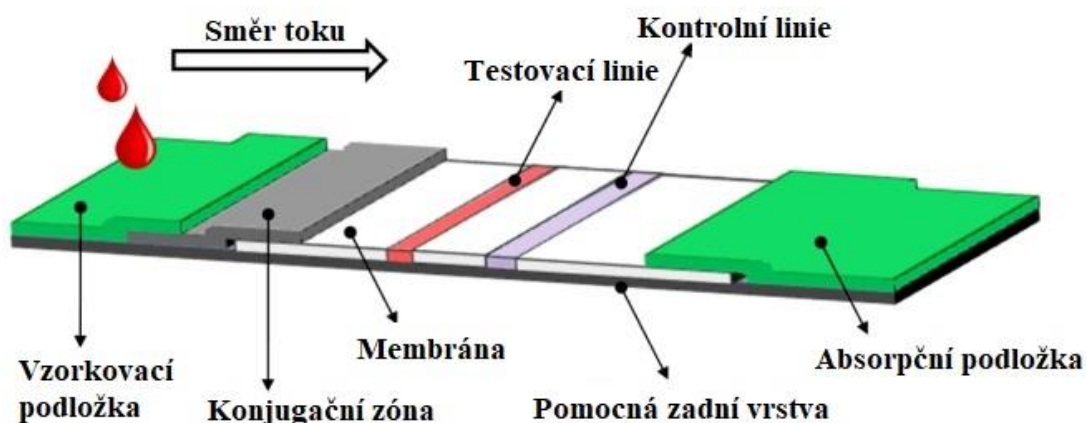
## 1.1 Princip

Princip stanovení je založen na imunochemické reakci (mezi protilátkou-antigenem) se současnou chromatografickou separací. Jedná se o separaci složek na základě rozdílů v jejich pohybu přes reakční membránu (Bahadır, 2016).

Pohyb vzorku přes membránu je prostřednictvím kapilárních sil. Kapalný vzorek obsahující sledovaný analyt se pohybuje proužkem. Proužek je vyroben z polymerních materiálů a má specifické zóny. V jedné z nich (konjugační zóna) jsou molekuly konjugovány se značkou, dále putují testovací a kontrolní linií, přebytek vzorku je zachycen absorpční podložkou (blíže popsáno v kapitole 1.2) (Banerjee, 2018).

## 1.2 Konstrukce

Standardní imunochromatografický test sestává ze čtyř částí: podložky pro nanesení vzorku, konjugační podložky, membrány obsahující testovací a kontrolní linii a absorpční podložky (Bahadır, 2016, Koczula, 2016). Uspořádání LFIA je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Typická konfigurace imunochromatografického testu (převzato a upraveno z: Koczula et al., 2016)

### 1.2.1 Podložka pro aplikaci vzorku

Podložka pro aplikaci vzorku (vzorkovací podložka) slouží k transportu vzorku do dalších částí testovacího proužku (Sajid, 2015).

Podložky pro aplikaci vzorků mohou být navrženy tak, aby vzorek před transportem předběžně upravily. Mezi tyto úpravy spadá například separace složek vzorku, odstranění interference, úprava pH atd. (Sajid, 2015). Na regulaci rychlosti průtoku vzorku jsou využívány například detergenty. Tyto látky zároveň mohou plnit úlohu filtru a odstraňovat hrubé částice z analyzovaného vzorku (Koczula, 2016, Göselová, 2014).

### 1.2.2 Konjugační zóna

Vzorek migruje směrem k testovací linii přes konjugační zónou s protilátkami. Protilátky jsou konjugovány s fluorescenčními nebo barevnými částicemi – nejčastěji koloidním zlatem (GNP) nebo latexovými nanočásticemi (Koczula, 2016, Posthuma-Trumpie, 2009). Vizualizace barevnými částicemi trvá přibližně 2 až 10 minut po přidání vzorku (Law, 2015). Značený konjugát se uvolní po reakci s pohybujícím se kapalným vzorkem (Sajid, 2015).

### 1.2.3 Membrána

Jedná se o membránu s póry, jež je obvykle z nitrocelulózy (Koczula, 2016), zesíťovaného oxidu křemičitého nebo skelných vláken (Banerjee, 2018). Membrána obsahuje specifické biologické složky (většinou protilátky nebo antigeny), které jsou imobilizovány v testovací a kontrolní linii. Jejich úlohou je reagovat s analytem navázaným na konjugovanou protilátku (Banerjee, 2018, Koczula, 2016). Průběh detekčního procesu je ovlivněn velikostí pórů membrány. Nejběžněji vyráběné velikosti pórů jsou mezi 0,05 až 12 μm (Göselová, 2014).

#### **1.2.4 Testovací linie, kontrolní linie**

V testovací linii dochází k rozpoznání analyzovaného vzorku (Posthuma-Trumpie, 2009). Odezva v kontrolní linii potvrzuje správný průtok kapaliny skrz proužek (Sajid, 2015). Vyhodnocení LFIA testů závisí na jejich uspořádání (blíže popsáno v kapitole 3).

#### **1.2.5 Absorpční podložka**

Absorpční podložka zajišťuje vztlínání kapaliny membránou, znemožňuje zpětný tok (Sajid, 2015) a zároveň zachycuje přebytečnou tekutinu (Bishop, 2019). Jejím použitím lze také zvýšit množství vzorku, což vede ke zvýšení citlivosti. Nejčastěji se používají celulósová filtry (Posthuma-Trumpie, 2009).

## 2 REAGENČNÍ SLOŽKY

### 2.1 Antigen

Antigen je látka schopná vyvolat imunitní odpověď (imunitní reakci) v podobě zvýšené tvorby buněk imunitního systému či specifických protilátek. Tato vlastnost se nazývá imunogenita nebo také imunogenicita (Sela, 1998). Interakci antigenu s produkty imunitní odpovědi označujeme jako antigenita či antigenicita (Sela, 1998, Adorini, 1998).

Dle původu lze antigeny rozdělit na přirozené a syntetické. Z chemického hlediska jsou antigeny převážně proteiny a polysacharidy, dále například glykoproteiny, nukleoproteiny, lipoproteiny a glykolipidy (Sela, 1998).

Antigeny jsou tvořeny antigenními determinanty (epitopy), které zodpovídají za specifitu a umožňují rozpoznání specifickými T a B buňkami (Adorini, 1998, Sela, 1998).

Látky, které nevyvolávají imunitní odpověď, se nazývají hapteny. Hapteny jsou nízkomolekulární látky, jež mohou reagovat s protilátkou (či jiným produktem) vhodné specifity (Sela, 1998, Seppälä, 1998).

### 2.2 Protilátka

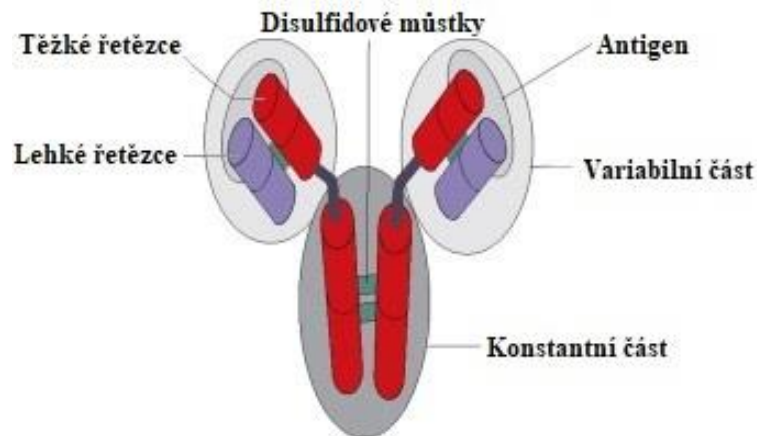
Protilátky (Abs) jsou látky bílkovinné povahy produkovány konečným vývojovým stadiem B buněk, tedy plazmatickými buňkami. Jejich produkce probíhá v závislosti na antigenu, neboť jsou vysoce specifické a mohou se vázat pouze na konkrétní antigen (Alberts, 2002, Dowd, 2009).

Molekula protilátky je složena z polypeptidových řetězců (Dowd, 2009). Tyto řetězce lze rozdělit na lehké ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) a těžké ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Těžké řetězce jsou spojeny disulfidovými můstky, které umožňují pohyblivost, respektive rotaci Fab (variabilních) řetězců vůči Fc (konstantním) řetězcům. (Dowd, 2009, Janeway, 2001).

Podle typu těžkého řetězce rozlišujeme pět různých tříd imunoglobulinů (Ig): IgA, IgD, IgE, IgG a IgM (Dowd, 2009).

Nejběžnějším typem protilátek používaných v souvislosti s imunochromatografickými testy jsou protilátky třídy IgG, jejíž struktura je podrobně popsána na obrázku 2 (Dowd, 2009)





Obrázek 2: **Struktura IgG ve vazbě s antigenem:** těžké řetězce jsou zvýrazněny červeně, lehké řetězce fialově (převzato a upraveno z: Dowd et al., 2005)

Imunoglobuliny IgG se rozdělují na jednotlivé druhově specifické podtřídy IgG1-IgG4. Díky této druhové specifitě dokáže imunitní systém jednoho druhu zaznamenat protilátky jiného druhu a označit je jako cizí. Tato vlastnost se využívá při záměrné imunizaci pro získání protilátek. Jako příklad lze uvést imunizaci králíka lidskými protilátkami. Výsledkem je vytvoření protilátek směřovaných proti aplikovaným lidským protilátkám (Dowd, 2009).

Protilátky tvoří základní část LFIA (van Amerongen, 2018). Jejich výběr (společně s dalšími parametry) ovlivňuje úspěšnost analýzy (Bahadır, 2016). Afinity použitých protilátek má vliv především na specifitu a selektivitu testovacího proužku (Çam, 2019). Ve většině případů se protilátky používají ke specifické vazbě na cílový analyt (van Amerongen, 2018). Koncentrace cílového analytu je pro volbu protilátek jako molekul biologického rozpoznávání rozhodující. Zvýšení limitu detekce je možné změnou fyzikálních parametrů analýzy (množství reagentů na různých zónách proužku, zesílení signálu pomocí značených protilátek, preinkubace vzorku se značenými protilátkami) pro různé cílové analyty (Sajid, 2015).

Pro diagnostické účely se využívají protilátky získané buď hybridomovou technologií – monoklonální protilátky, nebo zvířecí imunizací – polyklonální protilátky (Litzman, 2007).

### 2.3 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátka je protilátka, která je produktem jednoho B buněčného klonu (Dowd, 2009). Jedná se tedy o plazmocyty (plazmatické buňky) odvozené od jednoho B lymfocytu (Dowd, 2009, Bartůňková, 2005).

Prvním krokem získání monoklonálních protilátek je imunizace myši pomocí příslušného antigenu (Litzman, 2007). Po imunizaci je zvíře usmrceno a dochází k izolaci B-lymfocytů ze sleziny. Izolované buňky fúzí s myelomovými (nádorovými) buňkami za vzniku hybridomu (Dowd, 2009, Litzman, 2007). Hybridom kombinuje charakteristiku „nesmrtelnosti“ se schopností produkovat požadovanou specifickou protilátku ve vysokých koncentracích (> 13 mg/ml) a v čisté formě (Dowd, 2009).

Monoklonální protilátky mají vyšší specifitu (umožňující vazbu pouze na jeden epitop) a nižší zkříženou reaktivitu než protilátky polyklonální (Koczula, 2016, Göselová, 2014, Yu, 2015).

## 2.4 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky se od monoklonálních liší tím, že nejsou odvozeny od jediného B lymfocytu nebo jeho potomstva, ale jsou produktem mnoha různých B buněk (Dowd, 2009).

Základem získání polyklonálních antisér je opakovaná hyperimunizace zvířat (podáním antigenu). V reakci na imunizaci produkuje zvíře protilátky. Po vytvoření maximálního množství protilátek se odebírá zvířeti krev, ze které je izolováno sérum. Po dalších úpravách je výsledkem suspenze protilátek, které lze použít v mnoha typech imunotestů.

Výsledkem polyklonálních antisér je nečistý produkt obsahující širokou škálu protilátek (i ty, se kterými se zvíře setkalo již dříve ve svém životě). Nejsou příliš specifické pro konkrétní organismus, a díky tomu lze detekovat i úzce příbuzné rody (například bakteriální) (Dowd, 2009, Litzman, 2007, Peruski, 2003).

## 2.5 Značky

Protilátka, která se specificky váže na určitý cílový analyt (stanovovaný antigen), je známa jako **primární/specifická** protilátka (Sajid, 2015). **Sekundární** protilátka je navázána na primární protilátku nebo jí může být i jiná protilátka. Použití sekundární protilátky s sebou nese vyšší citlivost metody (Göselová, 2014, Sajid, 2015).

Imunochromatografické testy využívají pro záchyt neznačené protilátky a značené specifické protilátky pro detekci, vizualizaci. Značení protilátek pomocí vybrané značky, s sebou nese vyšší finanční náklady, avšak je nezbytnou součástí LFIA testů (Göselová, 2014).

Signální značka se váže na vazebné molekuly, kterými jsou protilátky specifické pro cílový analyt (van Amerongen, 2018). Značka je v konjugační zóně přítomna v suché formě nanočástice, a to barevné nebo fluorescenční (Posthuma-Trumpie, 2009).

Mezi nejdůležitější požadavky na vlastnosti nanočástic lze zařadit například stabilitu v roztoku za různých podmínek a teplot, citlivost pro detekci ve velkém (a užitečném) dynamickém rozsahu, účinnost a reprodukovatelnost konjugace (bez ztráty chemické a biologické integrity a aktivity), komerční dostupnost, nízkou cenu (Koczula, 2016).

V současné době jsou nejčastěji používanými značkami v imunochromatografických testech nanočástice zlata (GNP). První použití protilátek s koloidním zlatem pro diagnostický imunotest bylo popsáno v roce 1981 (Çam, 2019). Koloidní zlato je inertní a poskytuje dokonale sférické částice (Sajid, 2015). Nanočástice zlata mají intenzivní červenou barvu snadno detegovatelnou pouhým okem (Quesada-González, 2015). Laboratorní příprava zlatých nanočástic je jednoduchá, levná (Singh, 2015) a navíc šetrná k životnímu prostředí (Sajid, 2015). Velikost GNP se pohybuje okolo 40–60 nm (Posthuma-Trumpie, 2009).

Další populární značkou je latex (Koczula, 2016). Jedná se o levný materiál pro přípravu nanočástic. Homogenní latexové kuličky (LB) mají podobné chování jako GNP a vykazují dobrou odezvu, avšak v porovnání s jinými materiály mají nižší mez detekce (Quesada-González, 2015). Latexové nanočástice jsou pro optickou detekci obarveny (Posthuma-Trumpie, 2009).

Další využívané nanočástice jsou na bázi uhlíku – uhlíkové nanočástice (CNP). Díky jejich tmavému zbarvení vykazují ve srovnání s GNP proti pozadí vyšší kontrast (Quesada-González, 2015).

Mezi barevné nanočástice lze zařadit také selen (Posthuma-Trumpie, 2009). Koloidní selen byl jedním z prvních nanomateriálů použitých k vývoji LFIA, avšak nahradily jej GNP pro svoje výraznější zbarvení (Quesada-González, 2015).

Magnetické vlastnosti vykazují hnědě (Quesada-González, 2015) až černě zbarvené (Luo, 2018) magnetické nanočástice (Parolo, 2013). Pro imunochromatografické testy jsou voleny magnetické částice o velikosti 10–400 nm (Moyano, 2020).

Nejnovější značky zahrnují fluorescenční částice jako jsou kvantové tečky (Posthuma-Trumpie, 2009; Quesada-González, 2015) a up-konverzní fosforové nanočástice (UCP) (Singh, 2015). Oproti jiným fluorescenčním materiálům UCP nanočástice nevykazují žádnou autofluorescenci, což je velkou výhodou (Sajid, 2015).

### 3 USPOŘÁDÁNÍ IMUNOCHROMATOGRAFICKÉHO TESTU

U imunochromatografických testů rozlišujeme dva základní typy uspořádání, jejichž využití pro daný analyt závisí na jeho vlastnostech (Law, 2015, Posthuma-Trumpie, 2009). Podrobnější popis obou typů uspořádání je popsán níže.

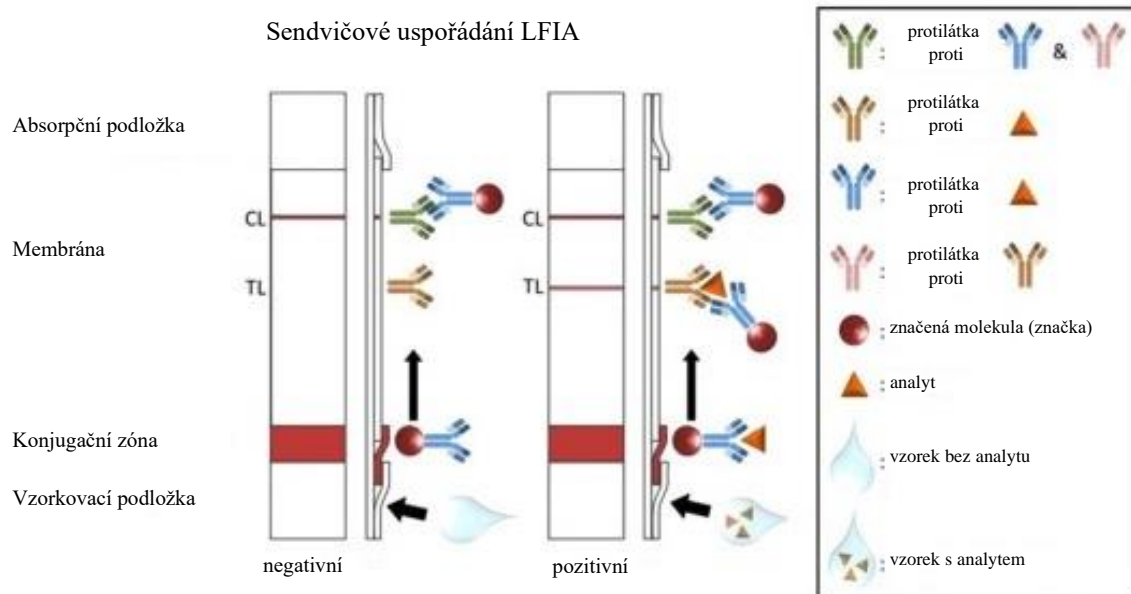
#### 3.1 Sendvičové uspořádání

Sendvičové uspořádání (označované také jako přímé či nekompetitivní) se používá k detekci větších analytů s více než jedním epitopem (Law, 2015, Posthuma-Trumpie, 2009). Mezi tyto analyty patří například viry, proteiny (Law, 2015, Zolal, 2016), lipidy, protilátky a nukleové kyseliny (Bishop, 2019) a samozřejmě i bakterie (Kim, 2015). Nejznámějším příkladem je HCG test pro detekci těhotenství (Koczula, 2016).

V těchto testech je vzorek obsahující analyt (antigen) nanesen na podložku pro aplikaci vzorku a následně migruje do dalších částí proužku. Konjugační podložka obsahuje značené protilátky, které vytváří s cílovým analytem komplex analyt-značená protilátka (konjugát). Působením kapilárních sil proudí značený komplex nitrocelulózovou membránou. V testovací zóně je komplex zachycen jinou protilátkou, která je primární pro analyt. Analyt je zachycen mezi značenými a primárními protilátkami, čímž vznikne komplex primární protilátka-analyt-značená protilátka (Sajid, 2015). Nadbytek volného konjugátu je zachycen v kontrolní zóně sekundární protilátkou a vytváří tak kontrolní linii (Sajid, 2015, Chen, 2015). Pufr nebo přebytek roztoku jde do absorpční podložky (Sajid, 2015).

V případě pozitivního výsledku, kdy je analyt součástí vzorku, dochází ke vzniku dvou barevných čar (v závislosti na použité značce), jejichž princip vzniku byl popsán výše (Singh, 2015). Například při použití GNP je pozitivní reakce obvykle vizualizována vznikem dvou červených čar (Singh, 2015, Peruski, 2003).

Negativní vzorek (bez cílového analytu) se vyznačuje vznikem jedné barevné čáry, tj. pouze kontrolní linie (Singh, 2015). Oba výsledky jsou uvedeny na obrázku 3.



Obrázek 3: **Znázornění negativního a pozitivního výsledku u sendvičového uspořádání imunochromatografického testu** (převzato a upraveno z: Quesada-González, D., Merkoçi, A., 2015)

Kvantitativní vyhodnocení je také možné (avšak není tak časté). Provádí se pomocí detekčních zařízení (kamery, detektory), kdy intenzita barvy (vhodně zvolené značky) na testovací linii odpovídá množství cílového analytu (Sajid, 2015).

### 3.2 Kompetitivní uspořádání

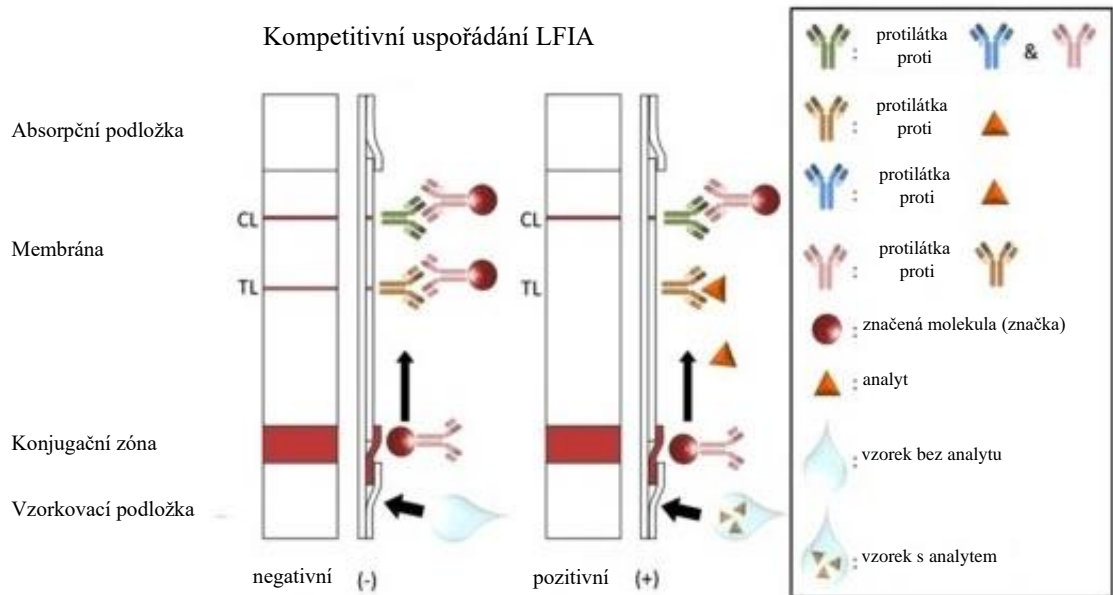
Druhým typem je uspořádání kompetitivní, jež slouží k detekci převážně analytů s nízkou molekulovou hmotností (Sajid, 2015), mezi které patří například drogy a návykové látky, léčiva, pesticidy a mykotoxiny (Peruski, 2003, Göselová, 2014), u kterých je nemožné navázání dvou protilátek současně (Zolal, 2016).

Kompetitivní uspořádání má dvě rozvržení lišící se mobilizovanou molekulou (antigen nebo protilátka) v testovací zóně.

Vzorek obsahující cílový analyt se nanese na podložku pro aplikaci vzorku. Předem označený konjugát proudí s kapalinou k testovací linii, která obsahuje imobilizovaný antigen (stejný detekovaný analyt) nebo protilátku. Kontrolní linie obsahuje imobilizovanou sekundární protilátku, která má schopnost vázat se se značeným konjugátem protilátky (Sajid, 2015).

V případě, že cílový analyt není ve vzorku přítomen nebo je přítomen ve velmi malém množství, dochází k vazbě imobilizovaného antigenu se značeným konjugátem. Nepřítomnost proužku v testovací linii je indikací přítomnosti analytu ve vzorku, zatímco výskyt proužků

na testovací i kontrolní linii naznačuje negativní výsledek, neboť analyt ze vzorku soutěží s imobilizovaným antigenem o vazbu na značený konjugát (Sajid, 2015). Vyhodnocení testu znázorňuje obrázek 4.



Obrázek 4: **Znázornění negativního a pozitivního výsledku u kompetitivního uspořádání imunochromatografického testu** (převzato a upraveno z: Quesada-González, D., Merkoçi, A., 2015)

Stejně jako u sendvičového, tak i u kompetitivního uspořádání lze v některých případech (za použití vhodné značky) provést kvantitativní nebo semikvantitativní vyhodnocení. Provádí se na základě intenzity barev v testovací linii pomocí detekčních systémů, jimiž mohou být například speciální digitální kamery, fotodetektory nebo i fotoaparáty mobilního telefonu. Signál je poté zpracován softwarem (Singh, 2015, Sajid, 2015, Eltzov, 2015).

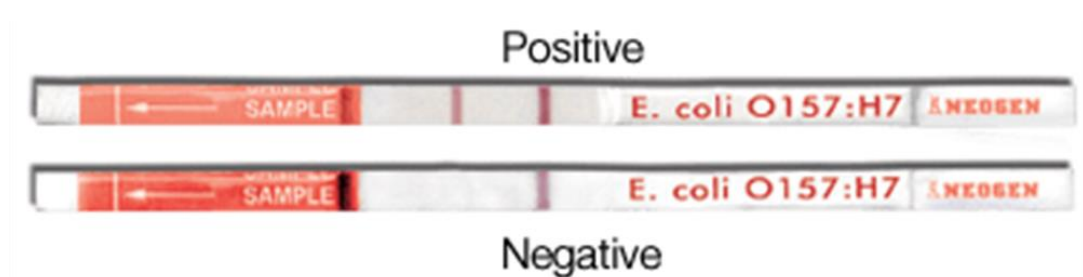
## 4 FORMÁTY IMUNOCHROMATOGRAFICKÉHO TESTU

Imunochromatografické testy jsou dvojího formátu: proužky (stripy) pro ponoření nebo kazetky, kdy jsou proužky uloženy do plastového krytu (Göselová, 2014, Zhou, 2012).

### Proužky pro ponoření

Nitrocelulózkové proužky neboli stripy, lze snadno vyrobit pomocí voskových tiskáren s možností definování hydrofilních a hydrofobních zón a pomocí pásek k sestavení do vícevrstvých struktur (Zhou, 2012).

Použití těchto testů je velmi snadné – ponoří se do analyzovaného roztoku na určenou dobu a následné vyhodnocení je možné do několika minut. Veškeré další výhody i nevýhody jsou shrnuty v kapitole 5. Na obrázku 5 je stripový imunochromatografický test pro stanovení bakterie *Escherichia coli* dodávaný firmou Neogen.

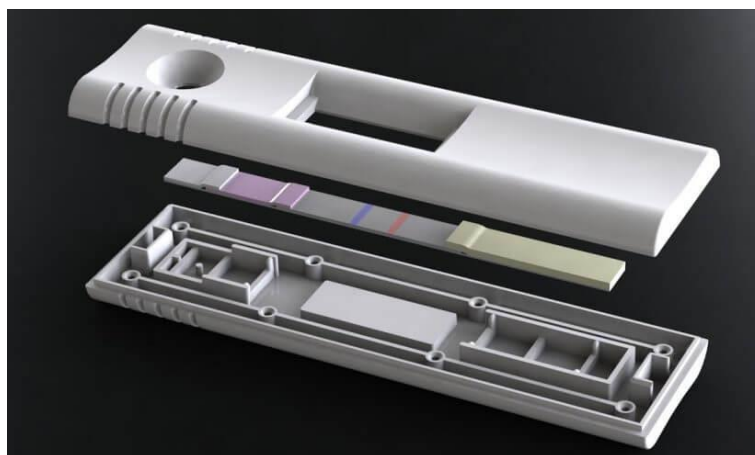


Obrázek 5: Ukázka stripového imunochromatografického testu: Reveal® 2.0 pro *E. coli* O157: H7 (převzato 18.7.2020 z webových stránek: <https://www.neogen.com/solutions/microbiology/reveal-2-e-coli-o157-h7/>)

### Kazetky

Sestávají se ze stripů vložených do krytu s otvory pro aplikaci vzorku a vyhodnocení testu (otvor pro testovací a kontrolní linii) (Göselová, 2014, Zhou, 2012). Tato konstrukce je patrná z obrázku 6.

Stejně jako stripy, jsou i kazetky přenosné, malé a lehké. Díky krytu mají vyšší odolnost, což je do značné míry výhodou (Qiu, 2011). Tyto kazetové formy jsou vhodné i pro konstrukci multiplexních testů (Göselová, 2014, Zhou, 2012).



Obrázek 6: Ukázka kazetového imunochromatografického testu (převzato 24.6.2020 z webových stránek Viro Research™: <https://viroresearch.com/mfg-lateral-flow-assays-1>)

### **Multiplexní testy**

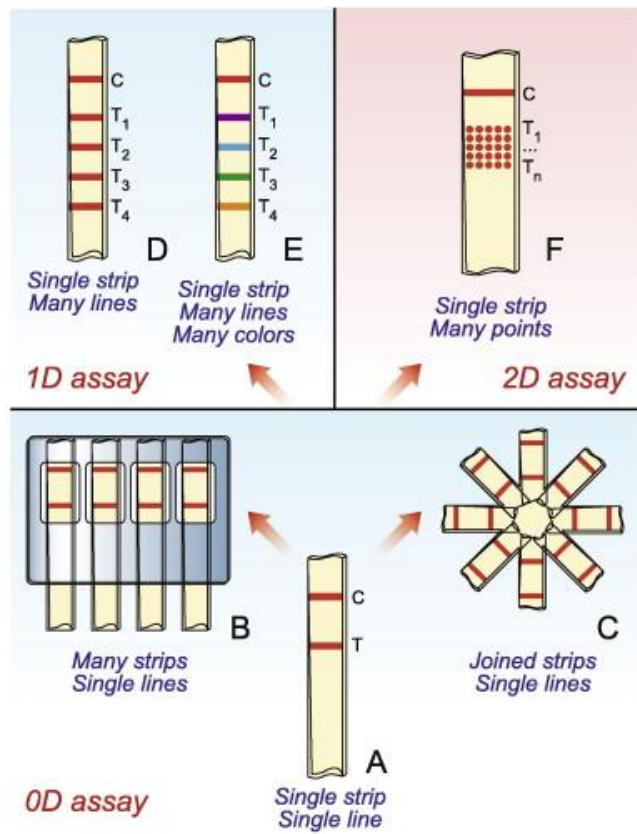
Multiplexní testy se používají pro detekci více než jednoho cílového druhu. Test se provádí na proužku, který obsahuje testovací linie, jejichž počet odpovídá počtu cílových druhů, které mají být analyzovány.

Uplatnění nachází například v klinické diagnostice, při detekci více analytů, které jsou vzájemně závislé a vypovídají o stádiu onemocnění. Multiplexní detekce sekvencí DNA se provádějí na miniaturizované verzi, která je založena na mikročipech.

Mezi výhody použití lze uvést nižší spotřebu testovacích činidel, s čímž se pojí nižší spotřební náklady. Dále menší objem vzorku a rizika infekce při odběru vzorků a rychlé stanovení výsledků multiplexního testu pouhým okem (Sajid, 2015, Tsai, 2019).

Na obrázku 7 jsou příklady jednotlivých formátů LFIA testů: jednoduchý jednoparametrový testovací proužek (A), jednoparametrové proužky ve formátu kazetky (B) a zařízení (disk) pro analýzu několika sloučenin současně (C), víceparametrové testovací proužky s několika testovacími zónami obsahujícími činidla s různou specificitou (D, E), multiplexní testovací proužky s dvourozměrným polem testovací zóny či více zón (F). Testovací zóny jsou označeny písmenem T, kontrolní zóny písmenem C (Dzantiev, 2014).





Obrázek 7: Různé formáty imunochromatografického testu (převzato z: Dzantiev, 2014)

## 5 VÝHODY A NEVÝHODY LFIA

Imunochromatografické testy mají nespočet výhod. Jednou z nich je rychlá analýza, díky níž získáme výsledky již během několika minut (Bahadır, 2016). Konvenční LFIA jsou obvykle kvalitativní a dávají odpovědi ano nebo ne (Sajid, 2015). Výsledek je obvykle jasný a snadno rozlišitelný. Na jeho vyhodnocení není zapotřebí žádné specifické vybavení, ani odborný personál (Koczula, 2016, Sajid, 2015). Ověření výsledků se provádí pomocí kontrolních testů nezávislé metody (Koczula, 2016).

Mezi další výhody lze zařadit jednoduchý postup, požadavek na nízký objem vzorku a nízké provozní náklady (Sajid, 2015). Vyšší náklady na realizaci s sebou nesou hodnocení kvantitativních dat z důvodu technologických vylepšení. Konkrétně se jedná o digitalizaci dat pomocí skenerů nebo kamer s vyhrazeným softwarem, který umožňuje i dokumentaci výsledků (Koczula, 2016).

I přes to, že jsou LFIA testy většinou kvalitativní a některé vzorky vyžadují předběžnou úpravu (zkapalnění, pomnožení), což může být časově náročné, jsou oblíbeny v analýze mnoha oborů (Sajid, 2015). Své uplatnění mají i v rozvojových zemích, a to především z důvodu dlouhé trvanlivosti a nenáročného skladování (Koczula, 2016).

## 6 DETEKCE KONTAMINANTŮ POTRAVIN

Nejen z důvodu vyššího zájmu veřejnosti o bezpečnost potravin se v posledních letech zvýšila výzkumná činnost zabývající se kontaminanty v potravě a jejich možnými následky na lidské zdraví (Sajid, 2015).

Kromě takových látek, jako jsou mykotoxiny, pesticidy, antibiotika a patogeny, roste potřeba detekovat konkrétní alergeny, druhově specifické markery (vepřové, hovězí) a geneticky modifikované sloučeniny v potravinách (Dzantiev, 2014).

### 6.1 Analýza potravin pomocí LFIA

V současné době se imunochromatografické testy považují za užitečný nástroj pro rychlý screening potravin a surovin (Dzantiev, 2014). Avšak LFIA testy používané pro analýzu potravin se liší vlastnostmi ve srovnání se systémy pro lékařské a veterinární aplikace (Raeisossadati, 2016). Důvodem je například charakter analyzovaných látek (mohou být nízkomolekulární a vysokomolekulární) (Dzantiev, 2014). Pro analýzu potravin je tedy nezbytný vývoj účinnějšího a citlivějšího analytického systému, aby byla zaručena bezpečnost, kvalita a sledovatelnost potravin (Raeisossadati, 2016).

Pomocí LFIA testů, které jsou nyní dostupné na trhu, lze detegovat bakterie rodu *Salmonella* a *Campylobacter*, dále *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*. Analýza těchto kontaminantů lze provést například ze vzorků vody, nápojů, mléčných výrobků, masa nebo zeleniny.

### 6.2 Studie zaměřené na detekci kontaminantů z potravin

Počet vědeckých článků v této oblasti ve spojení s imunochromatografií stále roste. Důvodem nárůstu vědecké činnosti jsou změny v maximálních povolených hodnotách řady kontaminantů a úpravy v seznamu kontrolovaných látek v potravinách (Dzantiev, 2014).

Tabulka 1 (pro lepší přehlednost na samostatné straně) představuje studie zabývající se detekcí patogenních bakterií (především z potravin) pomocí LFIA. Nejčastěji používanou značkou jsou v těchto studiích zlaté nanočástice (GNPs). Využití GNPs lze kombinovat s imunomagnetickými částicemi (IMPs) nebo kyselinou chlorozlatitou ( $\text{HAuCl}_4$ ). Dalšími používanými značkami jsou fluorescein isothiokyanát (FITC) a up-konverzní fosforové nanočástice (UCPs).

Tabulka 1: Přehled studií zabývajících se detekcí potravinových patogenních bakterií pomocí imunochromatografických testů (převzato, upraveno a zkráceno z: Luo, 2018)

ZNAČKA	ANALYT	VZOREK	CÍLOVÉ BAKTERIE	DETEKČNÍ LIMIT	STUDIE
GNPs	celá buňka	syrové hovězí maso	<i>E. coli</i> O157:H7	1,8 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml	Jung et al., 2005
GNPs + IMPs	celá buňka	masné výrobky, ryby	<i>L. monocytogenes</i>	1 x 10 <sup>2</sup> CFU/10 g	Shim et al., 2008
GNPs + IMPs	celá buňka	voda, mléko, hovězí maso	<i>E. coli</i> O157:H7	1 x 10 <sup>3</sup> CFU/ml	Qi et al., 2011
GNPs	celá buňka	mléko	<i>S. typhimurium</i>	10 <sup>2</sup> buněk	Pandey et al., 2012
GNPs	celá buňka	mořské plody	<i>V. cholerae</i> O139	1 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml	Pengsuk et al., 2013
GNPs	celá buňka	masné výrobky, zelenina	<i>S. typhimurium</i>	2,3 x 10 <sup>3</sup> CFU/ml	Yonekita et al., 2013
GNPs	celá buňka	voda	<i>S. typhi</i>	1 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml	Singh et al., 2015
GNPs + HAuCl <sub>4</sub>	celá buňka	mléko	<i>E. coli</i> O157:H7	5 x 10 <sup>3</sup> CFU/ml	Wang et al., 2015
GNPs	celá buňka	chléb, mléko, želé	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. boydii</i>	1 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Song et al., 2016a
GNPs	celá buňka	mléko	<i>L. monocytogenes</i>	3,7 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Wang et al., 2017
GNPs	celá buňka	hlávkový salát	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. typhimurium</i>	1,87 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml	Shin et al., 2017
GNPs + HAuCl <sub>4</sub>	celá buňka	mléko	<i>S. enteritidis</i>	1 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml	Bu et al., 2018
IMPs	celá buňka	potravinové vzorky	<i>L. monocytogenes</i>	1 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml	Shi et al., 2015
IMPs	celá buňka	krevety, škeble	<i>V. parahaemolyticus</i>	1 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml	Yan et al., 2014
IMPs	celá buňka	hlávkový salát, mléko, maso, klobása	<i>E. coli</i> O157:H7	30-300 CFU/ml	Suaifan et al., 2017a
IMPs	celá buňka	mléčné výrobky	<i>B. anthracis</i>	5 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml	Fisher et al., 2009
IMPs	celá buňka	mořské plody	<i>V. parahaemolyticus</i>	1,58 x 10 <sup>2</sup> CFU/ml	Liu et al., 2015
UCPs	celá buňka	279 vzorků jídla	10 epidemických potravinových patogenů	1 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml až 1 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml	Zhao et al., 2016
FITC	celá buňka	chléb, mléko, želé	<i>E. coli</i> O157:H7	1 x 10 <sup>0</sup> CFU/ml	Song et al., 2016b

### 6.3 Komerční soupravy

Před uvedením komerčních souprav na trh dochází k jejich pečlivému testování a validaci. Důležitá je podrobná optimalizace testovacích kroků, materiálu, zařízení a odečtení výsledků.

Diagnostické poradenské sítě DCN (Diagnostic consulting networks) poskytují imunochromatografické testovací proužky pro aplikace v lékařské, veterinární a spotřebitelské diagnostice, testování potravin a nápojů, životního prostředí a zemědělství (Sajid, 2015).

Mezi firmy dodávající komerční soupravy se řadí například Neogen: řada Reveal<sup>®</sup> pro stanovení *Listeria*, *Salmonella* a *Escherichia coli* O157, BioControl Systems: VIP<sup>®</sup> GOLD<sup>™</sup> pro stanovení *Listeria*, *Salmonella* a *Escherichia coli* a DuPont Qualicon: DuPont<sup>™</sup> Lateral Flow System pro stanovení *Listeria* (Law, 2015) *Salmonella*, *Campylobacter* a *Escherichia coli* O157 (Luo, 2018). Další firmy dodávající na trh komerční soupravy jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: **Komerční soupravy s imunochromatografickou detekcí** (převzato, zkráceno a upraveno z: Dzantiev, 2014)

SPOLEČNOST	ZEMĚ	TYP SYSTÉMU	DETEGOVANÉ LÁTKY
Beijing Kwinbon Biotechnology	Čína	Testovací proužky	$\beta$ -laktakty, sulfonamidy, ractopamin, klenbuterol, melamin, patogeny ( <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7)
Charm Sciences	USA	Testovací proužky	Antibiotika, sulfonamidy, aflatoxin M1
EnviroLogix	USA	Testovací proužky	Mykotoxiny, GMO, patogeny ( <i>Botrytis cinerea</i> )
Merck KGaA / EMD Chemicals	USA	Testovací proužky	Patogeny ( <i>E. coli</i> O157: H7, <i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> )
New Horizons Diagnostic	USA	Testovací proužky	Patogeny ( <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> O157:H7), toxin botulismu
Nippon Meat Packers	Japonsko	Testovací proužky	Patogeny ( <i>E. coli</i> O157, O26, O111, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> )
Quicking Biotech	Čína	Testovací proužky	Antibiotika, veterinární léčiva, mykotoxiny, patogeny ( <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> ), melamin
Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology	Čína	Testovací proužky	Antibiotika, veterinární léčiva, mykotoxiny, melamin
Unisensor	Belgie	Testovací proužky	Antibiotika, sulfonamidy, mykotoxiny, melamin
Ubio Biotechnology Systems	Indie	Testovací proužky	Mykotoxiny, patogeny ( <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>V. parahemolyticus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Shigella</i> ), GMO

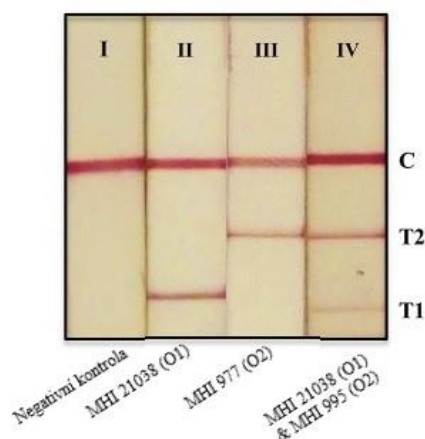
### 6.4 Víceparametrové testovací proužky

Multiplexní testy mohou být různého formátu. Jedním z nich je testovací proužek s větším počtem vzájemně oddělených detekčních míst. Tento formát s několika testovacími liniemi na jednom imunochromatografickém proužku je oblíben především s použitím zlatých nanočástic, dále kvantových teček nebo barevných či fluorescenčních nanočástic. Využití má zejména pro současnou detekci kontaminantů potravin (Anfossi, 2018).

Současné studie se zabývají vývojem imunochromatografických multiplexních testů například pro detekci a diferenciaci sérotypů O1 a O2 *Cronobacter sakazakii* (Scharinger, 2017).

Všudypřítomný a oportunní patogen *Cronobacter sakazakii*, dříve známý jako *Enterobacter sakazakii*, je zodpovědný za sepse, nekrotizující enterokolitidu, bakteriémie a těžkou meningitidu, která vede v 40–80 % k úmrtnosti (Scharinger, 2017, Blažková, 2011). Onemocnění postihují lidi všech věkových kategorií, avšak největším ohrožením jsou pro kojence a imunodeficitní jedince (Norberg, 2012).

Test je založen na dvou monoklonálních protilátkách, které se specificky váží na lipopolysacharidy těchto patogenů. V současné době je u *C. sakazakii* známo pět sérotypů O1 až O4 a O7. Multiplexní testovací proužek umožňuje detekci sérotypu O1 a O2 *C. sakazakii* současně. Tyto dva sérotypy jsou převážně izolovány z klinických a potravinářských produktů (Scharinger, 2017). Detekce pomocí imunostripu byla dle Blažkové et al. použita na analýzu vzorků práškové kojenecké výživy kontaminované méně než 10 buňkami *Cronobacter* spp. na 10 g. Výsledky vycházející z této analýzy naznačují absolutní shodu s výsledky standardních mikrobiologických metod. Test s použitím koloidních uhlíkových nanočástic jako indikátoru umožňuje vizuální detekci *C. sakazakii* během 10 minut (Blažková, 2011). Obrázek 8 představuje výslednou podobu imunochromatografického testu pro stanovení sérotypu *C. sakazakii* z kojenecké výživy.



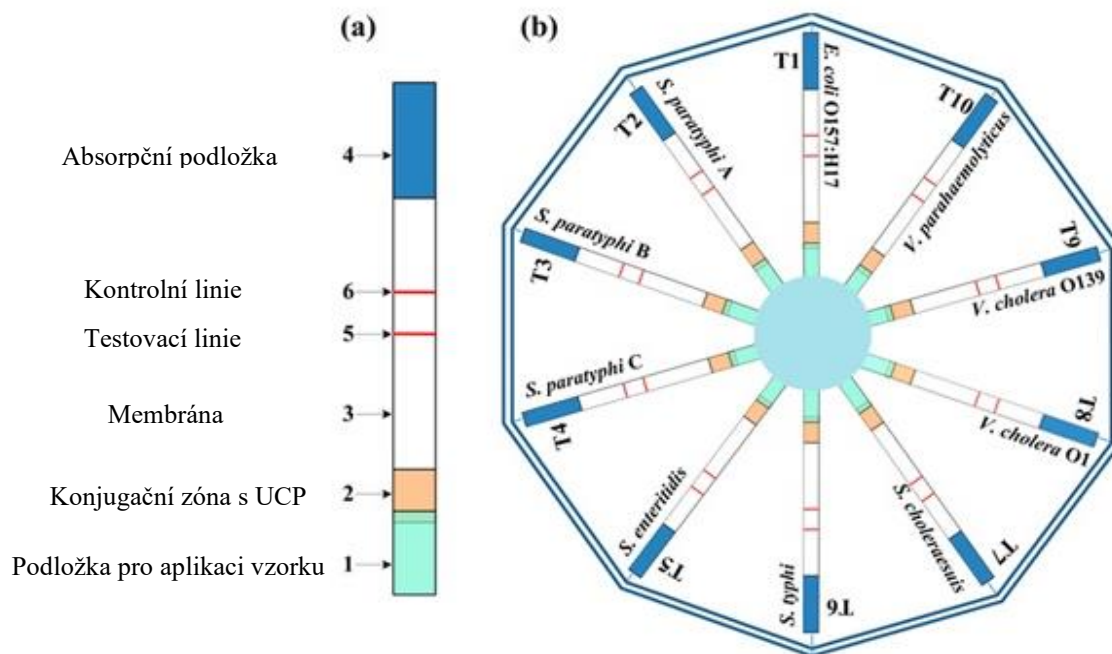
Obrázek 8: **Imunochromatografický test pro detekci *C. sakazakii* ze vzorku kojenecké výživy:** I, negativní kontrola (pouze jedna červená čára v kontrolní linii); II a III, pozitivní pro sérotypy O1 a O2 *C. sakazakii* (dvě červené čáry: kontrolní linie a testovací linie 1 nebo testovací linie 2); IV, pozitivní na oba sérotypy *C. sakazakii* O1 a O2 (tři červené linie: kontrolní linie a dvě testovací linie 1 a 2). C, kontrolní linie; T1 a T2, testovací linie 1 a 2. (Převzato a upraveno z: Scharinger, 2017)

#### 6.4.1 Disky pro stanovení více druhů sloučenin

Disk se skládá z několika proužků, které mají společné místo pro aplikaci vzorku. Dochází tedy k distribuci jednoho vzorku mezi jednotlivé proužky, které mohou mít jednu nebo více testovacích linií (Anfossi, 2018).

Návrh na simultánní detekci 10 různých protilátek pomocí 10kanálového imunochromatografického testu značeného UCP nanočásticemi (TC-UPT-LF, 10-channel up-converting phosphor technology-based lateral flow) přednesl Hong et al. (2010) (Anfossi, 2018). Test na základě sendvičového uspořádání, s dvojitým antigenem, sloužil pro detekci protilátek proti *Yersinia pestis*. Vyhodnocení testu bylo provedeno kvantitativně pomocí biosenzoru se skenovací funkcí (Hong, 2010).

Na detekci 10 různých potravinářských patogenů se zaměřila studie od Zhao et al. (2016) s využitím TC-UPT-LF. Opět se jedná o disk složený z 10 proužků, což je možné pozorovat na obrázku 9 (b) a vyhodnocení se provádí kvantitativní detekcí. Slouží k analýze vzorků potravin a vody, respektive k detekci jejich patogenů. Nejčastější potravinové bakteriální patogeny jsou *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* O1 a *V. cholerae* O139 (Zhao, 2016).



Obrázek 9: **10kanálový imunochromatografický multiplexní test TC-UPT-LF** značený upkonverzními fosforovými nanočásticemi s 10 detekčními kanály (T1 až T10), které jsou součástí proužků příslušných pro cílové bakterie (převzato a upraveno z: Zhao, 2016)



## 7 POTRAVINOVÉ PATOGENY

Onemocnění způsobená původci přítomnými v potravinách, představují vážné zdravotní riziko pro rozvojové i rozvinuté země (Zhao, 2016). Běžnými potravinovými patogeny, které jsou odpovědné za většinu chorob (v souvislosti s nákazou z potravin), jsou *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* a *Escherichia coli* produkující Shiga toxin (Law, 2015). Toto je představeno na obrázku 10.

**Přehled nejzávažnějších bakteriálních onemocnění z potravin**

Bakterie	Hlavní zdroje	Čím se přenáší	Typické příznaky onemocnění
<i>Campylobacter jejuni</i>	Střevní trakt zvířat a ptáků, syrové mléko, odpadní vody	Syrové mléko, málo tepelně opracovaná drůbež, maso	Horečka, bolest hlavy a svalů, následuje bolení břicha, průjem, někdy krev ve stolici a zvracení. Příznaky se objeví po 2–5 dnech, mohou trvat až 7–10 dní
<i>Escherichia coli</i> O157	Střevní trakt některých savců, zejména dobytka	Kontaminovaná voda, syrové mléko, syrové hovězí a mleté maso, nepasterovaná jablečná šťáva, syrová zelenina	Průjem nebo průjem s krví, křeče v břiše, nevolnost, malátnost. Příznaky po 2–5 dnech, trvají asi týden; u malých dětí může dojít k selhání ledvin (tzv. syndrom HUS)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Střevní trakt zvířat a lidí, půda, syrové mléko, siláž	Listová i mražená zelenina, měkké zrající sýry, uzený losos, lahůdky, syrové maso	Příznaky podobné chřipkovým, někdy také bolest břicha, pocit na zvracení, průjem; u komplikovaných případů postupně postižení nervového systému, meningitida nebo sepse, končí i úmrtím. U těhotných žen může dojít k potratu nebo infekci plodu. Příznaky po 3 dnech až několika týdnech po nákaze
<i>Salmonella</i>	Střevní trakt zvířat a ptáků, kloaka, vejce	Syrová a nedovařená vejce, drůbež, výrobky ze syrového mléka, ryby, bacilonosiči	Bolení břicha (žaludku), průjem, zvracení, zimnice, horečka, bolest hlavy. Příznaky po 8 hodinách až 3 dnech, trvají několik dní. Bacilonosičství bezpříznakové
<i>Staphylococcus aureus</i>	Povrch kůže a sliznic, infikované a hnisající rány, záněty vemene	Syrové mléko, nakažené osoby; onemocnění způsobuje toxin uvolněný z buněk	Prudká nevolnost, křeče v břiše, zvracení a průjem. Příznaky se objeví již po 1–6 hodinách, vymizí během 2–3 dnů

Obrázek 10: **Přehled nejzávažnějších bakteriálních onemocnění z potravin** (převzato z: Vladimír Špelina, 2007)

### 7.1 Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae (enterobakterie) jsou gramnegativní tyčinky (Singh, 2015). Existuje více než 30 rodů a 120 druhů. Téměř všechny jsou fakultativně anaerobní, oxidáza negativní a fermentují glukózu. Enterobakterie se pohybují pomocí peritrichálních bičků, výjimkou jsou *Shigella* a *Klebsiella*, které jsou nepohyblivé (Rock, 2014).

Některé druhy enterobakterií mohou způsobovat infekce gastrointestinálního traktu, a proto se označují jako enterické. Tabulka 3 uvádí rod a druh nejběžnějších lidských patogenů z čeledi enterobakterií (Rock, 2014).

Tabulka 3: **Nejběžnější lidské patogeny čeledi Enterobacteriaceae** (převzato a upraveno z: Rock, 2014)

ROD	DRUH	ROD	DRUH
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>
	<i>koseri</i>		<i>vulgaris</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
	<i>aerogenes</i>	<i>Shigella</i>	<i>dysenterii</i>
	<i>sakasakii</i>		<i>flexneri</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		<i>sonnei</i>
	<i>albertii</i>	<i>boydii</i>	
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i>
	<i>oxytoca</i>		<i>enterocolitica</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>		<i>pseudotuberculosis</i>

Jejich přirozeným prostředím je střevní trakt lidí a zvířat. Přenos enterobakterií je prostřednictvím kontaminované vody a jídla. Dle Světové zdravotnické organizace WHO asi 1,1 miliardy lidí na celém světě pije nebezpečnou (kontaminovanou) vodu, což způsobuje v kombinaci s nedostatečnou hygienou přibližně 88 % průjmových onemocnění. Svůj podíl mají také kontaminované potraviny, a to zejména pro velké populace v rozvojových zemích.

K výskytu potravinových a vodou přenášených chorob v současné době přispívá několik faktorů. Mezi některé z nich patří změny v demografii a chování lidí, mezinárodní cestování, nedostatek kanalizací, špatná hygiena a nízká úroveň vzdělání. Aby se zabránilo vypuknutí nemocí, je nezbytné sledovat kvalitu potravin a vody. Na toto téma je zaměřena kapitola 7.1.1 (Singh, 2015).

### 7.1.1 Detekce Enterobacteriaceae pomocí LFIA

Se vznikem a vývojem proužků LFIA se detekce patogenních bakterií stala snadnější a rychlejší. Pro detekci bakteriálních patogenů jsou odebírány vzorky (matrice), jako je plazma či sérum, výkaly (stolice), vzorky potravin a vody (Singh, 2015). Kontrola potravin a vody je nezbytná pro zajištění bezpečnosti potravin a minimalizaci výskytu patogenů v potravinách a ve vodě (Zhao, 2016).

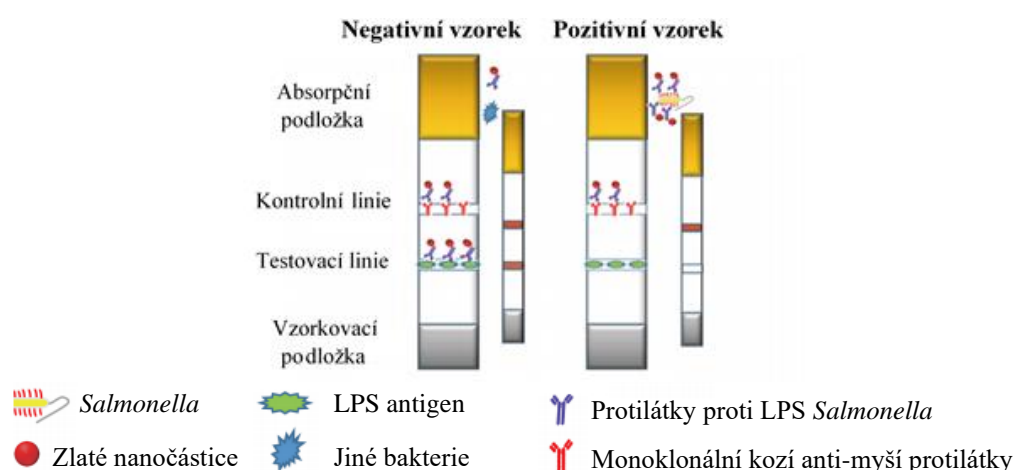
V kompetitivním uspořádání se imunochromatografické testy používají k analýze toxinů, neboť se jedná o sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (Raeisossadati, 2016). Detekce celých

mikroorganismů je také možná a provádí se pomocí imunochromatografických stripových testů založených na detekci celé bakteriální buňky, tzv. WCLFSA (Whole cell-based lateral flow strip assay). Avšak je třeba brát v potaz, že velikostně jsou bakterie oproti toxinům větší, což je potřeba zohlednit především při výběru membrány. Je třeba zvolit membránu o vhodné pórovitosti, v kombinaci s vyhovující povrchovou úpravou pro usnadnění migrace mikroorganismů (Luo, 2018).

### 7.1.1.1 *Salmonella* spp.

Salmonely jsou hlavními potravinovými patogeny pro zvířata a lidi, neboť jsou příčinou akutních infekcí trávicího traktu (Mei, 2019, Zhao, 2016). Mezi běžné sérotypy salmonel, které mohou způsobit onemocnění v souvislosti s potravinami, patří *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. paratyphi* C a *S. choleraesuis*. Tyto patogeny mohou existovat (a obvykle i koexistovat) v různých potravinách, jako jsou syrové nebo nedostatečně uvařené potraviny (maso, mořské plody, drůbež atd.) a výrobky určené k přímé konzumaci (zelenina, ovoce, mléčné výrobky atd.) (Zhao, 2016).

Imunochromatografické testy pro detekci salmonel jsou obvykle sendvičového uspořádání, avšak pro malé analyty lze použít také uspořádání kompetitivní (Çam, D., 2019). Kompetitivní uspořádání se využívá k sérotypizaci salmonel na základě (tělových) O a (bičkových) H antigenů. Tělový O antigen je tvořen lipopolysacharidy (LPS) a k jeho detekci se využívají zlatem značené proti lipopolysacharidu (Wang, 2016). Princip imunochromatografického proužku pro detekci *Salmonella* spp. je znázorněn na obrázku 11.

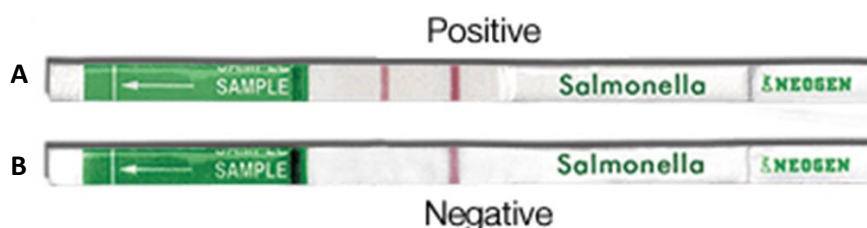


Obrázek 11: Princip imunochromatografického proužku s kompetitivním uspořádáním pro detekci *Salmonella* spp. (převzato a upraveno z: Wang, 2016)

Testy LFIA na bázi Abs pro rozpoznávání salmonel vyžadují v první řadě konjugaci cílově specifických Abs se značkou (nejčastěji GNP). Tento proces probíhá chemickou nebo fyzikální adsorpcí za optimální hodnoty pH (například použitím uhličitanu draselného a kyseliny chlorovodíkové). Dalším krokem je imobilizace Abs na nitrocelulózovou membránu a poté příprava podložek (pro aplikaci vzorku, absorpční) a pufrů. Specifičnost a selektivita imunochromatografického testu závisí na afinitě použitých Abs. Použití Abs s vysokou afinitou zvyšuje citlivost a snižuje limit detekce (LOD) a nespecifické interakce s různými antigeny (Çam, D., 2019).

Studie Çam et al. (2019) popisuje vývoj LFIA testu pro detekci salmonel z potravin. Využívá proužky široké 0,4 cm s ručně umístěnými komponentami (podložka pro aplikaci vzorku a absorpční podložka) i reagensy (v požadovaných koncentracích pomocí pipety) na zachytné zóny nitrocelulózové membrány. Konjugace Abs byla pomocí GNPs o velikosti 36 nm. Aplikace vzorku na vzorkovací podložku byla provedena buď napipetováním 100 µl vzorku nebo ponořením proužku do eppendorfových zkumavek obsahujících 200 a 500 µl čerstvého kultivovaného vzorku. Závěrem studie bylo stanovení limitu detekce (LOD) zachycených buněk salmonely. Tento limit činí  $5 \times 10^5$  buněk na 100 µl, což je dostatečná hodnota pro detekci gastroenteritidy u lidí způsobené *S. typhimurium* (Çam, D., 2019).

Test Reveal® 2.0 (firma Neogen) je komerčně vyráběný testovací proužek sendvičového uspořádání určený ke stanovení *Salmonella* spp. například z kuřecího masa, syrového krůtího a hovězího masa, zmrzliny, arašídového másla. K detekci je zapotřebí 200 µl vzorku obohaceného médiem Rappaport-Vassiliadis, které zvýhodňuje růst salmonel. Konjugační zóna obsahuje specifické protilátky proti *Salmonella* spp. značené částicemi koloidního zlata. V případě pozitivního výsledku dochází k vytvoření dvou linií (obrázek 12 A), naopak negativní výsledek je charakterizován pouze jednou linií (obrázek 12 B) (Neogen, 2019).



Obrázek 12: Ukázka stripového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci *Salmonella* spp. (převzato 18.7.2020 z webových stránek Neogen: <https://www.neogen.com/solutions/microbiology/reveal-2-salmonella/>)

### 7.1.1.2 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie obecně zahrnují *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* a *Citrobacter* (Paradh, 2015). Jedná se převážně o fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčky, které netvoří spory (Halkman, 2014). Jsou schopné využívat laktózu s tvorbou plynů a kyselin při 35–37 °C během 24 nebo 48 hodin (Paradh, 2015, Halkman, 2014). Koliformní bakterie jsou považovány za indikátory znečištění a hygieny, neboť jejich přítomnost ve vodě a v potravinách může být následkem nedodržení hygienických podmínek. Zkoumání potravinového výrobku z hlediska indikátorových mikroorganismů může poskytnout jednoduché, spolehlivé a rychlé informace o obecné úrovni hygieny, dále o selhání zpracování a kontaminaci z životního prostředí po zpracování daného potravinářského výrobku (Halkman, 2014).

Koliformní bakterie jsou detegovány v celé řadě potravin, jako jsou pečivo, masa a hotová jídla. Rychlost růstu koliformních bakterií je v širokém teplotním rozmezí (od nízkých až po střední teploty). Jakmile jejich počet dosáhne určité úrovně, dochází ke snížení trvanlivosti potravin. Proto jsou koliformní bakterie v této souvislosti považovány za ukazatele kvality potravin (Tominaga, 2019).

Na detekci koliformních bakterií, jako jsou *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Serratia* a *Klebsiella* či *Raoultella*, se zaměřil ve své studii Tominaga (2019). Princip detekce spočívá v navázání bakteriální buňky ze vzorků masa na protilátky značené kovovým koloidem (GNP). Protilátky jsou polyklonálního charakteru a byly získány imunizací králíků (intravenózní injekcí  $5 \times 10^8$  buněk na dávku). Příprava IgG frakcí z odebraných sér byla prováděna s použitím imobilizovaného proteinu A. Poté následovala úprava pufrem a pufovacím roztokem. Získané polyklonální protilátky značené GNP sloužily jako detekční protilátky po smíchání s buňkami ze vzorku. Před samotnou aplikací vzorku byly bakterie získané odstředěním z kultivačního roztoku promyty (v 0,85 % NaCl) a zahřívány po dobu 15 minut při 100 °C. Popsaný test byl vhodný pro detekci bakterií při výrobě potravin a zároveň i zajištění jejich bezpečnost (Tominaga, 2019).

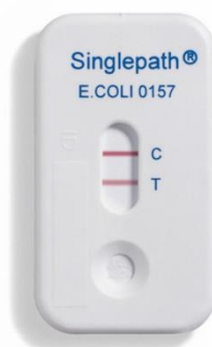
Imunochromatografickou detekcí *Escherichia coli* O157 se zabýval Jung et al. (Yan, 2006). V této studii se ukázalo, že detekční limit pro *Escherichia coli* O157 bez obohacení GNP byl  $1,8 \times 10^5$  CFU/ml a po obohacení činil 1,8 CFU/ml. Wang et al. (2015) provedli studii věnující se detekci *E. coli* O157 pomocí sendvičového imunochromatografického proužku. Test provedený s různými vzorky potravin (sušené mléko, mouka, škrob, káva, sušenka, koláč, želé a šťáva) vykazoval citlivost  $1 \times 10^5$  CFU/ml (Law, 2015).

Studie Ching et al. (2015) se zaměřila na detekci Shiga toxinu (Stxs) produkovaného *E. coli*. Nákazy v důsledku kontaminace potravin Stxs jsou často způsobeny konzumací nedovařeného mletého hovězího masa, mléčných výrobků nebo kontaminovanou vodou (kontaminace listové zeleniny). Detekce Stx byla provedena pomocí dvojice monoklonálních protilátek (konjugace GNP), které se vážaly na epitopy společné pro Stx1 a šest Stx2 variant. Stx1 je spojován s mírnými klinickými příznaky, zatímco varianty Stx2 jsou spojeny s vážnějšími chorobami (hemoragická kolitida, hemolytický uremický syndrom). Detekční limit tohoto testu činil 0,1 ng/ml pro Stx2a (Ching, 2015).

## 7.2 Komerční soupravy pro detekci bakterií rodu *Escherichia*

Merck KGaA dodává na trh LFIA soupravy pro detekci patogenů ze vzorků potravin. Testy využívají protilátky specifické pro cílový analyt, k jejichž značení se využívá nejčastěji koloidní zlato. Každé zařízení je samostatným testem, který vyžaduje pouze přidání vzorku, což z něj činí jednoduchou metodu poskytující jasné výsledky (přítomnost či nepřítomnost bakterie ve vzorku) během 20 minut (Merck KGaA, 2020).

SINGLEPATH®, jež je uveden na obrázku 13, se používá pro detekci *E. coli* O157 (včetně O157:H7) z různých potravin (například syrové mleté hovězí maso a pasterované plnotučné mléko). Nejnižší dosažený detekční limit je 25 CFU/g (případně ml) vzorku potravy (Merck KGaA, 2020).



Obrázek 13: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci *Escherichia coli* (převzato 14.7.2020 z webových stránek Merck KGaA: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/104141?lang=en&region=CZ>)

Souprava DUOPATH® STEC, kterou představuje obrázek 14, slouží k detekci Shiga toxinu v potravinách (Merck KGaA, 2020).



Obrázek 14: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci Shiga toxinu produkovaného *Escherichia coli* (převzato 14.7.2020 z webových stránek Merck KGaA: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/104156?lang=en&region=CZ>)

#### 7.2.1.1 *Yersinia*

*Yersinia* je invazivní gastrointestinální patogen, která může infiltrovat střevní výstelku a vstoupit do lymfatického systému a krve (Actor, 2012). *Yersinia enterocolitica* způsobuje yersiniózu, nemoc charakterizovanou průjmem a záněty trávicího traktu. Přenos je fekálně-orální cestou, konzumací kontaminované potraviny nebo vody.

Detekce tohoto patogenu v potravinách je náročná. Příčinou je podobnost s jinými enterickými bakteriemi, popřípadě přítomnost dalších mikroorganismů ve vzorcích potravin a pomalý růst (Gupta, 2015).

### 7.3 Clostridiaceae

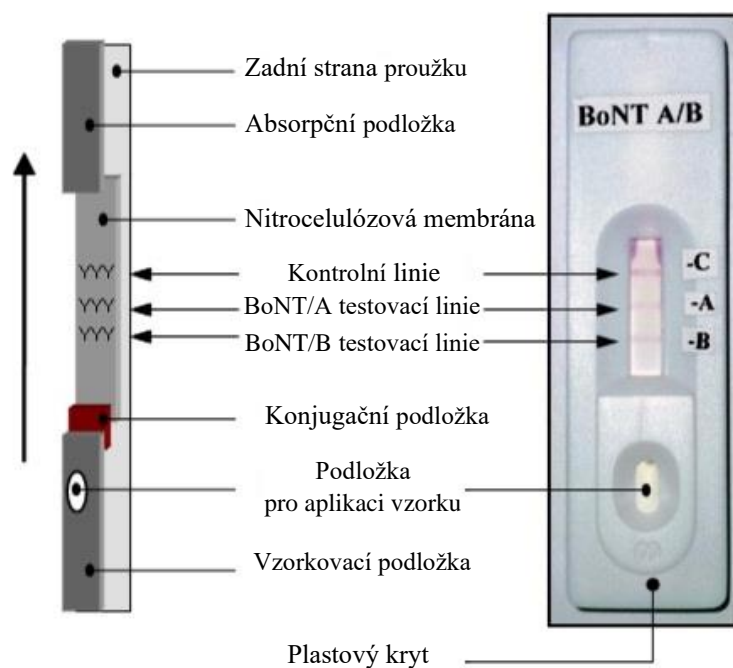
Bakterie této čeledi jsou grampozitivní anaerobní tyčinky, které jsou ve vegetativní fázi pohyblivé. Vytvářejí spory a vylučují silné exotoxiny odpovědné za choroby, mezi které patří tetanus, botulismus a plynová gangréna (sněť). Klinicky významné druhy jsou: *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens* a *C. difficile* (Actor, 2012).

*Clostridium perfringens* je patogenním původcem onemocnění gastrointestinálního traktu člověka, jako je otrava jídlem, průjem spojený s antibiotiky a ojedinělé průjmy (nozokomiální průjmy) (Kaneko, 2011). Může produkovat různé druhy toxinů, pomocí nichž se klasifikují (Dave, 2017). Nejvýznamnější toxin produkovaný touto bakterií je enterotoxin *Clostridium perfringens* (CPE), který způsobuje onemocnění gastrointestinálního traktu. (Kaneko, 2011).

Dalším zástupcem je *C. botulinum*, jež produkuje jeden z nejsilnějších neurotoxinů botulinum neurotoxin (BoNT). BoNTs jsou rozděleny do sedmi typů (A-G). Přírodně se vyskytující toxiny přenášené potravinami (nejčastěji jako důsledek nesprávného konzervování potravin) působí tak, že inhibují uvolňování acetylcholinu. Následkem otravy (botulismu) pak může být rozmazané vidění, svalová slabost až paralýza končící smrtí (Actor, 2012, Ching, 2012, Sajid, 2015).

#### 7.4 Detekce bakterií rodu *Clostridium* pomocí LFIA

Asi 80 % nemocí je způsobeno otravou BoNT/A, BoNT/B obsaženého v mléce a jablečné šťávě. Vysoce citlivá LFIA byla navržena tak, aby detegovala a rozlišovala tyto toxiny (BoNT A / B) (Sajid, 2015). Konstrukce LFIA sestává z nitrocelulózové membrány, na kterou jsou imobilizovány anti-myší IgG v kontrolní linii a sérotypově specifické záchytné protilátky *C. botulinum* (BoNT / A a BoNT / B) v testovací linii. Podložka pro aplikaci vzorku překrývá konjugační podložku obsahující imobilizovanou anti-BoNT protilátku konjugovanou s GNP (Ching, 2012). Na druhém konci membrány je absorpční podložka, která slouží k usnadnění kapilárního proudění zařízením a zachycení přebytku tekutiny (Ching, 2012, Banerjee, 2018). Celé zařízení je uloženo v kazetkovém plastovém krytu (Ching, 2012). Test je sendvičového uspořádání a přítomnost toxinu vede ke vzniku dvou červených čar (v testovací i kontrolní linii). Konstrukci LFIA testu pro detekci BoNT představuje obrázek 15.



Obrázek 15: Konstrukce imunochromatografického testu pro detekci toxinu botulinum neurotoxin (převzato a upraveno z: Zhao, 2016)



## 7.5 Listeriaceae

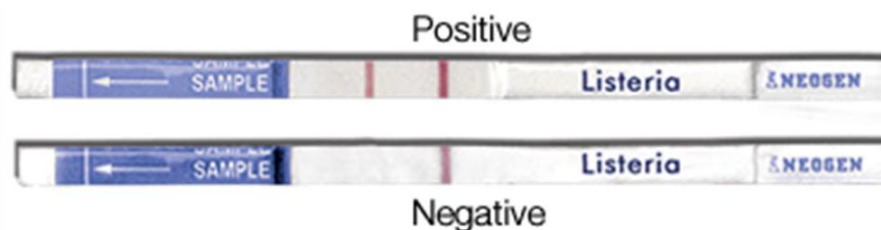
Pro člověka jsou významné patogenní listerie (*Listeria* spp.) *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* (Actor, 2012). Požití *Listeria* z nepasterizovaných mléčných výrobků může vést k bakteriémii a septikémii s meningoencefalitidou (Actor, 2012).

*L. monocytogenes* je všudypřítomná malá psychrotrofní grampozitivní aerobní nebo fakultativní anaerobní tyčinková bakterie. Onemocnění, jež způsobuje, se nazývá listerióza a představuje riziko zejména pro imunosuprimované osoby a novorozence (Einer, 2006). Vyskytuje se prakticky ve všech potravinách určených k přímé spotřebě, v masných výrobcích (párky, slanina, klobása, vařená šunka atd.) Inaktivace *L. monocytogenes* je vařením při 72 °C, ale balení a krájení může způsobit opětou kontaminaci (Einer, 2006).

### 7.5.1 Detekce bakterií rodu *Listeria* pomocí LFIA

Pro přesnou detekci *Listeria monocytogenes* lze využít sendvičový kvantitativní test LFIA se superparamagnetickými částicemi. K zachycení cílových bakterií jsou monoklonální protilátky značeny superparamagnetickými částicemi, zatímco druhá protilátka je imobilizována v detekční zóně. Po 20minutové reakci se proužky analyzují přístrojem vhodným pro detekci magnetického signálu imunokomplexu v magnetickém poli. Hodnocení citlivosti ukázalo, že mez detekce (LOD) superparamagnetického systému LFIA pro *L. monocytogenes* byla  $10^4$  CFU / ml (Shi, 2015).

Stripový imunochromatografický test Reveal® 2.0 dodávaný firmou Neogen, pro detekci *Listeria* spp. ze vzorků potravin nebo životního prostředí, je na obrázku 16. Ke stanovení je použito 200 µl vzorku (pokojové teploty) obohaceného bujónem pro selektivní růst bakterií rodu *Listeria*. Test se následně vloží do předem připraveného vzorku a nechá se vyvíjet při okolní teplotě po dobu 20 minut. Test využívá protilátek značených zlatými nanočásticemi (Neogen, 2019).



Obrázek 16: Ukázka kazetového komerčně dodávaného stripového imunochromatografického testu pro detekci *Listeria* spp. (převzato 18.7.2020 z webových stránek Neogen Corporation: <https://www.neogen.com/solutions/microbiology/reveal-2-listeria/>)

Soupravy SINGLEPATH® L'mono dodávané firmou Merck KGaA, viditelné na obrázku 17, jsou screeningové testy prokazující přítomnost *Listeria monocytogenes* v potravinách. Test je založený na protilátkách značených zlatem, spodní mez detekce je  $5 \times 10^6$  bakterií/ml (v závislosti na sérotypu) (Merck KGaA, 2020).



Obrázek 17: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci *Listeria monocytogenes* (převzato 14.7.2020 z webových stránek Merck KGaA: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/104148?lang=en&region=CZ>)

## 7.6 Campylobacteraceae

*Campylobacter* jsou aerobní gramnegativní zakřivené bakterie. Od jiných patogenů přenášených potravinami se odlišují tím, že se v potravě nereprodukují (Raeisossadati, 2016).

*Campylobacter jejuni* způsobuje gastroenteritidu a obvykle se získává konzumací nedokonale upraveného jídla nebo pitím kontaminovaného mléka či vody. Příznaky infekce jsou horečka, křeče a hemoragický průjem (způsoben průnikem bakterie do sliznice tenkého střeva) (Actor, 2012).

### 7.6.1 Detekce bakterií rodu *Campylobacter* pomocí LFIA

Studie Xu et al. (2013) byla zaměřena na vývoj imunochromatografického proužkového testu pro detekci *Campylobacter jejuni*. Test sendvičového formátu s fluorescenčními nanočásticemi vykazoval detekční limit  $10^6$  CFU/ml (Woan-Fei, 2015).

Komerčně dodávané imunochromatografické testy (Singlepath® *Campylobacter*) od firmy Merck KGaA slouží pro detekci *Campylobacter*. Protilátky značené zlatem jsou specifické pro cílový antigen. Souprava sendvičového uspořádání zajišťují jednoduché a pohodlné stanovení do 20 minut (Merck KGaA, 2020). Podobu této komerčně dodávané soupravy představuje obrázek 18.



Obrázek 18: Ukázka kazetového komerčně dodávaného imunochromatografického testu pro detekci *Campylobacter* (převzato 14.7.2020 z webových stránek Merck KGaA: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/104143?lang=en&region=CZ>)

## 7.7 Vibrionaceae

Rod *Vibrio* obsahuje pohyblivé, gramnegativní tyčinky, které jsou fakultativně anaerobní. Přestože jsou neinvazivními patogeny, způsobují těžké průjmové onemocnění a tisíce úmrtí ročně. Organismy jsou na člověka přenášeny požitím infikované vody nebo fekálním přenosem (Actor, 2012).

*Vibrio cholerae* je původcem cholery, která se vyznačuje silným průjmem. Přijaté mikroorganismy sestupují do střevního traktu, vážou se na epitel a následně uvolňují exotoxin (cholergen), což způsobuje pasivní ztrátu vody z buněk. Při léčbě je tedy důležité přijímat dostatečné množství tekutin (Actor, 2012).

Dalšími druhy jsou *V. parahaemolyticus* a *V. vulnificus*. Způsobují průjmy, křeče, nevolnost a horečku a jejich přenos je konzumací infikovaných mořských plodů (Actor, 2012).

### 7.7.1 Detekce bakterií rodu *Vibrio* pomocí LFIA

K detekci *V. cholerae* z mořských plodů využil Pengusk et al. (2013) ve své studii značení pomocí GNPs. Detekční limit byl  $1 \times 10^4$  CFU/ml (Luo, 2018).

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je věnována imunochromatografickým testům a jejich využitím v oblasti detekce potravinových patogenů.

Úvodní část práce popisuje princip imunochromatografických testů založený na reakci antigenu s protilátkou. Pro stanovení jsou využívány značky, které s sebou přinášejí vyšší citlivost. V práci jsou zmíněny značky používané běžně, ale i ty méně časté. Nejčastěji se používají zlaté nanočástice konjugované se specifickými protilátkami cílenými proti stanovovanému antigenu. Toto tvrzení potvrzují nejen studie (obsažené v této práci), ale také firmy vyrábějící komerční soupravy. Základem komerčních souprav jsou jednotlivé stripy neboli proužky vyhotovené v různých formátech.

Konstrukci a následně i uspořádání těchto proužků je věnována další část této práce. Proužky se sestávají z: podložky pro aplikaci vzorku, konjugační zóny, nitrocelulózkové membrány s linií testovací a kontrolní a absorpční podložky. Dle samotného uspořádání a použití reagensů se poté odvíjí vyhodnocení těchto testů. Ani toto není v práci opomenuto.

V neposlední řadě je práce zaměřena na využití imunochromatografických testů k detekci potravinových patogenů. V práci jsou vyjmenovány nejběžněji se vyskytující patogeny a spolu s nimi i onemocnění, která způsobují.

Nákazy a otravy spjaté s potravinovou kontaminací představují pro lidskou populaci určité riziko. Do jisté míry mu lze předejít dodržováním hygienických pravidel, avšak ne vždy to jde. Důležitá je tedy včasná diagnóza u infikovaných osob a také zamezení šíření onemocnění spjatých s kontaminovanými potravinami (nejen ve stravovacích zařízeních, ale také v domácnostech).

Detekce potravinových patogenů pomocí imunochromatografických testů představuje rychlou, snadnou a levnou analýzu, která bude do budoucna zajisté jednou z nejvíce upřednostňovaných metod.

## POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Dzantiev, B. B., Byzova, N. A., Urusov, A. E., Zherdev, A. V.: Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014, 55, 81-93.
- 2) Koczula, K. M., Gallotta, A.: Lateral flow assays. *Essays In Biochemistry*. 2016, 60 (1), 111-120.
- 3) Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., van Amerongen, A.: Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*. 2009, 393, 569-582.
- 4) Eltzov, E, Guttel, S, Kei, A. L. Y., Sinawang, P. D., Ionescu, R. E., Marks R. S.: Lateral Flow Immunoassays – from Paper Strip to Smartphone Technology. *Electroanalysis*. 2015, 27, 2116-2130.
- 5) Naik, L., Lata, K.: Lateral Flow Assay - Concept and its Applications in Food Analysis. *Indian Food Industry*. 2013, 32, 22-38.
- 6) Banerjee, R., Jaiswal, A.: Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst*. 2018, 143, 1970-1996.
- 7) Law, J. W., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., Lee, L. H.: Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*. 2015, 5, 770.
- 8) Bishop, D. J., Hsieh, V. H., Gasperino, J. D., Weigl, H. B.: Sensitivity enhancement in lateral flow assays: a systems perspective. *Lab on Chip*. 2019, 19 (15), 2486-2499.
- 9) Göselová, S., Blažková, M., Holubová, B., Karamonová, L., Rauch, P.: Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické listy*. 2014, 108, 114-119.
- 10) Bahadır, E. B., Sezgintürk, M. K.: Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 82, 286-306.
- 11) Van Amerongen, A., Veen, J., Arends, H.A., Koets, M.: Lateral Flow Immunoassays. In: Vashist S. K, Luong J. H. T.: *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*. San Diego: Academic Press, 2018, 18 (11), 157-182. ISBN 9780128117620.
- 12) Sela, M.: Antigens. In: Delves, P. J., Roitt, I. M.: *Encyclopedia of Immunology*. Second Edition. San Diego: Academic Press, 1998, 201-207, ISBN 9780122267659.
- 13) Adorini, L.: Immunodominance. In: Delves, P. J., Roitt, I. M.: *Encyclopedia of Immunology*. Second Edition. San Diego: Academic Press, 1998, 1290-1292, ISBN 9780122267659.
- 14) Seppälä I. J. T., Mäkelä, O.: Hapten. In: Delves, P.J., Roitt, I. M.: *Encyclopedia of Immunology*. Second Edition. San Diego: Academic Press, 1998, 1050-1052, ISBN 9780122267659.

- 15) Dowd, E. S., Halonen, M. J., Maier, R. M.: Immunological Methods. In: Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, Ch. P.: *Environmental Microbiology*. Second Edition. Amsterdam: Academic Press, 2009, 225-241. ISBN 9780123705198.
- 16) Yu, H.W., Halonen, M. J., Pepper, I. L.: Immunological Methods, In: Pepper, I. L., Gerba, Ch. P., Gentry, T. J.: *Environmental Microbiology*. Third Edition. Academic Press, 2015, 245-269. ISBN 9780123946263.
- 17) Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al.: *Molecular Biology of the Cell: B Cells and Antibodies*. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
- 18) Janeway, C. A. Jr, Travers P., Walport M., et al.: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. The structure of a typical antibody molecule. New York: Garland Science, 5th edition, 2001, 116-122. ISBN 0-8153-3542-X.
- 19) Çam, D.: Lateral Flow Assay for Salmonella Detection and Potential Reagents, *New Insight into Brucella Infection and Foodborne Diseases* [online]. 2019 [cit. 2020-16-04]. ISBN 978-1-78985-098-7. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/new-insight-into-brucella-infection-and-foodborne-diseases>
- 20) Sajid, M., Kawde, A. N., Daud, M.: Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015, 19 (6), 689-705.
- 21) Litzman, J.: *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 7-9. ISBN 978-80-210-4227-8.
- 22) Quesada-González, D., Merkoçi, A.: Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 73, 47-63.
- 23) Luo, K., Kim, H. Y., Oh, M. H., Kim, Y. R.: Paper-based lateral flow strip assay for the detection of foodborne pathogens: principles, applications, technological challenges and opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018, 60, 1-14.
- 24) Parolo, C., de la Escosura-Muñiz, A., Merkoçi, A.: Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 40 (1), 412-416.
- 25) Moyano, A., Serrano-Pertierra, E., Salvador, M., Martínez-García, J. C., Rivas, M., Blanco-López, M. C.: Magnetic Lateral Flow Immunoassays. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2020, 10 (5), 288.
- 26) Zhou, G., Mao, X., Juncker, D.: Immunochromatographic Assay on Thread. *Analytical Chemistry*. 2012, 84 (18), 7736-7743.
- 27) Qiu, X., Liu, Ch., Mauk, M. G., Hart, R. W., Chen, D., Qiu, J., Kientz, T., Fiene, J., Bau, H. H.: A portable analyzer for pouch-actuated, immunoassay cassettes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011, 160 (1), 1529-1535.
- 28) Tsai, T., Huang, T., Ho, N.Y. et al.: Development of a multiplex and sensitive lateral flow immunoassay for the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Sci Rep*. 2019, 9, 15679.

- 29) Peruski A.H., Peruski L.F. Jr.: Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003, 10 (4), 506-513. Zolal, A., Ďurčiová, B., Syslová, K., Kačer P.: LFIA v medicíně diagnostice rakovinného bujení. *Chem. Listy.* 2016, 110, 917-921.
- 30) Çam, D., Öktem H. A.: Optimizations needed for lateral flow assay for rapid detection of pathogenic E. coli. *Turkish journal of biology.* 2017, 41 (6), 954-968.
- 31) Çam D., Öktem H. A.: Development of rapid dipstick assay for food pathogens, *Salmonella*, by optimized parameters. *J Food Sci Technol.* 2019, 56 (1), 140-148.
- 32) Singh, J., Sharma, S., Nara, S.: Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water. *Food Chemistry.* 2015, 170, 470-483.
- 33) Chen, A., Yang, S.: Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics.* 2015, 71, 230-242.
- 34) Kim, G., Lim, J., Mo, C.: A Review on Lateral Flow Test Strip for Food Safety. *Journal of Biosystems Engineering.* 2015, 40 (3), 277-283.
- 35) Raeisossadati, M. J., Danesh, N. M., Borna, F., Gholamzad, M., Ramezani, M., Abnous, K., Taghdisi, S. M.: Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016, 86, 235-246.
- 36) Anfossi, L., Di Nardo, F., Cavalera, S., Giovannoli, C., Baggiani, C.: Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors.* 2018, 9 (1), 2.
- 37) Scharinger, E. J., Dietrich, R., Wittwer, T., Märtlbauer, E., Schauer, K.: Multiplexed Lateral Flow Test for Detection and Differentiation of *Cronobacter sakazakii* Serotypes O1 and O2. *Front Microbiol.* 2017, 8, 1826.
- 38) Blažková, M., Javůrková, B., Fukal, L., Rauch, P.: Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosensors and Bioelectronics.* 2011, 26 (6), 2828-2834.
- 39) Norberg, S., Stanton, C., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D.: *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula. *J Food Prot.* 2012, 75 (3), 607-620.
- 40) Zhao, Y., Wang, H., Zhang, P., Sun, C., Wang, X., Wang, X., Yang, R., Wang, C., Zhou, L.: Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay. *Scientific reports.* 2016, 6, 21342.
- 41) Hong, W., Huang, L., Wang, H., Qu, J., Guo, Z., Xie, Ch., Zhu, Z., Zhang, Y., Du, Z., Yan, Y., Zheng, Y., Huang, H., Yang, R., Zhou, L.: Development of an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay for profiling antibodies against *Yersinia pestis*, *Journal of Microbiological Methods.* 2010, 83 (2), 133-140.

- 42) Rock, C., Donnenberg, M.S.: Human Pathogenic *Enterobacteriaceae*. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Elsevier, 2014 [cit. 2020-06-30]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383001367>.
- 43) Mei, X., Zhai, X., Lei, Ch., Ye, X., Kang, Z., Wu, X., Xiang, R., Wang, Y., Wang, H.: Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD) method for rapid detection of *Salmonella* strains in food samples. *Food Control*. 2019, 104, 9-19.
- 44) Zhao, S., Wang, S., Zhang, S., Liu, J., Dong, Y.: State of the art: Lateral flow assay (LFA) biosensor for on-site rapid detection. *Chinese Chemical Letters*. 2018, 29 (11), 1567-1577.
- 45) Actor, J. K.: Clinical Bacteriology. *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology* [online]. Elsevier, 2012, s. 105-120 [cit. 2020-07-01]. ISBN 9780323074476. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323074476000120>.
- 46) Wang, W., Liu, L., Song, S. et al.: Gold nanoparticle-based strip sensor for multiple detection of twelve *Salmonella* strains with a genus-specific lipopolysaccharide antibody. *Sci. China Mater*. 2016, 59, 665-674.
- 47) Neogen. Microbiology, 2019. [online]. © NEOGEN Corporation, 1982. [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: <https://www.neogen.com/solutions/microbiology/reveal-2-salmonella/>
- 48) Paradh, A.D.: Gram-negative spoilage bacteria in brewing. *Brewing Microbiology* [online]. Elsevier, 2015, s. 175-194 [cit. 2020-07-01]. ISBN 9781782423317. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782423317000083>.
- 49) Halkman, H.B.D., Halkman, A.K: Indicator Organisms. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, s. 358-363 [cit. 2020-07-01]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300003967>.
- 50) Tominaga, T.: Rapid detection of coliform bacteria using a lateral flow test strip assay. *Journal of Microbiological Methods*. 2019, 160, 29-35.
- 51) Yan, Z., Zhou, L., Zhao, Y., Wang, J., Huang, L., Hu, K., Liu, H., Wang, H., Guo, Z., Song, Y., Huang, H., Yang, R.: Rapid quantitative detection of *Yersinia pestis* by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2006, 119 (2), 656-663.
- 52) Ching, K.H, He, X., Stanker, L.H., Lin, A.V., McGarvey, J.A., Hnasko, R.: Detection of shiga toxins by lateral flow assay. *Toxins*. 7 (4), 1163-1173.
- 53) Merck KGaA. *Lateral Flow Tests for Immunological Detection in Food and Environmental Samples* [online]. Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates, ©2020. [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology/lateral-flow-tests-for-immunological-detection.html>



- 54) Kaneko, I., Miyamoto, K., Mimura, K., Yumine, N., Utsunomiya, H., Akimoto, S., McClane, B. A.: Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples by using molecular methods. *Applied and environmental microbiology*. 2011, 77 (21), 7526-7532.
- 55) Dave G. A.: A rapid qualitative assay for detection of *Clostridium perfringens* in canned food products. *Acta Biochim Pol*. 2017, 64 (2), 207-213.
- 56) Ching, K. H., Lin, A., McGarvey, J. A., Stanker, L. H., Hnasko, R.: Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip. *Journal of Immunological Methods*. 2012, 380 (1–2), 23-29.
- 57) Einer, G.: The microbiology of specific bacteria. *Meat Products Handbook* [online]. Elsevier, 2006, s. 595-615 [cit. 2020-07-01]. ISBN 9781845690502.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845690502500393>.
- 58) Shi L, Wu F, Wen Y, Zhao F, Xiang J, Ma L.: A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay. *Anal Bioanal Chem*. 2015, 407 (2), 529-535.
- 59) Woan-Fei, L. J., Nurul-Syakima, A. M., Kok-Gan, Ch., Learn-Han, L.: Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 5, 770.