

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

**Nosiče na bázi magnetických mikročástic pro
imunomagnetickou separaci patogenních bakterií z mléka**

**Michal Hruběš
Pardubický kraj**

Pardubice 2017

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

**Nosiče na bázi magnetických mikročástic pro
imunomagnetickou separaci patogenních bakterií z mléka**

**Carriers based on magnetic microparticles for
immunomagnetic separation of pathogenic germs in milk**

Autoři: Michal Hruběš

Škola: Střední průmyslová škola potravinářství a služeb Pardubice

Kraj: Pardubický

Konzultant: prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Mgr. Pavla Krulišová

Pardubice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Pardubicích dne 15. 3. 2017

Michal Hruběš

Poděkování

Na tomto místě bych rád velmi poděkoval vedoucí mé práce SOČ, paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, PhD. za to, že mi umožnila spolupráci na projektu LOVE FOOD 2, za všechny její cenné rady, za vstřícnost, trpělivost, ochotu a to i nad rámec mé práce. Dále bych rád poděkoval paní Mgr. Pavle Krulišové za vedení mé experimentální činnosti, za její vstřícnost, ochotu obětovat vlastní čas při studiu, její cenné rady a nápady. Moje poděkování taktéž patří paní Ing. Ivetě Brožkové, PhD., a paní Ing. Petře Motřkové, PhD. za jejich přínosné rady v oblasti mikrobiologie. Rád bych poděkoval celé skupině imunochemie za jejich rady a za vytvoření přátelského prostředí. V neposlední řadě bych rád poděkoval vedení mé školy a učitelům, kteří tolerovali mou občasnou absenci při důležité experimentální činnosti.

Anotace

Magnetické mikro/nanočástice jsou dnes díky svým jedinečným magnetickým vlastnostem a velkému specifickému povrchu hojně používány jako nosiče různých ligandů, bioaktivních látek různého původu i aktivity. Částice o rozměrech mikrometrů obsahují ve svém jádru oxidy železa, konkrétně magnetit a maghemit (případně jejich směsi). Tyto tzv. superparamagnetické částice jsou pomocí magnetického pole velice snadno a efektivně oddělitelné z kapalně fáze, kde se původně nacházely ve formě homogenní suspenze. Po oddálení magnetického pole částice svoje magnetické vlastnosti ztrácí. Takový bioaktivní nosič lze v praxi použít např. ke katalýze reakcí, k izolaci nebo depleci vybraných biomolekul ze složitých kapalných směsí. Nosiče se dnes běžně používají k dekontaminaci odpadních vod, k průkazu a rozkladu toxických látek ve vodách, k výrobě a izolaci biopolymerů z kultivačních médií. Tyto biofunkcionalizované nosiče nacházejí uplatnění také ve zdravotnictví nebo při analýze potravin.

Mléko je dnes velice žádanou komoditou, používá se k výrobě mnoha mléčných výrobků. Jakákoliv kontaminace patogenními organismy by tuto surovinu znehodnotila a znemožnila další zpracování. Cílem projektu je použít magnetické mikročástice pro rychlý průkaz a kvantitativní izolaci patogenních buněk bakterie *Salmonella sp.* z mléka. Nejprve budou na povrch magnetických částic kovalentně navázány specifické protilátky a tento tzv. imunisorbent bude použit pro izolaci bakteriálních buněk z kapalného vzorku. Podmínky pro izolaci a kvantifikaci zachycených bakteriálních buněk budou optimalizovány a poté bude nosič použit pro izolaci patogenů z reálných vzorků mléka. Tato práce bude součástí právě probíhajícího výzkumu zaměřeného na vývoj mikroanalyzátoru k bezkultivačnímu stanovení přítomnosti patogenních bakterií v potravinách.

Klíčová slova: magnetické mikročástice; imunomagnetická separace; mléko; *Salmonella sp.*; protilátky

Annotation

Thanks to the superparamagnetic properties and large surface area the magnetic micro/nanoparticles are widely used as carriers of various ligands or bioactive molecules of different origin and properties. . The core of the articles in micrometer size contain iron oxides, specifically magnetite or maghemite or their alternatives. These superparamagnetic particles resuspended in liquid phase can be easily and effectively separated by magnetic field. The particles immediately lose their magnetization after the removing the magnetic field, they can be repeatedly suspended. These carriers with bioactive molecules on their surface can be used as catalyst of reactions, for isolation or depletion of certain molecules from complex biological materials. Carriers can also be used for decontamination of wastewater, for determination and decomposition of toxic substances in water and for production and isolation of biopolymers from cultivation medium. These bio-functionalized carriers also help in diagnostics or in food analysis.

Milk is a daily processed commodity for production of wide range of dairy products. Of course, contamination of primary raw material by pathogenic organisms could make it impossible for further processing. The main goal of this project is to develop specific magnetic beads-based carrier for capturing and isolation of pathogenic bacteria cells, in this case *Salmonella* sp. At first the surface of magnetic microparticles are decorated by specific antibodies on the surface and this immunosorbent can be used for specific and highly effective isolation of bacteria cells from 25 ml of milk, all in accordance with ISO standards. The condition for the isolation and quantification of captured bacteria are optimized and then the carrier is used for the isolation from the whole milk. This work is a part of the ongoing research aimed at microanalyzer for rapid identification of pathogenic bacteria cells in raw or the whole milk.

Keywords: magnetic microparticles; immunomagnetic separation; milk; *Salmonella* sp.; antibodies

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Bioafinitní chromatografie.....	12
3	Magnetické částice.....	14
3.1	Příprava magnetických mikročastic	14
	Obálky magnetických mikročastic.....	15
3.2	Povrchová modifikace magnetických částic	15
3.2.1	Modifikace nosičů s cílem zavést vhodné chemické skupiny pro vazbu ligandů	16
3.2.2	Modifikace nosičů s cílem zlepšit povrchové vlastnosti	16
3.2.3	Víceúčelová modifikace nosičů polymery.....	17
3.3	Biofunkcionalizace magnetických částic	17
3.3.1	Nekovalentní techniky imobilizace ligandů	17
3.3.2	Kovalentní techniky imobilizace ligandů	18
3.3.3	Imobilizace IgG na magnetické částice	18
3.4	Magnetické částice a magnetismus	19
3.4.1	Diamagnetické látky	20
3.4.2	Paramagnetické látky	20
3.4.3	Fero- a ferimagnetické látky	20
3.4.4	Superparamagnetismus	21
3.5	Zeta potenciál a povrchový náboj částic	23
3.6	Metody charakterizace magnetických částic.....	25
3.7	Využití magnetických mikročastic.....	26
4	Patogenní bakterie rodu <i>Salmonella</i>	27
4.1	Bakteriální bičík rodu <i>Salmonella</i>	27
4.2	Nomenklatura rodu <i>Salmonella</i>	30
4.3	Infekce způsobované rodem <i>Salmonella</i>	32
4.4	Charakteristika bakterií rodu <i>Salmonella</i>	33
4.4.1	Fimbrie.....	33
4.5	Charakteristika hlavních toxických produktů bakterií rodu <i>Salmonella</i>	34
4.5.1	Fosfolipázy.....	35
4.5.2	Hemolyziny.....	35
4.6	Genom <i>Salmonella typhimurium</i>	36
5	Průkaz bakterií rodu <i>Salmonella</i>	39

6	Protilátky.....	42
6.1	Avidita a afinita protilátek	45
7	Experimentální část práce	47
7.1	Cíle práce	47
7.2	Materiál a metody	47
7.2.1	Reagencie a chemikálie	47
7.2.2	Bakteriální kultury	48
7.2.3	Celobuněčný dot-blot.....	48
7.2.4	Imobilizace protilátek na magnetické mikročástice.....	48
7.2.5	Imunomagnetická separace.....	49
7.2.6	Výsev bakterií na Petriho misky a metodika výpočtu při kvantifikaci bakteriálních buněk	49
7.3	Výsledky a diskuze	50
7.3.1	Výběr a hodnocení reaktivity specifických protilátek.	50
7.3.2	Vazba specifických protilátek na magnetické částice.....	53
7.3.3	Imunomagnetická separace patogenních bakterií z mléka	53
8	Závěr	59
9	SEZNAM LITERATURY	60
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
11	SEZNAM TABULEK	78

SEZNAM ZKRATEK

CFU	kolonii tvořící jednotka (z angl. Colony Forming Unit)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
EDC	<i>1</i> -ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
ELISA	heterogenní enzymo-imunoanalýza (z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay)
FliC	flagelární protein první fáze
fliC	gen kódující flagelární protein první fáze
FljB	flagelární protein druhé fáze
fliB	gen kódující flagelární protein druhé fáze
kDa	tisícinásobek atomové hmotnostní konstanty
PEG	poly(ethylenglykol)
PMMA	poly(methylmethakrylát)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (z angl. Ribosomal Ribonucleic Acid)
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie (z angl. Scanning Electron Microscopy)
SPI's	salmonelové ostrůvky patogenicity (z angl. Salmonella Pathogenicity Islands)
Sulfo-NHS	sodná sůl <i>N</i> -hydroxysulfosukcinimidu
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (z angl. Transmission Electron Microscopy)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa (z angl. Tumor Necrosis Factor Alpha)
T3SS	sekreční systém typu 3 (Type Three Secretion System)

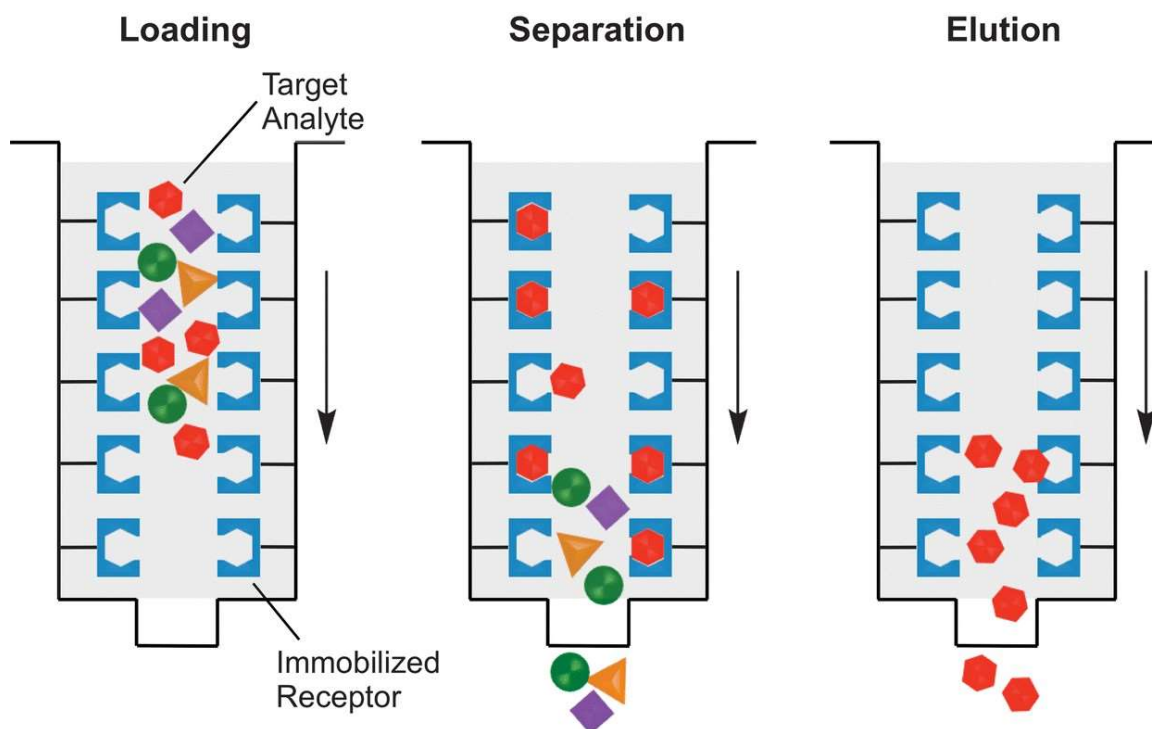
1 ÚVOD

Jedním z největších zdravotnických problémů dnešní doby jsou alimentární infekce, tj. onemocnění vyvolaná patogenními mikroorganismy vyskytující se v potravinách. Ročně těmito infekcemi trpí více jak 550 milionů lidí na celém světě a z nich více jak 33 milionů lidí na následky takové infekce umírá. Z toho 220 milionů nemocných jsou děti mladší 5 let. Problémem není jen množství takto zbytečně ukončených životů, ale také ekonomická zátěž pro společnost. Průměrné náklady na léčení jednoho pacienta se v přepočtu pohybují kolem 2000 Kč. Pokud zdravotní stav vyžaduje hospitalizaci, tak cena narůstá v průměru na hodnotu 190 000 Kč. Tato data vydaná ERS (Economic Research Service) zahrnují také celkovou ekonomickou ztrátu, při počtu 1,92 milionů nemocných se ztráta ve Spojených státech amerických vyšplhá v přepočtu na 137 miliard Kč, u onemocnění způsobované pouze bakteriemi *Campylobacter*, *Salmonella sp.*, *E. coli* O157:H7, a *Listeria monocytogenes*. Studie vydaná v roce 2007 stejnou institucí zahrnuje všechny známé patogeny způsobující alimentární onemocnění a vyčísluje ekonomickou ztrátu na 29,4 bilion Kč. Bakterie *Salmonella sp.* jsou Světovou zdravotnickou organizací považovány za příčinu číslo 1 ze všech průjmových onemocnění vyvolaných patogenními bakteriemi. Pro zdravého jedince tyto bakterie sice nepředstavují riziko ohrožení života, ale pro děti s nerozvinutým imunitním systémem a pro imunokompromitované jedince představuje salmonelóza vážné ohrožení života a často končí smrtí. Některé kmeny salmonel (např. *S. typhimurium*) v posledních letech vykazují vysokou míru rezistence vůči některým druhům antibiotik a to i se širokým spektrem účinku (např. Cefriaxon a další ze skupiny Cefalosporinů, Ampicilinu, Chloramfenikolu, Streptomycinu, Sulfonamidu, Amidoglykosidům, či Tetracyklinu), tudíž včasná léčba nemusí být účinná, čímž může dojít k život ohrožujícím komplikacím i pro jinak zdravé jedince. Z těchto důvodů je důležitá prevence, tj. razantně snížit riziko infekce důslednou kontrolou všech surovin i potravin z nich vyrobených. Salmonelové buňky zničí běžná pasterační teplota, tudíž u ošetřeného mléka by nemělo být riziko infekce. S rozmachem konzumace „syrového“ mléka, které je součástí většiny moderních diet a výživových směrů (Raw diety, bio strava), začala salmonelóza opět představovat závažné ohrožení lidské populace i v rozvinutých zemích. Mikrobiologická kontrola (dle platných zákonů a norem) a průkaz buněk *Salmonella sp.* trvá až 3 - 5 dní, jedná se o postup finančně i laboratorně náročný. Jelikož je mléko dokonalé živné médium a počasí dělení bakteriálních buněk je několik hodin, je nutné hledat metody, které poskytnou relevantní výsledky v co nejkratším čase. Z tohoto důvodu vědci dnes hledají cesty, jak proces detekce patogenů v mléce urychlit a zjednodušit. Klíčovým krokem je dnes

kultivace, tzv. časově náročné pomnožení patogenů v živném médiu pro jejich další identifikaci a kvantifikaci ve vyšetřovaném materiálu. Vývojem jedné z těchto nových metodických postupů se zabývá naše práce. Záměrem bylo připravit nosič na bázi magnetických mikročástic se specifickými protilátkami na povrchu a tento imunosorbent poté použít pro vychytávání buněk patogenu z vyšetřovaného materiálu, v našem případě z mléka. Práce vznikala v rámci evropského projektu LOVE FOOD 2 MARKET (Horizon 2020). Cílem projektu je vyvinout bezkultivační mikrofluidní analyzátor, kde budou zachycené bakteriální buňky podle své DNA identifikovány.

2 BIOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Bioafinitní chromatografie je moderní separační metoda využívající schopnost biologicky aktivních látek tvořit stabilní, specifické a reverzibilní biokomplexy. Imobilizací jedné z reagujících složek (afinitního ligandu) na matrici vznikne specifický nosič. Ten je schopen biospecificky interagovat s komplementární molekulou a utvořit biospecifický pár (viz obrázek 1).



Obrázek 1: Schématické znázornění průběhu bioafinitní chromatografie. Převzato z ¹.

Při afinitních interakcích se uplatňují elektrostatické, polární a hydrofobní interakce, vodíkové vazby, dipól-dipól interakce a další. Tyto nekovalentní vazby jsou ve srovnání s kovalentní vazbou velmi slabé, avšak jejich počet násobí sílu interakce mezi dvěma komplementárními molekulami a v některých případech je síla vazby srovnatelná s vazbou kovalentní (např. interakce mezi avidinem a biotinem ²). Tohoto fenoménu lze využít nejen pro izolaci vybraných látek, ale také k jejich imobilizaci na pevnou fázi.

Metoda bioafinitní chromatografie může být provedena v kolonovém nebo vsádkovém uspořádání. Po nanesení definovaného objemu kapalného vzorku v tzv. equilibračním pufru dochází k tvorbě biospecifických párů. Všechny ostatní molekuly, které s ligandem nereagují, procházejí daným prostředím beze změny. Po promytí nosiče může být zachycený analyt

eluován ve velmi čisté formě. Eluční podmínky, tzn. složení elučního média, musí navodit rozpad nekovalentních interakcí a účinně uvolnit analyt z biospecifického páru. Vhodným navolením elučních podmínek lze analyt nejen izolovat ale i zakoncentrovát ³. Mezi přednosti bioafinitní chromatografie patří nenáročnost, rychlost, výtěžek dosahující při optimálních podmínkách 90 % a více, vysoká čistota eluovaného analytu, izolace analytu přítomného ve vzorku ve velmi malých koncentracích a následná možnost jeho zakoncentrování ⁴.

3 MAGNETICKÉ ČÁSTICE

Magnetické mikročástice a nanočástice jsou dnes středem zájmu pro možnost využití v různých biologických disciplínách, biotechnologiích, environmentálních technologiích, medicíně i v analytických aplikacích. Magnetické částice mají většinou charakter kompozitních materiálů, které jsou složeny z vlastní fero- nebo ferimagnetické složky (zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem) a složky většinou diamagnetické (nemagnetické), která zajišťuje požadovanou interakci s biologickými systémy⁵.

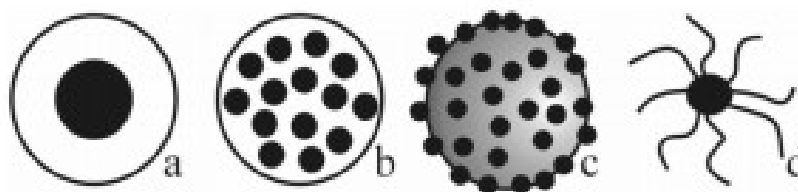
Velkou výhodou těchto magnetických kompozitních systémů je možnost cílené manipulace s částicemi a to působením vnějšího magnetického pole. Spojením magnetických nosičů s biologicky aktivní látkou lze dosáhnout unikátních vlastností vzniklých materiálů využitelných v biochemii, molekulární a buněčné biologii, (nano)biotechnologii, (nano)medicíně a jinde. Tyto materiály je možné separovat i ze složitých biologických materiálů a matic (např. buněčných suspenzí, fermentačních médií apod.). Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických nosičů pro izolaci nebo modifikaci biologicky aktivních látek jsou magnetické oxidy železa magnetit a maghemit (případně jejich směsi) a rovněž různé typy feritů, a to ve formě prášků nebo magnetických kapalin. V současné době se věnuje velká pozornost jednodoménovým a superparamagnetickým nanočásticím. Jednodoménové částice obsahují pouze jednu magnetickou doménu, ve které jsou magnetické momenty uspořádány paralelně a výsledný vektor magnetizace je mnohem vyšší než u multidoménových mikročástic. Unikátní magnetické vlastnosti částic spolu s jejich ohromným povrchem umožňující navázat velké množství ligandů jsou podstatou jejich využití jako efektivních nosičů pro účinnou a rychlou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek.⁶

3.1 Příprava magnetických mikročástic

Magnetické mikročástice, nejčastěji na bázi maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), či magnetitu (Fe_3O_4), se připravují mnoha metodami, mezi které patří sol-gel syntéza⁷, sonochemické reakce⁸, hydrotermální reakce⁹, hydrolýza a termolýza prekurzorů¹⁰, syntéza průtokovým injektováním¹¹, techniky využívající elektrosprej¹², ultracentrifugací¹³, vylučovací chromatografií¹⁴, magnetickou filtrací¹⁵. Výjimkou není ani biogenní produkce magnetických mikročástic magnetotaktickými bakteriemi^{16,17}, ale v současnosti je nejpoužívanější a jednoduchou

syntetickou metodou koprecipitace z vodného roztoku obsahujícího železnaté a železité soli. Ke srážení částic dochází při smíchání roztoku se zásadou¹⁸⁻²².

V závislosti na volbě metody výroby můžeme připravit částice lišící se svou morfologií, velikostí i uniformitou (monodisperzita, polydisperzita), viz obrázek 2.



Obrázek 2: Morfologické typy magnetických mikročástic. (a) částice typu jádro-obálka, angl. core-shell, (b) částice s mnoha magnetickými jádry obklopenými polymerem, (c) částice s mnoha magnetickými jádry přítomnými na povrchu částice, (d) částice tvořené magnetickým jádrem a jednotlivými řetězci polymeru. Převzato z²³.

Obálky magnetických mikročástic

Obálky (angl. shell) magnetických mikročástic mohou být tvořeny mnoha materiály, polymery biologického či syntetického původu, ale i anorganickými látkami či kovy. Stejně jako v případě klasických stacionárních fází pro bioafinitní chromatografie se i obaly magnetických částic nejčastěji připravují z anorganické siliky²⁴⁻²⁷. Často se pro obalení superparamagnetického jádra částic používají kopolymery, tj. směs tvořená polymerními molekulami přírodního a syntetického původu. Jedná se například o polystyrenové (latexové) částice^{28,29}, částice z celulózy³⁰, alginátu³¹, z poly(methylmethakrylátu) (PMMA)³², z poly(hydroxyethylenmethakrylátu) (PHEMA)³³ a dalších. Z kovů se hojně využívá povlak ze zlata, který zvyšuje magnetický moment částice, její odolnost vůči korozi a usnadňuje funkcionalizaci, díky dobře rozvinuté „Au-S chemii“^{34,35}. Dochází také k rozvoji využití různých luminiscenčních látek, s možností monitorování pohybu takových částic např. v organismu pokusného zvířete nebo pacienta v rámci výzkumu nebo diagnostiky zobrazovacími technikami³⁶.

3.2 Povrchová modifikace magnetických částic

Existuje několik důvodů pro povrchovou modifikaci magnetických částic, jakými jsou: absence vhodných chemických skupin pro následnou vazbu ligandu, hydrofobní povrch nebo

samovolná agregace částic v důsledku špatné koloidální stability, vysoká nespecifická adsorpce proteinů nebo buněk na částice, či adheze samotných částic na vnitřní stěny reakčních nádob. Nosiče lze modifikovat celou řadou způsobů, a to: chemicky nebo fyzikálně, adsorpcí nebo kovalentně, nízko- nebo vysokomolekulárními látkami citace článků, kde se tyto způsoby zmiňují.

3.2.1 Modifikace nosičů s cílem zavést vhodné chemické skupiny pro vazbu ligandů

Vyhovuje-li materiál nosiče cílové aplikaci a jeho jediným nedostatkem je absence vhodných skupin pro vazbu ligandu, můžeme povrch nosiče chemicky aktivovat, tedy zavést požadované funkční skupiny. Toho lze například dosáhnout například hydrolyzou oxiranových skupin PGMA na hydroxylové ³⁷, oxidace poly(ethylen)u kyselinou chromovou ³⁸ nebo hydrolyzou PMMA kyselinou sírovou za vzniku karboxylových skupin ³⁹. Polymery typu PCL, PE nebo PMMA je možné funkcionalizovat plazmou (argonem, dusíkem, kyslíkem, oxidem uhličitým atd.) ^{40,41}. Funkcionalizace plazmou může být kombinována s dalšími technikami pro modifikaci povrchu, například ultrafialovou polymerizací ⁴² nebo silanizací ⁴³ vnášející na povrch částic další chemickou vrstvu.

Silanizace je jeden z nejčastějších typů povrchové modifikace částic. Jedná se o funkcionalizaci alkokysloučeninami (mono-, di-, nebo trialkoxysilany) s vhodnou terminální funkční skupinou (např. $-NH_2$) za vzniku vazby Si-O-Si. Silanizaci je možné provést pomocí silanizačních činidel jako je například γ -aminopropyltriethoxysilan (APTS), glycidylxypropyltriethoxysilan (GOPS) nebo tetraethyl orthosilikát (TEOS). Silanizací zavedené terminální funkční skupina může být využita pro vazbu různých biologických ligandů, např. DNA ⁴⁴ a protilátek ⁴⁵.

3.2.2 Modifikace nosičů s cílem zlepšit povrchové vlastnosti

Některé typy částic mají tendenci samovolně agregovat, tomu se dá většinou zabránit přidáním detergentů, zvýšením molarity roztoku apod. stabilizačních nízkomolekulárních látek typu kyseliny citrónové ⁴⁶, olejové ⁴⁷ nebo fosforečnanů ⁴⁸. Magnetické částice obalené vrstvou z hydrofobního materiálu mohou být stabilizovány na základě hydrofobních interakcí s molekulami typu cetyl triethylammonium bromid (CTAB), kopolymerů poly(ethylenglykol) ⁴⁹. Magnetické částice lze také modifikovat inertními anorganickými materiály, jako zlatem ⁵⁰ a silikou ⁵¹. Tyto obaly zajistí dobrou koloidální stabilitu a znemožní tak jejich agregaci.

3.2.3 Víceúčelová modifikace nosičů polymery

Jedním z nejčastějších typů funkcionalizace u magnetických mikročástic, je modifikace polymery⁵². Po polymerní modifikaci nosičů se částice elektrostaticky odpuzují. Tento jev je nazýván jako elektrostatická stabilizace. Polymery jako poly(ethylenglykol) (PEG) nebo sacharidy jako dextran navíc slouží k tzv. stérické stabilizaci, jelikož řetězce těchto makromolekul slouží jako fyzikální stérická bariéra, která potlačuje agregaci částic. Výběrem vhodného polymeru nesoucího vhodné terminální skupiny na svých řetězcích lze významně ovlivnit koloidální stabilitu částic a potlačit tak jejich agregaci⁵³. Částice lze funkcionalizovat polymery syntetickými, jako např. PEG⁵⁴, polyvinylalkoholem (PVA)⁵⁵, polykaprolaktamem (PCL)⁵⁶, nebo přírodními jako např. dextranem⁵⁷, alginátem⁵⁸, chitosanem⁵⁹. Typ polymeru, jeho struktura i hustota na částicích významně ovlivňuje vlastnosti i chování modifikovaných částic.

3.3 Biofunkcionalizace magnetických částic

Mezi nejčastější ligandy imobilizované na magnetické mikročástice patří peptidy, proteiny (protilátky, enzymy) a nukleové kyseliny. Imobilizované ligandy nabízí ve srovnání s prací se solubilní formou zpravidla výhodu v možnosti kontrolovat reakci (např. odstranit ligand z reakční směsi), zvýšení stability a aktivity biomolekul a v čistotě získaného produktu^{60,61}.

Imobilizace ligandu na nosič lze provést řadou metod. Základní dělení těchto metod spočívá v rozdělení na vznik kovalentní nebo nekovalentní vazby (zachycení v polymeru, enkapsulace, adsorpce a afinitní interakce).

Při volbě metody vazby je nutné vzít v úvahu prostorovou orientaci ligandu na nosiči, tudíž zajistit stálou neporušenost a přítomnost bioaktivních míst ligandu. Ligandy lze na nosič ukotvit orientovaně, či neorientovaně. Orientovaná vazba, tj. místně-specifická vazba kotví ligand přes selektivní strukturu a je výhodná zejména u protilátek a oligonukleotidů. Například při orientované vazbě protilátek třídy IgG se využívá dvou odlišných metod, imobilizace přes Fc část nebo přes redukovanou S-S vazbu v pantové oblasti těžkých řetězců. Orientovaná vazba se například využívá i pro nukleové kyseliny, využitím systému biotin-avidin.

3.3.1 Nekovalentní techniky imobilizace ligandů

Prostá adsorpce ligandu na nosič na základě elektrostatických interakcí nevyžaduje žádnou předchozí chemickou modifikaci ligandu. V případě některých proteinů může být například

využita při pasivní vazbě protilátek na jamky polystyrenových ELISA destiček, jelikož polystyrenové povrchy jsou přirozeně hydrofobní, adsorpce protilátek v prostředí blízkému jejich izoelektrickému bodu je tak důsledkem komplexního působení hydrofobních sil, Van der Waalsových sil, iontových a vodíkových interakcí⁶². S ukotvením ligandu působením elektrostatických interakcí se taktéž setkáváme u imobilizace DNA, jelikož je DNA díky přítomnosti fosfátových skupiny negativně nabitá, tak její adsorpce probíhá na pozitivně nabitě povrchy. Nevýhodou adsorpce je možnost zpětné desorpce navázaného ligandu, nepředvídatelná orientace ligandu na nosič, možnost nízké účinnosti vazby a rovněž riziko nespecifické sorpce balastního materiálu ze vzorku⁶³.

Zvláštním případem nekovalentní imobilizace ligandů je afinitní vazba. V případě afinitního páru avidin-biotin se jedná o nejsilnější známou kovalentní interakci⁶⁴. Nejčastějším typem interakce avidin-biotin je použití stacionární fáze s navázaným avidinem, se kterým následně interaguje s ligandem s konjugovaným biotinem⁶⁵. Jedním z dalších příkladů vysokoafinitní vazby jsou interakce mezi imunoglobuliny a tzv. imunoglobulin-vázajícími proteiny (nejčastěji protein A, ale také G, L, H a další)⁶⁶.

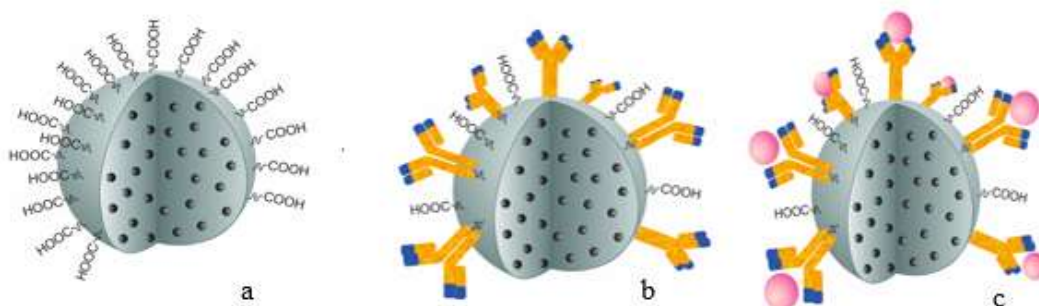
3.3.2 Kovalentní techniky imobilizace ligandů

Kovalentní vazba představuje nejpevnější možné ukotvení ligandu. Kovalentní vazba je schopna odolat i extrémním podmínkám prostředí, jako jsou např. teplota, pH, vysoký hydrodynamický tlak, prostředí o vysoké iontové síle. Tento typ vazby je ireverzibilní tj. nevratný⁶⁷. Nejčastěji využívanými skupinami pro vazbu ligandů jsou skupiny aldehydové, karboxylové, thiolové, hydroxylové a aminové. Pro tyto typy vazeb bylo vyvinuto velké množství konjugačních nebo aktivačních činidel (např. EDC, CDI, CMC, DCC, GTA, sulfo-SAMCA, MBS)⁶⁷. Podmínky vazby musí být především šetrné k ligandu, jehož bioaktivitu je nutno zachovat pro biospecifickou interakci (viz obrázek 3). Tyto činidla mohou zprostředkovávat ukotvení ligandu bez nutnosti včlenění spojovacího článku mezi ligand a nosič, nebo naopak mohou do vazby vnést nové atomy, či molekuly (působí jako „raménko“). Další skupinou jsou činidla nesoucí na obou koncích identické nebo rozdílné reaktivní skupiny⁶⁶.

3.3.3 Imobilizace IgG na magnetické částice

K imobilizaci IgG se používají činidla zvané karboimididy, konkrétně karboimid hydrochlorid-1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC). Po reakci EDC s nosičem, konkrétně s jeho

karboxylovou funkční skupinou, vzniká vysoce reaktivní intermediát (*o*-acylisomočovina). Tento produkt následně reaguje s nukleofilní aminoskupinou a vznikne stabilní amidová vazba. Přídavkem sodné soli *N*-hydroxysulfosukcinimidu (sulfo-NHS) do reakce se zvýší rozpustnost aktivního intermediátu a zároveň prodlouží jeho stabilitu, čímž zvýší pravděpodobnost interakce s aminoskupinou, se kterou vytváří aminovou vazbu. Tato reakce je neorientovaná a je využitelná pro široké spektrum biomolekul s aminoskupinou ⁶⁴.



Obrázek 3: Schématicky znázorněný průběh vazby IgG na magnetické částice . Převzato a upraveno z ⁶⁴.

3.4 Magnetické částice a magnetismus

Magnetické látky se rozdělují do několika skupin podle chování v magnetickém poli. Pro popis chování látky v magnetickém poli lze toto chování popsat vztahem mezi magnetizací M , což je součet všech magnetických momentů μ v látce obsažených (magnetické momenty atomů nebo iontů)

$$\vec{M} = \sum \vec{\mu}_i$$

Tuto rovnici můžeme také zapsat do tvaru:

$$\vec{M} = \chi \vec{H}$$

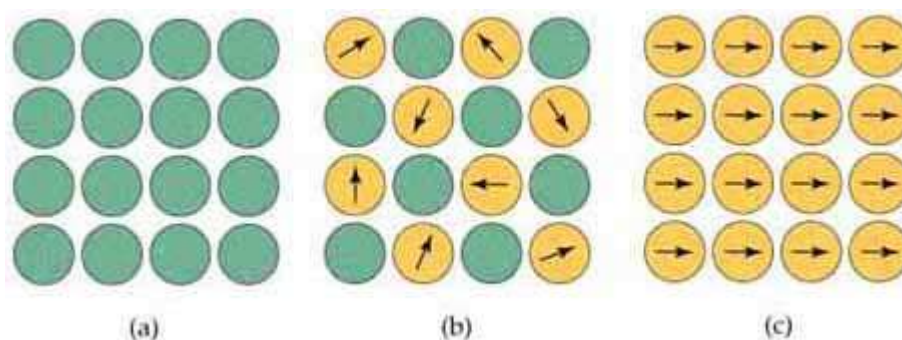
Kde H je vektor magnetické indukce a χ značí magnetickou susceptibilitu, což je bezrozměrná veličina, která může být dle volby podmínek skalárem, nebo vektorem. Dle velikosti susceptibilitu dělíme látky na diamagnetické, paramagnetické a feromagnetické. Odkaz na obrázek

3.4.1 Diamagnetické látky

Diamagnetické materiály mají zápornou susceptibilitu ⁶⁸. Jedná se o látky, jejichž atomy a molekuly nemají vlastní magnetický moment. Mezi diamagnetické látky řadíme zlato, rtuť, měď, stříbro a většinu organických látek.

3.4.2 Paramagnetické látky

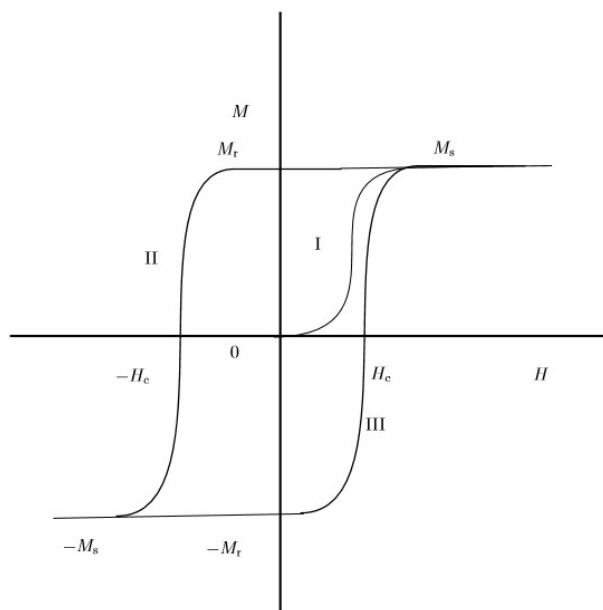
Paramagnetické materiály obsahují atomy, molekuly či ionty, nesoucí magnetický moment, tudíž je jejich susceptibilita kladná (viz obrázek 4). Při působení magnetického pole na paramagnetickou látku jsou magnetické domény, které látka obsahuje, orientovány do směru magnetického pole ⁶⁸



Obrázek 4: Typy chování magnetických materiálů. (a) Diamagnetické látky neobsahují magnetické domény, tedy atomy nebo ionty s magnetickým momentem. (b) Paramagnetické látky nemají jednotný vektor magnetizace ani při působení vnějšího magnetického pole. (c) Feromagnetické látky mají veškeré magnetické domény uspořádané v jednom směru. Převzato a upraveno z ⁶⁹.

3.4.3 Fero- a ferimagnetické látky

Feromagnetické materiály jsou materiály, které vykazují nenulovou magnetizaci i bez přiloženého magnetického pole. Tyto materiály vykazují spontánní uspořádání magnetických momentů v krystalové mřížce. Z atomárního hlediska se jedná o materiály složené z atomů, iontů nebo molekul nesoucích magnetický moment, který vzniká stejně jako u paramagnetických látek díky vnitřnímu momentu (hybnosti tzv. spin), který odpovídá rotaci elektronu kolem vlastní osy ⁶⁸. Spiny jsou v těchto materiálech orientovány v doménách, které nejsou uspořádané. Susceptibilita feromagnetických materiálů je kladná a v porovnání se susceptibilitou paramagnetických látek je poměrně vysoká. Magnetizace v závislosti na magnetickém poli feromagnetického materiálu vykazuje hysterezní chování (viz Obrázek 5).



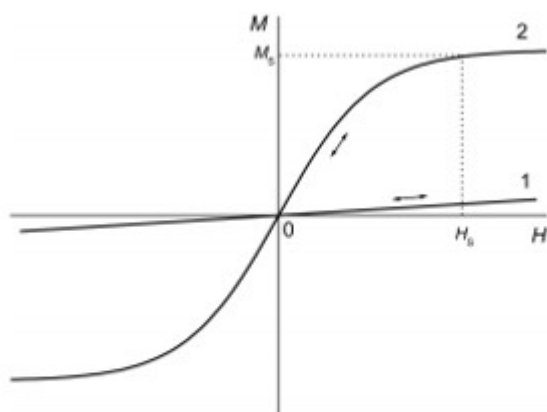
Obrázek 5: Hysterezní křivka feromagnetického materiálu. Křivka I. je křivka prvotní (panenské) magnetizace. Jedná se o nárůst magnetizace s vzrůstajícím polem, z nezmagnetovaného stavu, tedy ze stavu, kdy je magnetizace nulová. Se vzrůstajícím polem dochází magnetizace své saturace a se zvětšováním magnetického pole hodnota magnetizace už dále neroste. Tzv. maximální magnetizace se nazývá saturační magnetizace a obvykle je značena jako M_s . Pokud budeme intenzitu magnetického pole snižovat, bude magnetizace vlivem tepelného pohybu klesat. Jak je patrné z obrázku, průběh magnetizace ukazuje část křivky označená jako II. Pokud klesne magnetické pole na nulu, magnetizace má stále zbytkovou (tzv. remanentní) magnetizaci. Aby magnetizace klesla na nulu, je nutné přiložit magnetické pole opačného směru. Zvyšujeme-li pole dále v opačném směru až do saturace a opět měníme postupně velikost pole zase do kladných hodnot, získáme průběh hysterezní smyčky. Upraveno a převzato z ⁷⁰.

Ferimagnetické látky se od feromagnetických liší především větším elektrickým odporem a schopností spontánně zmagnetizovat. K ferimagnetickým látkám patří např. magnetovec (Fe_3O_4) nebo sloučeniny oxidů železa s jinými kovy (MnFe_2O_4 , $\text{BaFe}_{12}\text{O}_4$).

3.4.4 Superparamagnetismus

Magnetické vlastnosti částic se mění při zmenšování velikosti magnetického materiálu, což je důsledek kvantového omezení pohybu elektronů. Vznikají tím superparamagnetické látky, jejichž magnetický moment je velice snadno ovlivnitelný magnetickým polem ⁷¹⁻⁷⁴. Susceptibilita superparamagnetických materiálů dosahuje malých pozitivních hodnot okolo 0 – 0,01. Superparamagnetické materiály vykazují magnetické vlastnosti jen v přítomnosti magnetického pole ^{75,76}. Bez vnějšího magnetického pole mají nulovou magnetizaci (viz Obrázek 6 a 7). Nejvíce používané magnetické materiály pro výrobu magnetických částic jsou oxidy železa, jako je magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), které mají nejvyšší saturační

magnetizaci, vysokou magnetickou susceptibilitu, jsou biodegradabilní a přirozeně biokompatibilní. Dále se využívají různé typy feritů ve formě prášků, nebo magnetických kapalin ⁷⁷. Pro výrobu magnetických částic podobných vlastností lze taktéž použít kobalt nebo nikl ⁷⁸, sloučeniny zinku, manganu a mědi ⁷⁹.

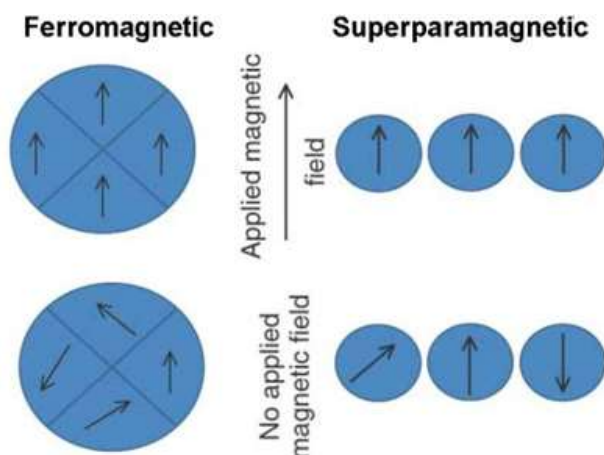


Obrázek 6: Magnetická křivka paramagnetického (1) a superparamagnetického (2) materiálu. Z křivky (1) i (2) je zřejmé že dané látky mají nulovou remanenci, nevykazují hysterezní chování. Superparamagnetická látka (2) dosahuje mnohem vyšších hodnot v obou magnetizacích M a saturaovaných magnetizací M_S. Upraveno a převzato z ⁸⁰.

Superparamagnetismus by se dal vysvětlit následovně. V kusu pevné látky se nacházejí tzv. feromagnetické klastry. Jsou malé, jednodomérové a jejich vektor magnetizace je v prostoru stálý (jako malé permanentní magnety). Síla bránící změně směru jejich vektorů (tedy přemagnetování) se nazývá magnetokrystalová anizotropie. Je vyjádřena v energii jednoho atomu, ale když se sečtou energie všechny atomy v klastru, tato energie narůstá. Změna magnetizace je tudíž možná pouze působením vnějšího magnetického pole. Pokud ale klastr postupně zmenšujeme, v jisté fázi se jeho energie anizotropie vyrovná s úrovní energie tepelných fluktuací (Bolzmannova konstanta) a ty mohou klastr „přemagnetovat“ i bez vnějšího magnetického pole. Pro vyšší teploty se pak klastr chová jako velký, ale volně fluktuující magnetický moment- vykazuje Curieho zákon pro chování susceptibility. Například, když systém ochladím, klastr ztuhne. Mám li energii anizotropie například 0,1 meV a klastr se 100 atomy, celková anizotropie klastru je 10meV. Vyjádřením z Boltzmannovy konstanty získáme teplotu asi 100 K. Při pokojové teplotě by tedy látka vykazovala superparamagnetické

vlastnosti. Pokud bychom měli klastr s 1000 atomy, při pokojové teplotě by látka superparamagnetické vlastnosti nevykazovala, potřebovali bychom teplotu 1000 K.

U magnetických částic v kapalně fázi, kromě superparamagnetických vlastností hraje též roli Brownův pohyb, tudíž není nutné dosáhnout Curieho teploty.

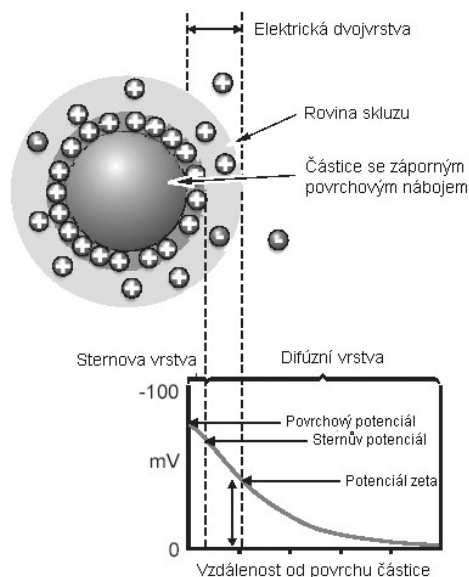


Obrázek 7: Chování feromagnetických a superparamagnetických materiálu v přítomnosti a nepřítomnosti magnetického pole. Převzato z ⁸¹.

3.5 Zeta potenciál a povrchový náboj částic

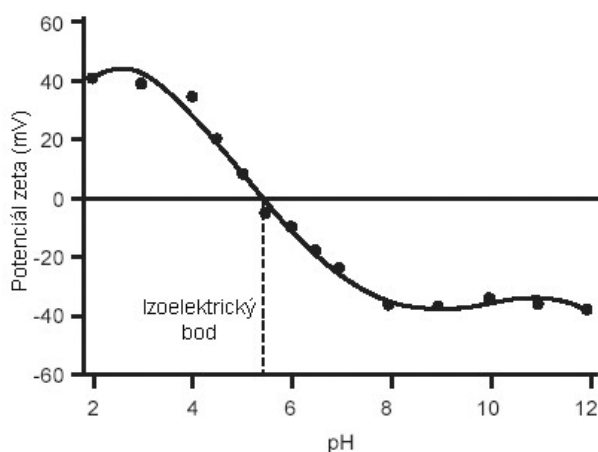
Částice v koloidních suspenzích nebo emulzích obvykle na svém povrchu nesou elektrický náboj, jehož hodnota je ovlivněna prostředím, ve kterém se částice definovaného složení a chemické povahy obálky právě nachází. Většinou se na povrchu částic vyskytují funkční skupiny (např. u biofunkciolizovaných částic), které samy o sobě nesou buď záporný, nebo kladný náboj ⁸². Vše je dáno složením kapaliny, ve které se částice právě nachází a hodnotami pH funkčních skupin na povrchu částic. Někdy samotná neobalená částice absorbuje ionty z roztoku, čímž opět vzniká na povrchu částice druhotný elektrický náboj. Vznik tohoto síťového náboje na povrchu částic ovlivňuje distribuci iontů v okolí mezifázové oblasti, což má za následek zvýšenou koncentraci iontů s opačným nábojem těsně u povrchu částice, tudíž kolem celé částice vzniká elektrická dvojvrstva. Vrstva kapaliny obklopující částici existuje jako dvě části; vnitřní oblast, nazývaná Sternova vrstva, kde jsou ionty silně vázané, a vnější, difúzní oblast, kde jsou ionty méně pevně připojené. Uvnitř difúzní vrstvy existuje teoretická

hranice, uvnitř které ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Když se částice pohybuje (např. kvůli vnějšímu magnetickému poli), ionty uvnitř hranice se pohybují s ní, ale všechny ionty za hranicí s částicí neputují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku, nebo rovina skluzu. Potenciál, který vzniká na této hranici, se nazývá potenciál zeta (viz Obrázek 8)



Obrázek 8: Elektrochemické vlastnosti mikročástic ve vodných roztocích. Převzato z ⁸³.

Velikost potenciálu zeta určuje především stabilitu koloidního systému (např. suspenze magnetických částic). Jestliže všechny částice v suspenzi mají velký záporný nebo kladný potenciál zeta, pak budou inklinovat k odpuzování se navzájem, a částice nemají tendenci vytvářet agregáty, případně flokulovat. Jestliže však částice mají nízké hodnoty potenciálu zeta, pak mají částice tendenci se shlukovat a flokulovat. Zlomová hodnota zeta potenciálu mezi stabilní a nestabilní suspenzí částic je zpravidla +30 mV nebo -30 mV. Částice s potenciálem zeta kladnějším než +30 mV nebo zápornějším než -30 mV se normálně považují za stabilní. Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje potenciál zeta je pH prostředí. Hodnota potenciálu zeta sama o sobě bez uvedení pH, je prakticky číslo nemající žádný smysl ⁸³. Bod vynesení procházející nulovým potenciálem zeta se nazývá izoelektrický bod (viz Obrázek 9). Izoelektrický bod udává informaci, kdy je koloidní systém nejméně stabilní.



Obrázek 9: Hodnoty zeta potenciálu na povrchu mikročastic ve vztahu k pH vodného roztoku. Převzato z ⁸³.

3.6 Metody charakterizace magnetických částic

Magnetické vlastnosti nano- a mikročastic primárně závisí na jejich fyzikálních vlastnostech (velikost a tvar částic), jejich mikrostruktura, povrchovém náboji, jejich hydrofobicitě nebo hydrofilicitě, porozitě, hustotě a typu jejich funkčních skupin pro následnou biofunkcionalizaci. Některé z těchto údajů poskytují výrobci magnetických částic, některé parametry si však uživatel musí proměřit sám. Metody umožňující částice komplexně charakterizovat, jsou založeny na různých fyzikálně chemických principech a k jejich vyhodnocení vyžadují vysokou erudici analytiků. Velikost částic může být analyzována mikroskopickými metodami, jako je transmisní nebo skenovací elektronová mikroskopie (TEM a SEM), cryo-TEM ⁸⁴, popřípadě mikroskopií atomárních sil (AFM, z angl. Atomic Force Microscopy). Pomocí „High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) můžeme studovat uspořádání jednotlivých atomů v dané mikročástici, což lze využít při odhalování defektů v krystalické mřížce ⁸⁵. Další z metod hojně používaných pro popis krystalické mřížky daného magnetického materiálu je laserová difrakce (XRD, z angl. X-Ray Diffraction), konkrétně ji lze například využít pro zjištění obsahu oxidů železa ⁸⁶. Modifikovanými formami laserové difrakce lze také zjistit velikost částic, a velice přesně určit jejich povrchovou strukturu (např. EXAFS, z angl. Extended X-Ray Absorption Fine Structure; EDXD, z angl. Energy-Dispersive X-ray Diffraction) ^{87,88}. Jednou z metod vhodných pro určení velikosti, polydisperzitu, tvar, dokonce i strukturu částic je metoda rozptylu neutronů pod malým úhlem (SANS, z angl. Small-angle neutron scattering). Výhoda této metody spočívá v možnosti měření částic přímo v suspenzi ⁸⁹. Jednou z dalších metod charakterizující superparamagnetické částice je měření zeta potenciálu, což se stalo jednou z rutinních metod při charakterizaci fyzikálních vlastností magnetických částic, jejich

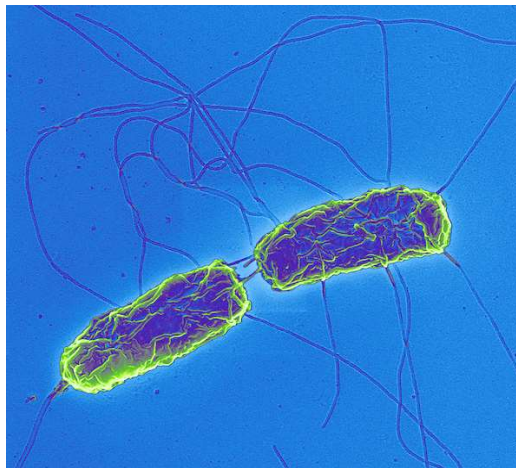
koloidální stability a pro stanovení tzv. bodu nulového náboje částic (PZC, z angl. Point of Zero Charge). Dalšími metodami pro popis vlastností magnetických nano- a mikročástic jsou například, fotonová korelační spektroskopie (PCS, z angl. Photon correlation spectroscopy), dynamický rozptyl světla (DLS, z angl. Dynamic light scattering) a kvazi-elastický rozptyl světla (QEELS, z angl. Quasi-elastic light scattering) pro určení velikosti částic⁹⁰. SQUID (z angl. Super-conducting quantum interference device) pro analýzu magnetických vlastností částic. Infračervená spektroskopie (IČ) pro analýzu chemického složení částic.

3.7 Využití magnetických mikročástic

Díky mnoha výhodám magnetických částic, především jejich snadné separace z kapalných fází, se magnetické částice staly rutinně využívanými nosiči napříč vědeckými odvětvími. Jedním z nejčastějších využití spočívá v izolaci buněk, kterou se zabývá i naše práce. Tyto metody byly podrobně shrnuty v review číslo⁹¹. Izolace vybraných biomolekul (proteiny, nukleové kyseliny) z kapalných fází se také stala rutinní záležitostí a tyto metody byly podrobně shrnuty například v^{92,93}. Za zmínku stojí využití magnetických mikročástic/nanočástic v tzv. drug-delivery systémech. Tedy efektivnímu dopravení medikamentu do místa působení. Takto se dají dopravovat například chemoterapeutika, antibiotika, analgetika a další. Shrnutí v^{94,95}. Magnetické mikročástice také nacházejí uplatnění v biotechnologiích, preparativní chromatografii, jsou využitelné ke katalýze reakcí, výrobě chemických látek a purifikaci bioreagencií. Tyto metody jsou shrnuty například v⁹⁶⁻¹⁰⁰.

4 PATOGENNÍ BAKTERIE RODU *SALMONELLA*

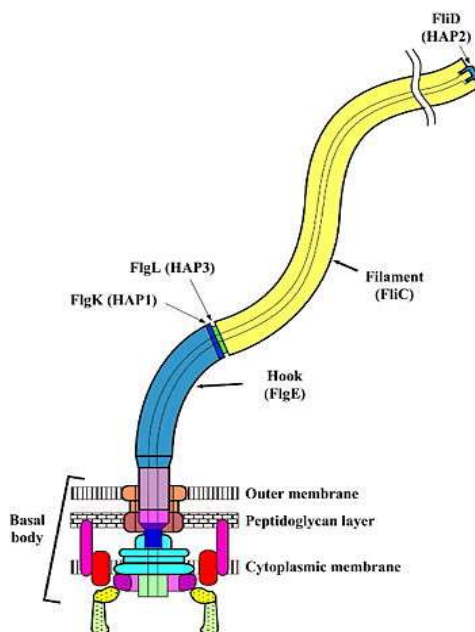
Salmonely jsou bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní, nesporetvorné, pohyblivé tyčinky o šířce 0,7 a 1,5 μm , délce od 0,2 do 0,5 μm (viz obrázek 10), které způsobují různě závažná onemocnění lidí a zvířat. Za optimálních podmínek, mají salmonely kolem celého povrchu buňky bičíky jako orgán pohybu¹⁰¹. Salmonely rostou v širokém rozmezí teplot, od 5 do 47 °C. K množení vyžadují vodní aktivitu minimálně 0,93. Bakteriální buňky jsou ničeny 15 – 20 minutovým ohřevem na teplotu 60 °C¹⁰². Salmonely se rozmnožují nepohlavně, buněčným dělením, s generační dobou asi 40 minut¹⁰³.



Obrázek 10: Snímek buněk *S. Typhimurium* zachycený pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Převzato a upraveno z¹⁰⁴.

4.1 Bakteriální bičík rodu *Salmonella*

Bakteriální bičík (lat. Flagellum) je převážně tvořen z globulárního proteinu, který se nazývá flagellin. Bičík má tvar 20 nm silné duté trubky, v níž jsou flagelliny uspořádány v pravotočivé šroubovici a jsou upevněny pomocí pružného háčku („hook“) těsně nad plazmatickou membránou. Háček spojuje bičík s komplexem proteinů nazývajících se motor. Motor je fixovaný v membráně a funguje na principu protonové pumpy¹⁰⁵. Konkrétně u Salmonel jakožto u gramnegativních bakterií, je celý komplex fixován pomocí „kroužků“ ve čtyřech vrstvách (viz Obrázek 11)¹⁰⁶.



Obrázek 11: Schématické znázornění bakteriálního bičíku. Převzato z ¹⁰⁷.

Bičík, jeho vláknitá část, je tvořen převážně komplexem proteinů nazývaným „Filament“ neboli vlákno. Vlákno je složené z proteinových podjednotek flagelinů. Vývoj bičíků na povrchu buněk *Salmonella typhimurium* může být inhibován při růstu v prostředí kultivačního média chudého na živiny ¹⁰⁸, což může vést ke zkeslení výsledků při diagnostice. Bakteriální bičíky usnadňují mobilitu bakterie v prostředí, umožňují pohyb bakterie vstříc atraktantům a zároveň umožňují pohyb bakterie pryč od repelentních látek ¹⁰⁹. Sérovar *Salmonella typhimurium* má přibližně 6 až 10 bičíků peritrichálně uspořádaných kolem celého povrchu buňky. Každý bičík je složený ze tří odlišných podstruktur bazálního těla- transmembránového motoru, háčku (propojuje motor a vlákno) a vlákna (Filamentu), které funguje jako vrtule ^{110,111}. Vlákno je přibližně 10 μm dlouhé a skládá se zhruba z 20 000 flagelinových podjednotek, a to buď proteiny FliC nebo FljB. Při tvorbě bičíku, tedy při polymerizaci jednotlivých subjednotek, se uplatňuje sekreční flagelárně specifický systém typu III ¹¹². Proteinové subjednotky jsou sestavovány na membránovém základě a postupně prodlužovány ¹¹³. Flagelin kódovaný genem *fliC* (protein FliC), je protein dlouhý 495 aminokyselin, o molekulové hmotnosti 51 612 Da, protein není posttranslačně modifikován. Flagelin označovaný jako FliB kódovaný genem *fljB* je protein dlouhý 506 aminokyselin, o molekulové hmotnosti 52 536 Da, také není posttranslačně modifikován. Oba proteiny polymerizují za vzniku filamentu ^{114,115}.

Flagelární biogeneze je velice složitý proces, při němž exprese více jak 50 ti genů je v souladu s tvorbou a poskládáním proteinových subjednotek ve funkční strukturu flagelinu ¹¹⁶.

Promotory flagelárních regulonů jsou organizovány do tří skupin, které určují počátek jejich exprese. První třída promotorů řídí transkripci z *flhDC*, hlavního operonu flagelární syntézy, a zahrnuje šest známých transkripčních počátků, které se řídí environmentálními podmínkami¹¹⁷. *FlhD* a *FlhC* tvoří heterotetramerní komplex, který je transkripční aktivátor pro σ^{70} -dependentní transkripční promotory druhé třídy¹¹⁸⁻¹²⁰. Druhá třída promotorů zprostředkovává transkripci genů potřebných pro konstrukci a montáž háčku k bazálnímu tělu (HBB, z angl. Hook-Basal body). Tato třída promotorů je specifická pro sigma faktor σ^{28} , FliA¹²¹, a jeho příbuzný anti-sigma faktor FlgM¹²². Třetí třída promotorů vyžaduje pro jejich transkripci σ^{28} dependentní RNA polymerázu¹²³. Bylo zjištěno, že anti-sigma faktor FlgM je schopný vázat se s σ^{28} , čímž zabrání promotorům třetí třídy iniciovat transkripci dříve, než se ukončí syntéza proteinových subjednotek a následné dokončení stavby HBB^{124,125}. Po sestavení HBB je FlgM secernován ven z buňky, což vede k iniciaci transkripce pomocí σ^{28} dependentních promotorů třetí třídy, které řídí transkripci genů potřebných pro výrobu proteinových subjednotek, které zajistí spojení háčku s filamentem a zároveň následnou tvorbu filamentu a některých produktů potřebných pro chemotaxi a rotaci bičíku^{126,127}.

S. enterica střídavě exprimuje dva různé typy bičíkového proteinu tzv. flagellinu, FljB a FliC, v procesu známém jako fáze bičíkových variací¹²⁸. Molekulární mechanismus zprostředkovávající střídání jednotlivých proteinových fází vzniká DNA inverzemi ve specifickém místě na chromozomu¹²⁹. Samotné proteiny FliC a FljB jsou identické prvních 71 aminokyselin a posledních 46 aminokyselin. Liší se tedy pouze délkou a typem povrchově exponovanými aminokyselinami ve středu řetězce, čímž v důsledku vzniká nemalá antigenní odlišnost¹³⁰. *S. enterica* a její subtypy střídají bičíkaté fáze těchto proteinů při rychlosti 10^{-3} až 10^{-5} na generaci buněk^{131,124}. Změna spočívá hlavně v modifikaci centrální části proteinu, konstantními zůstávají pouze amino- a karboxy-terminální domény¹³².

Flagelin jakéhokoliv typu je poměrně silný antigen, který stimuluje přirozenou imunitní odpověď. Nedávné výzkumy ukázaly, že stimulace TLR5 (Toll-like receptoru 5) bakteriálním flagelinem vedla k aktivaci signální dráhy, kde nukleární faktor NF- κ B ,iniciuje expresi genu pro TNF- α , prozánětlivého cytokinu. Kromě toho většina Tc-lymfocytů ($CD4^+$)¹³³ mají TcR receptory se specifitou proti epitopům flagelinových proteinů.¹³⁴ Pravděpodobně je střídání flagelinových fází zapříčiněno pokusem o dočasnou inhibici buněčné imunity^{135,136}.

4.2 Nomenklatura rodu *Salmonella*

Rod *Salmonella* je zařazen do kmene Proteobacteria. Tento kmen čítá 5 tříd bakterií – Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria a Epsilonproteobacteria. Rod *Salmonella* se řadí do třídy gamaproteobaktérií, která je v rámci kmene poměrně rozsáhlá a klinicky významná. V této třídě zaujímá místo v čeledi Enterobacteriaceae¹³⁷. Je tedy řazena po boku dalších střevních bakterií, často také patogenů lidského a zvířecího gastrointestinálního traktu (např. rody *Shigella*, *Escherichia*). Čeleď Enterobacteriaceae zahrnuje organismy všudypřítomné. Vyskytují se po celém světě, v prostředích, jako je voda, půda, rostlinná vegetace a střevní mikroflóra zvířat i člověka¹³⁸.

Klasifikace bakterií rodu *Salmonella* do jednotlivých sérotypů, je založena na antigenní struktuře. Buňky baktérií rodu *Salmonella* vykazují na svém povrchu tři typy antigenů. Těmi jsou somatické, bičíkové a kapsulární antigeny (typický především pro sérotyp *Typhi* a *Paratyphi*). Možnost detekce antigenní struktury je tedy závislá na fenotypovém projevu buňky, a pokud například buňka v některé životní fázi bičíky netvoří, pak není možné bičíkový antigen pomocí fenotypové sérotypizace prokázat. Existují ovšem sérotypy, které přirozeně postrádají geny kódující některé antigeny. Pak je nutné odlišit kmen, který je přirozeně bez antigenu, a kmen, který je v daném antigenu defektní. Tato vlastnost se často týká jednoho ze dvou bičíkových antigenů (tzv. bičíkových fází) a způsobuje problémy při sérotypizaci.

Somatický antigen, zvaný též O antigen, je představován polysacharidy přítomnými na povrchu G- buněk typickými pro zástupce čeledi Enterobacteriaceae. Je součástí vnější lipopolysacharidové vrstvy¹³⁹. U rodu *Salmonella* se vyskytuje až 46 strukturně rozdílných O-antigenů¹⁴⁰.

Flagelární neboli bičíkové antigeny se u rodu *Salmonella* vyskytují ve dvou takzvaných fázích (jsou kódovány geny *fliC* a *fljB*), z nichž jedna nebo druhá nemusí být exprimována. Jak již bylo řečeno, některé sérotypy přirozeně postrádají gen pro jednu nebo druhou fázi (například nejčastější sérotyp v České republice *S. enteritidis* ve svém genomu obvykle nexprimuje operon *fljBA*, nekóduje tudíž protein druhé bičíkové fáze). Jiné sérotypy mohou být v těchto genech defektní a není zatím zcela jisté, jestli takto činí záměrně a tento defekt jim přináší nějakou výhodu (typickým příkladem je nově prevalující monofazická varianta *S. Typhimurium* defektní v druhé bičíkové fázi). Podle McQuistona a kol. je druhá bičíková fáze (*fljB*) exprimována méně často než první fáze (*fliC*), tudíž je pro rod *Salmonella* něco jako

„náhradní pneumatika“, jak uvádí McQuiston. Propůjčuje například buňce další antigenní rozmanitost ¹⁴¹.

Kapsulární antigen Vi je přítomný pouze u sérotypů Typhi, Paratyphi C a Dublin ¹⁴². Tento antigen je základem vakcíny používané jako prevence proti onemocnění břišním tyfem ¹⁴³. Přítomnost Vi-antigenu u buněk salmonel, je kódována ostrůvky patogenicity salmonel 7 (SPI-7). SPI-7 obsahuje ve své sekvenci 134 kb a nese geny pro biosyntézu kapsulárního antigenu (viaB lokus) ¹⁴⁴, tedy lineární α -1,4,2-deoxy-2-N-acetylgalakturinové kyseliny, která je acetylována na poloze C-3 ¹⁴⁵. Vi antigen je významným faktorem virulence salmonel. Jeho studie *in vitro* ukázali, že Vi antigen je antiopsonin a zároveň je silně antifagotický ^{146,147}. Mimo to inhibuje produkci některých cytokinů, jako je TNF- α u makrofágů a zvyšuje rezistenci buňky vůči ROI (reaktivní kyslíkové intermediáty, z angl. Reactive oxygen intermediates) ¹⁴⁸, které silně poškozují buněčné struktury. Sérologická konfirmace Vi antigenu je značně omezená, protože se tvorba kapsulárních struktur mění vlivem prostředí, kde buňky rostou. Tvorba kapsule je regulována regulačními systémy OmpR a EnvZ ¹⁴⁹, které reagují na změny osmotického tlaku. Toto chování je vysvětlováno tak, že k prudkým změnám osmotického tlaku dochází při přechodu ze střevní sliznice do cév, kde je buňka salmonely vystavena vyššímu riziku představaném imunitním systémem hostitele.

Podle současné nomenklatury zahrnuje rod *Salmonella* dva druhy, a to *Salmonella bongori* a *Salmonella choleraesuis*. Druh *Salmonella choleraesuis* má ještě dalších 5 poddruhů a dále se salmonely dělí podle antigenů na tzv. sérotypy. Zatímco hostitelé *Salmonella bongori* jsou studenokrevní živočichové, převážně plazi, *Salmonella choleraesuis* napadá ptáky a savce, tudíž se vyskytuje na všech kontinentech planety. Dle Kauffmann-White-LeMinor schématu zahrnuje rod *Salmonella* více než 2500 sérotypů na základě odlišnosti somatických O-antigenů a flagelárních H-antigenů ¹⁵⁰. Molekulárně biologickými metodami bylo zjištěno, že jednotlivé sérotypy mezi sebou dosahují homologie 16S rRNA a provozních genů 96 - 98 %, jsou si tedy velice podobné. Nejedná se tedy o jednotlivé druhy, jak bylo dříve myšleno ¹⁵¹. Sérotypy jsou většinou pojmenované podle onemocnění, které způsobují (např. *S. enteritidis*, která způsobuje enteritidy u lidí), nebo podle místa první izolace apod. Běžně se jednotlivé sérotypy označují jako druhy.

K identifikaci sérotypů salmonel přispělo rozšíření metod, např. Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) nebo hmotnostní spektrometrie typu MALDI TOF (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time of Flight).

4.3 Infekce způsobované rodem *Salmonella*

Zdrojem nákazy salmonelami bývají divoká zvířata, krmiva a na člověka se přenášejí zejména potravinami živočišného původu, jako jsou vejce, mléko a mléčné výrobky, maso.

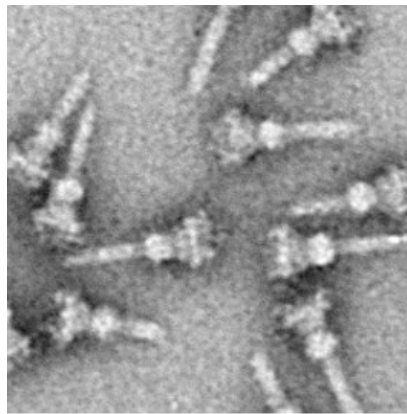
Salmonely mohou způsobovat jak gastroenteritidy, tak alimentární systémové infekce. Původcem gastroenteritid bývají sérotypy *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* a *Salmonella* Typhimurium. Minimální infekční dávka pro vznik onemocnění je 10^5 až 10^6 CFU. Akutní gastroenteritida se projevuje po inkubační době 6 – 48 hodin prudkým zánětem střevní sliznice, který je provázen silnými průjmy, bolestmi břicha, zvracením, bolestmi hlavy, vysokou teplotou a zimnicí. Salmonely se mohou v tenkém střevě dále pomnožit a způsobovat zánětlivé procesy a produkovat další toxiny. Příznaky odeznívají během několika dní. Většinou bývá průběh infekce mírný a rychlý. Těžký průběh salmonelových toxoinfekcí se vyskytuje spíše u imunokompromitovaných jedinců, starších lidí, nebo u kojenců ¹⁵².

Systémové alimentární infekce způsobují většinou sérovary *Salmonella typhi* a *Salmonella paratyphi* a onemocnění se nazývá břišní tyfus nebo paratyfus. Inkubační doba je zpravidla 10 až 20 dní po požití kontaminované potravy. Ke vzniku onemocnění postačí infekční dávka 10^2 až 10^3 CFU. Invazivní sérotypy Salmonel pronikají do lymfatického systému, kde se množí a následně přecházejí do krve postiženého. Akutní fáze onemocnění trvá 1 až 2 týdny a je provázena vysokými horečkami, silnými bolestmi hlavy, slabostí a nechutenstvím. Zároveň mohou napadat různé orgány jako je slezina, játra, ledviny, střeva nebo žlučník, kde způsobují záněty ¹⁵².

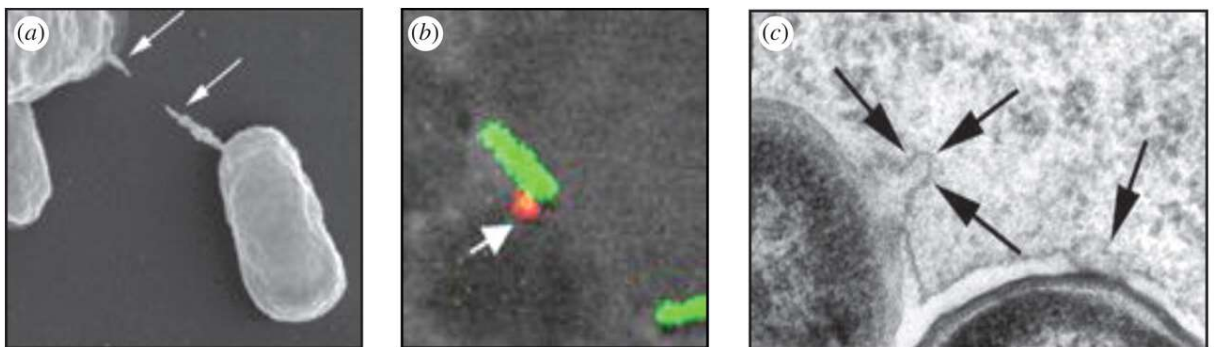
Salmonely, jakožto střevní parazité, musí v hostiteli svádět boj s původním osídlením střeva, tedy s hostitelskou střevní mikroflórou. Jakým způsobem dokáže patogen ovlivnit chování mikroflóry, není zcela objasněno, ale poslední studie ukazují, že salmonely dokáží využít ve svůj prospěch zánět, který v hostitelském organizmu indukují ¹⁵³. Invaze na sliznici střeva stimuluje epiteliální buňky k syntéze a uvolnění různých cytokinů, a to hlavně cytokinů IL-1, IL-6, IL-8, TNF-2, IFN- γ , MCP-1 a GM-CSF ¹⁵⁴. Ty indukují zánět na střevní sliznici, což také může zapříčinit její poškození. Tímto zánětem dojde k narušení vyváženosti původního střevního osídlení, což otevírá cestu patogenu a následné infekci. Tento krok výrazně usnadňuje mikroflóra již předem narušená, například antibiotiky. Vzniklý zánět také vyvolává zvýšenou sekreci a sníženou schopnost střeva absorbovat, z čehož vzniká hlavní klinický příznak infekce – průjem ¹⁵⁵.

4.4 Charakteristika bakterií rodu *Salmonella*

Mezi hlavní faktory virulence *Salmonel* patří produkce toxinů, SPI a přítomnost fimbrií. V genomu bakterií rodu *Salmonella* jsou geny označované jako „*Salmonella* pathogenicity islands“ – SPIs), konkrétně SPI1 a SPI2, jejichž produkty úzce souvisejí s virulencí bakteriálních buněk. Sekreční systém typu III (T3SS) vytváří na povrchu *Salmonelových* buněk extracelulární 80nm dlouhé struktury podobné injekční stříkačce (viz Obrázek 12 a 13)¹⁴¹, což jim umožňuje vstřikování efektorových proteinů přímo do cytosolu eukaryotních buněk¹⁵⁶.



Obrázek 12: Snímek transmisního elektronového mikroskopu zachycující izolované T3SS *Salmonella* Typhimurium. Převzato z¹⁵⁷.



Obrázek 13: Snímky zachycující T3SS bakterie *Salmonella* Typhimurium. (a) Snímek SEM zobrazující T3SS *Salmonella* Typhimurium. (b) Imunofluorescenční mikrograf zobrazující T3SS (červeně) při napadení makrofágu. (c) Negativně mořený snímek TEM zachycující ultra tenkou vrstvu spojení bakteriální a fagozomální membrány. Převzato z¹⁵⁸.

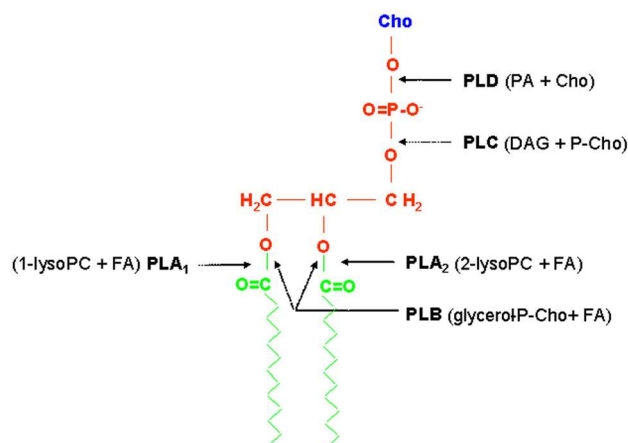
4.4.1 Fimbrie

Přítomnost fimbrií na povrchu bakteriální buňky je zásadní faktor virulence. Fimbrie na povrchu bakterií zprostředkovávají adhezi buňky na povrch hostitelské buňky¹⁵⁹. *Salmonella*

typhimurium, sérovar LT 2, obsahuje ve svém chromozomu 12 operonů na sestavu „chaperon/usher assembly class“: *stc*, *bcf*, *fim*, *lpf*, *saf*, *stb*, *std*, *stf*, *sth*, *sti*, *stj* ¹⁶⁰. Tyto chaperonům podobné struktury sestavují proteinová vlákna na bakteriálním povrchu, které následně mohou přecházet do fimbriální nebo non-fimbriální fáze (např. exospora) ¹⁶¹. Buňky salmonel, které jsou fenotypově adhezivní, jsou mnohokrát více pohlcovány fagocyty než buňky, které jsou fenotypově neadhezivní – bez fimbrií. Adhezivní fáze buňky většinou přežije pohlcení fagocytem, zatím co non-adhezivní fáze buňky je většinou fagocytující buňkou usmrcena. Buňky, jež dokáží exprimovat geny vedoucí k tvorbě fimbrií, jsou virulentnější a mají vyšší šanci na kolonizaci hostitele ¹⁶².

4.5 Charakteristika hlavních toxických produktů bakterií rodu *Salmonella*

Salmonely produkují několik typů toxinů. Jakožto gramnegativní bakterie produkují lipopolysacharidový endotoxin, který je nedílnou součástí buněčné stěny. Lipopolysacharidový endotoxin je makromolekula, která vykazuje důležité biologické aktivity. Je složena z lipidu A a ze specifického a základního polysacharidu. Lipid A je tzv. endotoxin, tedy struktura, která je součástí stěny a je toxická pro eukaryotické buňky. V nízkých koncentracích stimuluje makrofágy hostitele, při vysokých koncentracích funguje jako tzv. superantigen ¹⁶³. Superantigen je antigen který vyvolá aktivaci velkého počtu lymfocytů, nezávisle na jejich antigenní specifitě ¹⁶³. Lipid A tedy může v organismu hostitele vyvolat septický endotoxinový šok, který může mít i letální následky ¹⁶⁴. Buňky Salmonely produkují také exotoxiny, konkrétně cytotoxin a enterotoxin ¹⁰². Cytotoxiny jsou toxiny poškozující membrány eukaryotických buněk, například hemoliziny a fosfolipázy (viz obrázek 14). Exotoxiny jsou látky vylučované mikroorganismy do okolního prostředí. Exotoxiny se vážou na povrch permissivních eukaryotních buněk prostřednictvím specifických receptorů, pronikají do nitra buňky a mění její fyziologické funkce. Tyto toxiny zpravidla katalyzují jeden typ reakce a to ADP-ribosylaci proteinů v hostitelské buňce, což vede mj. k zastavení proteosyntézy a následné smrti buňky ¹⁶⁴.



Obrázek 14: Schématické znázornění působení bakteriálních fosfolipáz na molekulu fosfatidylcholinu. Převzato z ¹⁶⁵.

4.5.1 Fosfolipázy

Fosfolipázy ¹⁶⁶, jsou hydrolytické enzymy štěpící molekuly fosfolipidů. Dělí se dle cílové vazby, jenž štěpí na fosfolipázu A1, jenž odštěpuje acetylový zbytek na C1 pozici glycerolového zbytku. Fosfolipáza A2 odštěpuje acetylový zbytek na C2 pozici glycerolového zbytku uvolňující arachidinovou kyselinu. Fosfolipáza B štěpí lyzoglycerofosfolipidy ¹⁶⁷. Fosfolipáza C odštěpuje diacylglycerolový zbytek a fosfolipáza D odštěpuje fosfaditovou kyselinu ¹⁶⁸. Tyto mechanismy vedou k poškození cytoplazmatické membrány a následné lýze buňky (viz Obrázek 14) ¹⁶⁹.

4.5.2 Hemolyziny

Hemolyziny ¹⁷⁰ jsou toxiny proteinové a lipidové povahy, jenž způsobují lyzi erytrocytů, leukocytů a trombocytů zničením jejich cytoplazmatické membrány. Hemolyziny vytváří póry ve fosfolipidové dvojvrstvě ¹⁷¹, nebo její hydrolýzou ¹⁷². Monomery hemolyzinů difundují k cílovým buňkám a váží se na specifický receptor. Po vazbě oligomerizují a vytváří heptamerové prstencové komplexy, které následně vytvářejí vodě propustné transmembránové kanálky. Narušení membránového potenciálu a iontové rovnováhy vede k průniku molekul vody do buňky, jejímu nabobtnání, což vede k poškození celistvosti cytoplazmatické membrány, díky čemuž dojde ke smrti buňky ¹⁷³. *Salmonella typhimurium* produkuje dva hlavní hemolytické proteiny s označením SipB a SipC ¹⁷⁴.

4.6 Genom *Salmonella typhimurium*

Salmonella Typhimurium, je hlavní příčinou gastroenteritid u lidí. Non-tyfové salmonelózy způsobené tímto sérovarem na světě ročně postihují miliony lidí a mají za následek mnoho smrtí. Chromozom Sérovaru *Salmonella typhimurium* LT2 obsahuje 4857 kb a jeho plasmid virulence 93939 kb (viz Tabulka 1, 2). Genom *Salmonella typhimurium* LT2 kóduje 4463 proteinů¹⁷⁵.

Základní charakteristika genomu *Salmonella typhimurium* LT2 je zobrazena v obrázku 15.

Table 1 Genome essentials

Parameter	Chromosome	Plasmid pSLT
Size (bp)	4,857,432	93,939
G+C content	53%	53%
rRNA clusters	7	0
tRNAs	85	0
tRNA pseudogene	1	0
Structural RNAs	11	1
CDS (including pseudogenes)	4,489	108
CDS pseudogenes	39	6

Tabulka 1: Základní charakteristika genomu *Salmonella Typhimurium* LT2. Převzato z¹⁷⁶.

Genom *Salmonella Typhimurium* LT2 byl taktéž srovnáván s genomy bakterií *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella arizonae*, dvěma sérovary *Escherichia coli* (*Escherichia coli* má genom nejvíce podobný genomu *Salmonel*) a s *Klebsiella pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae je oportunní lidský patogen, který je blízce příbuzný se *Salmonelami*.

Table 2 Coding sequence homologues shared by *S. typhimurium* LT2 and eight other strains of enterobacteria

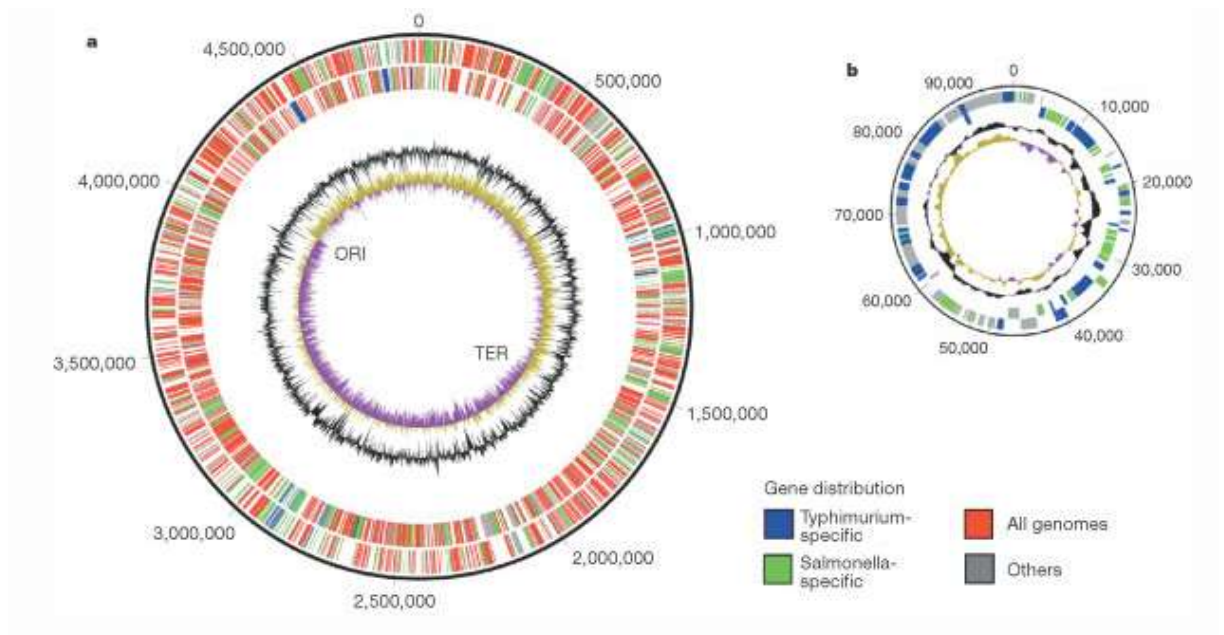
Organism	Data source	Homologues of STM CDS (%) [*]	Median homology of reciprocal best hit CDS (%)	
			DNA	Amino acid
<i>S. enterica</i> serovar				
<i>S. typhimurium</i> LT2	Complete sequence	100	100	100
<i>S. typhi</i> CT18	Complete sequence ⁷	89	98	99%
<i>S. paratyphi</i> A	~97% sequence sample/microarray	87/89	98	99
<i>S. paratyphi</i> B	Microarray	92	—	—
<i>S. arizonae</i>	Microarray	83	—	—
<i>S. bongori</i>	Microarray	85	—	—
<i>E. coli</i> K12	Complete sequence ⁸	71	80	90
<i>E. coli</i> O157:H7	Complete sequence ⁹	73	80	89
<i>K. pneumoniae</i>	~97% sequence sample	73	76	88

^{*} For sequenced genomes, reciprocal best hits, excluding unsampled regions; for microarrays, signal ratio of *S. typhimurium* LT2 with genome is 3:1 or greater and based on roughly 4,330 *S. typhimurium* LT2 CDS. Raw data is available at <http://genome.wustl.edu/gsc/Projects/S.typhimurium>.

Tabulka 2: Srovnání společných genových sekvencí u několika sérovarů *S. enterica* a příbuznými bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Převzato z ¹⁷⁶.

Genové srovnání mezi čtyřmi zcela dokončenými genomy, geneticky příbuzných bakterií (*S. typhimurium* LT2, *S. typhi*, *E. coli* K12 and *E. coli* O157:H7) ukazuje, že genomy jednotlivých bakterií jsou kolineární pro většinu genů kromě inverzí před koncem replikace ^{177,178}.

Ze 4 489 CDS a pseudogenů nacházejících se v chromozomu *S. typhimurium* se shodují ve 2466 CDS a pseudogenech (55%), s dalšími 8 příbuznými genomy bakterií z rodu *Enterobacteriaceae* (viz Obrázek 15).



Obrázek 15: Kompletní genová sekvence *Salmonella typhimurium* LT2 a porovnání homologie genů s příbuznými bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Převzato z ¹⁷⁶.

V chromozomech střevních bakterií jsou mozaiky genů, které se skládají z oblasti kolineárně proložených smyček nebo z ostrůvků typických pro konkrétní bakteriální druh. Tyto tzv. „*Salmonella* pathogenicity islands“ (SPIs) ovlivňují virulenci bakterie.

Většina kmenů *Salmonella typhimurium* nese plazmid, který obsahuje asi 90 kb. Plazmid kmene LT2 se nazývá pSLT20 ¹⁷⁶. Ze 108 nalezených CDS a pseudogenů v pSLT, mají jen tři blízký homolog k *S. typhi* a *S. paratyphi* ¹⁷⁸.

5 PRŮKAZ BAKTERIÍ RODU *SALMONELLA*

Salmonely zkvašují glukózu, většinou jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní, redukují nitráty na nitrity a nesnášejí kyselé pH. Většina salmonel (s výjimkou *S. typhi*) využívají jako zdroj uhlíku citráty, dekarboxylují lyzin, arginin a ornitin, produkují sulfan. Test MRT (methyl-red test) je pozitivní, V-P (Voges-Proskauer) test a indol je negativní.

Průkaz bakterií rodu *Salmonella* se v mléce a mléčných výrobcích provádí dle normy ČSN EN ISO 6785, většinou kvantitativně, tzn., jedná se o průkaz, nebo vyloučení přítomnosti salmonel v předepsané navážce vzorku, obvykle 25 g nebo 25 ml.

Zkouška zahrnuje čtyři po sobě jdoucí stupně:

- 1) Předpomnožení v neselektivní tekuté půdě
- 2) Pomnožení v selektivních tekutých půdách
- 3) Vyočkování na tuhé půdy a rozpoznání presumptivních kolonií
- 4) Konfirmaci

Průkaz Salmonel je založen na jejich odolnosti k barvivům, osmotickému tlaku a některým antibiotikům a na jejich biochemických vlastnostech. Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté živné půdy pro neselektivní pomnožení – pufrovaná peptonová voda (PPV médium) a inkubuje se aerobně při 37 °C po dobu 16 - 20 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do dvou tekutých selektivních půd pro selektivní pomnožení: půda s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení v modifikaci podle Rappaporta a Vassiliadise (RVS médium) a do půdy se seleničitanem a cysteinem. RVS médium se inkubuje aerobně při teplotě 41,5 °C po dobu 24 hodin. Půda se seleničitanem a cysteinem se inkubuje při 37 °C po dobu 24 hodin.

Ze selektivního pomnožení se provádí vyočkování na dvě pevné selektivní půdy. První tuhá selektivní půda je agar s brilantovou zelení a fenolovou červení podle Edela a Kampelmachera. Volba druhé tuhé selektivní půdy je ponechána na rozhodnutí zkušební laboratoře. Jako druhá tuhá selektivní půda se nejčastěji používá agar s fenolovou červení a brilantovou zelení, nebo na jinou volitelnou půdu (DC agar, bismut sulfitová půda, EA, S-S agar, XLD agar), nebo na chromogenní agar pro stanovení salmonel, například Rambach agar. Naočkované misky se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 - 48 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií bakterií rodu *Salmonella*.

Po kultivaci se z každé plotny tuhé selektivní půdy vybere po pěti typických nebo suspektních koloniích, které se následně rozočkují na povrch ploten živného agaru, tak aby umožnil vývoj dobře izolovaných kolonií. Plotny se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 18 - 24 hodin.

Po inkubaci se pro biochemickou a sérologickou confirmaci použijí čisté kultury. Každá z čistých kultur se inokuluje očkovací kličkou do následujících půd: agar s glukózou, laktózou, sacharózou a citranem železitým; agar s močovinou; půda k testování dekarboxylace L-lyzinu; průkaz β -galaktooxidázy; Voges-Proskauerova reakce; testování tvorby indolu (viz tabulka 3).

Konfirmační test	Pozitivní nebo negativní reakce	% kmenů r. <i>Salmonella</i> vykazujících reakci
TSI: glukóza (tvorba kyseliny)	+	100
TSI: glukóza (tvorba plynu)	+	91,9
TSI: laktóza (tvorba kyseliny)	-	99,2
TSI: sacharóza (tvorba kyseliny)	-	99,5
TSI: tvorba sulfanu	+	91,6
štěpení močoviny	-	100
dekarboxylace L-Lyzinu	+	94,6
tvorba β -galaktooxidázy	-	98,5
Voges-Proskauerova reakce	-	100
tvorba indolu	-	98,9

Tabulka 3: Typy konfirmačních testů pro confirmaci bakterií *Salmonella* sp.

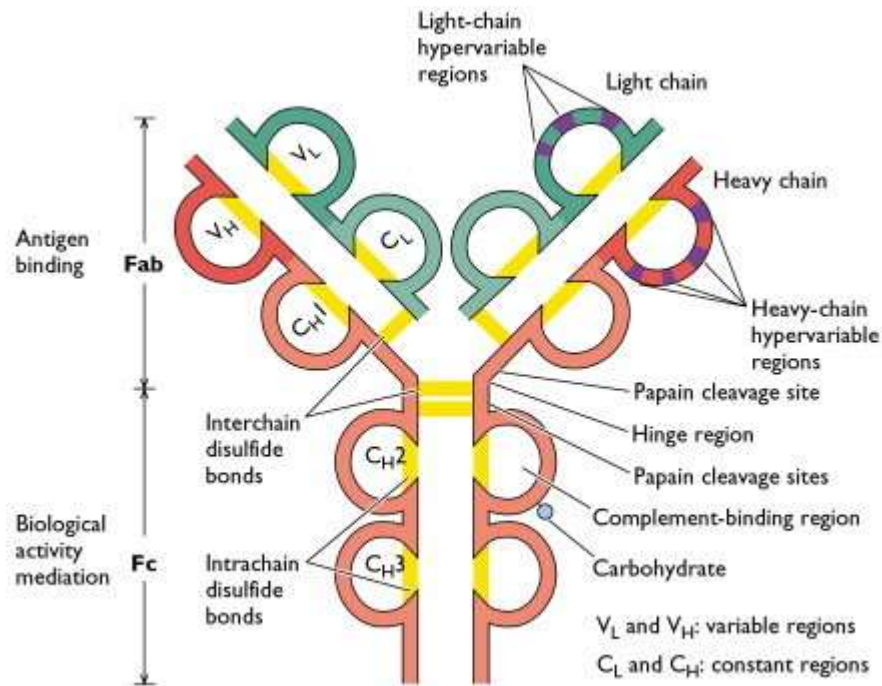
Lze také provádět sérologickou confirmaci, tedy průkaz O, Vi a H antigenů na povrchu bakterií rodu *Salmonella*. K průkazu se využívá metoda aglutinace suspenze získané z 1 CFU čisté kultury. Pokud dojde k aglutinaci buněk po přidání O, Vi nebo H anti séra, tak se výsledek považuje za pozitivní.

Widalova reakce je klasický aglutinační test, kterým se prokazuje v séru přítomnost protilátek proti O a H antigenům. Pokud jsou v séru přítomny protilátky proti těmto antigenům, tak budou reagovat s příslušným antigenem, celou bakteriální buňkou, v roztoku za vzniku aglutinátu, který je viditelný na testovací destičce nebo v kapiláře. V testu jsou použity celé formaldehydem usmrcené bakteriální buňky s O antigeny *Salmonella typhi* nebo H antigeny

Salmonella paratyphi. Při reakci Ab se somatickým antigenem vzniká tzv. korpuskulární aglutinát, při reakci Ab s flagellárním antigenem vzniká tzv. chomáčkovitý aglutinát. Další verzí aglutinačního testu je tzv. LAT, kde jsou latexové mikročástice potažené O antigeny *Salmonella typhi* a H antigeny *Salmonella paratyphi* a reagují se specifickými protilátkami za vzniku aglutinátu.

6 PROTILÁTKY

Protilátky, též známé jako imunoglobuliny¹⁸⁰, jsou proteiny globulárního charakteru, primárně produkované hlavně plazmatickými buňkami. Tyto proteiny jsou imunitním systémem využívány k identifikaci, označení a odstranění patogenů, bakterií, virů a dalších pro tělo nebezpečných látek.

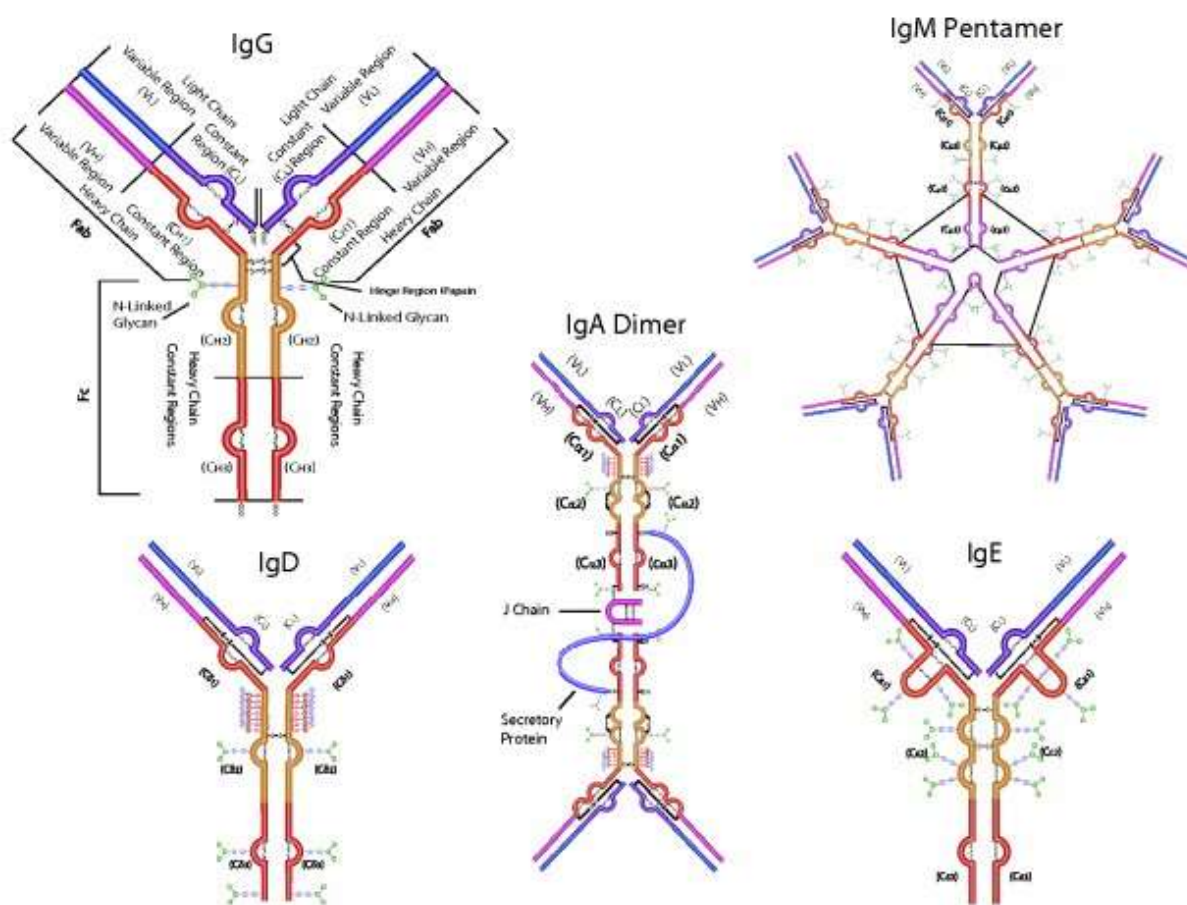


Obrázek 16: Schématické znázornění molekuly imunoglobulinu. Převzato z¹⁸¹.

Protilátky jsou glykoproteiny, které představují většinu gamaglobulinové frakce všech sérových proteinů. Obvykle se molekula protilátky skládá se ze dvou těžkých řetězců („Heavy chain“) a dvou lehkých řetězců („Light chain“) (viz Obrázek 16), které se liší nejen molekulovou hmotností, ale také složením aminokyselin. Řetězce jsou vzájemně spojeny kovalentní disulfidickou vazbou. Disulfidické vazby jsou i v rámci řetězců, jejich hlavní funkce je stabilizace globulární formy molekuly a zvýšení rezistence vůči proteázám. Na obrázku jsou disulfidické vazby znázorněny žlutou barvou.

Rozlišujeme několik izotypů protilátek, tzv. tříd. U savců existuje pět izotypů protilátek známých jako IgA, IgG, IgE, IgD a IgM (viz Obrázek 17). Označují se předponou Ig- imunoglobulin a liší se biologickými vlastnostmi, strukturou, funkčními místy a schopnostmi vázat se s různými formami antigenů¹⁸². Imunoglobuliny G se dle specifické struktury a funkce rozdělují dále na podtřídy IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄. Podobně tomu je i u IgA, IgA₁ a IgA₂.

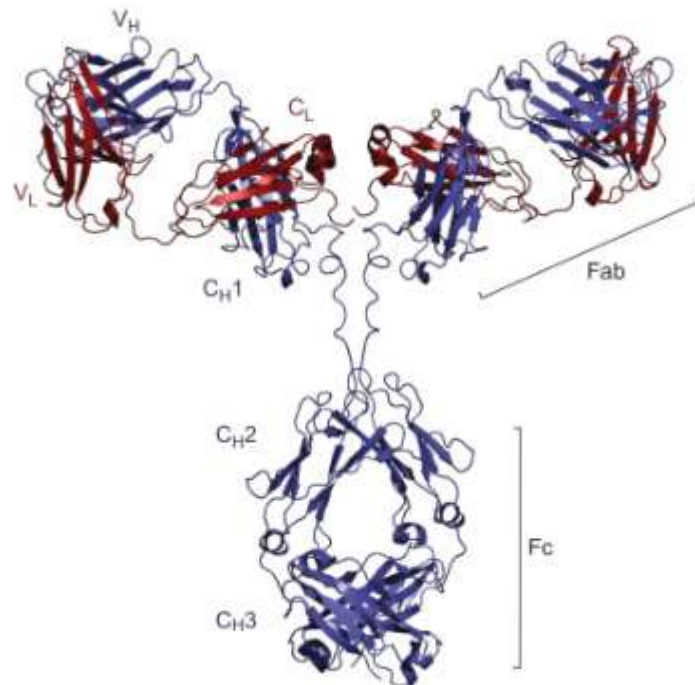
U imunoglobulinů rozlišujeme 5 typů těžkých řetězců, které mají molekulovou hmotnost 50 - 60 kDa. A to, α (alpha), γ (gamma), δ (delta), ϵ (epsilon), and μ (mi). Každý z těžkých řetězců se od sebe liší délkou a složením. α a γ jsou tvořeny zhruba 450 aminokyselinami, zatímco ϵ a μ jsou tvořeny zhruba 550 aminokyselinami¹⁸³. U savců byly identifikovány dva typy lehkých řetězců a to řetězec λ (lambda) a κ (kappa). Lehké řetězce jsou dlouhé od 211 do 217 aminokyselin a mají molekulovou hmotnost 23 – 25 kDa. Skládají ze dvou domén, variabilní domény a konstantní domény. Každá protilátka má vždy jeden typ lehkého řetězce¹⁸⁴.



Obrázek 17: Schématické znázornění struktury imunoglobulinů (IgG, IgD, IgA, IgE, IgM). Převzato z¹⁸⁵.

Základní molekula IgG se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců (viz Obrázek 18), kde je průměrná molekulová hmotnost 150 kDa. Imunoglobuliny jsou dle chemické povahy glykoproteiny. Například imunoglobulin G obsahuje čtrnáct potenciálních N-glykozylačních míst¹⁸⁶, kde mohou probíhat glykozylace. Glykozylace probíhá na Fc části imunoglobulinu a vždy jsou glykozylována minimálně 2 místa. Glykozylace je jednou z nejběžnějších posttranslačních modifikací¹⁸⁷. Při glykozylaci proteinů dochází k adici oligosacharidů na polypeptidový řetězec, následkem čehož se pozmění nativní struktura a často i funkce proteinu.

Molekulová hmotnost se díky glykozylaci zvyšuje až na 180 kDa ¹⁸⁸. S mírou glykozylace souvisí mj. rezistence glykoproteinu vůči proteázám a ovlivňuje stabilitu proteinu a jeho poločas rozpadu (viz Tabulka 4).



Obrázek 18: Struktura molekuly lidského IgG. Protein skládající se ze dvou částí spojených disulfidickými můstky, těžkého (modře) a lehkého (červeně) řetězce. Část lehkého řetězce označena V_L označuje variabilní doménu, zatímco část C_L konstantní doménu lehkého řetězce. Těžký řetězec se skládá z jedné variabilní domény (V_H) a tří konstantních domén (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Schopnost molekuly IgG vázat antigen je zprostředkována jeho Fab oblastí skládající se z heterodimeru V_L/V_H a heterodimeru C_{H1}/C_L . C-terminální část Fc části je tvořena spojením domén C_{H2} a C_{H3} . Fc část zprostředkovává efektorové funkce protilátky a ovlivňuje poločas protilátky v séru. Převzato z ¹⁸⁹.

Rozpoznávání specifických antigenů je zprostředkováno Fab oblastí, zatímco efektorové funkce, např. aktivace komplementu, jsou zajištěny Fc částí protilátky. Fab fragmenty se skládají z variabilních a konstantních domén lehkých a těžkých řetězců a sekvence aminokyselin v této oblasti determinuje specifitu dané protilátky. Fragmenty Fc se skládají pouze z konstantních domén těžkých řetězců a zajišťují komunikaci s buněčnými elementy imunitního systému ¹⁹⁰. Protilátky mají řadu významných funkcí v imunitní odpovědi. Nejdůležitějšími funkcemi jsou opsonizace a neutralizace toxinů, účast při zahájení zánětlivé odpovědi, aktivace cytotoxických reakcí (zprostředkované T_{CD8+} lymfocyty a NK buňkami).

TABLE 1 Properties of Major Immunoglobulin Classes

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Molecular formula	$\kappa_2\gamma_2$ $\lambda_2\gamma_2$	$\kappa_2\alpha_2$ $\lambda_2\alpha_2$	$\kappa_2\mu_2$ $\lambda_2\mu_2$	$\kappa_2\delta_2$ $\lambda_2\delta_2$	$\kappa_2\varepsilon_2$ $\lambda_2\varepsilon_2$
	Monomers	Monomers, dimers (+ SC, + J chain)	Pentamers (+ J chain), hexamers	Monomers	Monomers
Subclasses	γ 1-4	α 1-2	—	—	—
Molecular weight	150,000	160,000	950,000	180,000	190,000
$s_{20, w}$	6.6S	7S, 9S, 11S	19S	7S	8S
Electrophoretic mobility	γ	Fast γ to β	Fast γ to β	Fast γ	Fast γ
Carbohydrates (%)	3	7.5	12	12	12
No. of oligosaccharide chains per constant region	(1)	(5) (α 1-2, + 5 in hinge; α 2-4 or 5)		(3, +4 in hinge)	(6)
Serum level (mg/ml)	~10	~2	~1.2	~0.04	~3 × 10 ⁻⁴
Half life (days)	23 (IgG3: 8)	5-6	5	2.8	2.5
Complement fixation					
Classical	+	-	+	-	~
Alternative	-	+	-	-	-

Tabulka 4: Charakteristika jednotlivých tříd protilátek. Převzato z ¹⁸³.

Koncentrace celkových IgG v séru, tj. nejvíce zastoupeného izotypu, se pohybuje ve fyziologickém rozmezí 8 – 18 g/l ¹⁹¹. Protilátky jsou součástí specifické imunitní odpovědi humorálního typu ⁷. Protilátky mohou vznikat ve dvou fyzikálních formách, v rozpustné formě, kdy jsou protilátky sekretovány plazmatickými buňkami volně do séra a jiných tělních tekutin, nebo v nerozpustné formě, kdy je protilátka připojena na membránu B-lymfocytů a plní funkci receptoru BCR. BCR receptor se nachází pouze na povrchu B-lymfocytů a usnadňuje aktivaci těchto buněk nativní formou antigenu a jejich následnou diferenciaci buď na plazmatické buňky, které vytvářejí sekreční formu protilátky, nebo na paměťové B-lymfocyty. Paměťové buňky zajišťují okamžitou reaktivitu imunitního systému při opakovaném kontaktu organismu s antigenem ¹⁹².

6.1 Avidita a afinita protilátek

Reakce antigenu a protilátky je založena na nekovalentních interakcích, které vznikají kombinací vzniku vodíkových můstků, hydrofobních interakcí, elektrostatistických a van der Waalových sil. Vazebné místo je vždy svým tvarem a rozložením nábojů v něm více či méně komplementární ke struktuře na povrchu antigenu (epitopu), se kterým vytváří komplex. K popisu síly komplexu protilátka-antigen využíváme afinitu a aviditu. Afinita vyjadřuje sílu

mezi interagujícím epitopem s jedním vazebným místem protilátky. Afinita je v biochemii definována jako K_A , tj. asociační konstanta, a je vyjadřována termodynamickými principy jako reversibilní chemická reakce.

$$K_A = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]}$$

K_A - Afinitní konstanta

[Ab]- molární koncentrace volných vazebných míst protilátky

[Ag]- molární koncentrace volných vazebných míst antigen

[Ab - Ag]- molární koncentrace komplexu protilátka-antigen

Jinými slovy K_A popisuje kolik je existujících komplexů protilátka-antigen po dosažení rovnovážného stavu. Doba potřebná k dosažení rovnováhy je závislá na počátečním množství interagujících látek, na rychlosti jejich difuze v kapalném fázi a na reakčním objemu, kde reakce probíhá. Asociační konstanta K_A může nabývat různých hodnot dle typu a kvality protilátek od 10^5 mol^{-1} až do 10^{12} mol^{-1} a může být ovlivněna faktory, jakými jsou např. pH, teplota, typ a molarita pufru.

Afinita protilátek jde poměrně přesně měřit u monoklonálních protilátek (soubor protilátek produkovaných jedním B-lymfocytom proti unikátnímu epitopu), jelikož jsou homogenní a selektivní pouze pro jeden epitop, zatímco polyklonální protilátky (soubor protilátek produkovaných více B-lymfocyty, proti různým epitopům) jsou heterogenní směs protilátek lišících se třídou, epitopovou specifitou i afinitou. Síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem vyjadřuje empirický pojem avidita. Avidita je sumou všech afinit, tj. síla vazby mezi 1 vazebným místem protilátky a jedním epitopem antigenu, navýšená o další tzv. nespecifické interakce molekul ve vodném prostředí. Například desetivalentní molekuly IgM se mohou velmi silně vázat (s velkou aviditou) např. na povrch bakteriální buňky obsahující velký počet blízkých identických antigenních míst, ačkoliv afinita jednotlivých vazebných míst k epitopům bývá nízká. Komplexy antigenů s protilátkami (které také často obsahují komplementové fragmenty) se nazývají imunokomplexy^{193,194}.

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE

7.1 Cíle práce

Cílem práce bylo připravit specifický imunosorbent pro cílené vycytávání patogenních bakterií z kapalných vzorků potravin, konkrétně z mléka. Práce je součástí projektu LOVE FOOD 2 Marker realizovaného na Univerzitě Pardubice v týmu prof. Bílkové. Projekt má za cíl použít imunosorbent pro izolaci, zakoncentrování patogenních bakterií a přenést tyto bakterie do mikroanalyzátoru, kde proběhne lyze bakteriální buňky, extrakce její DNA, pomnožení metodou PCR a nakonec detekce pomocí biosenzoru. Tato metoda by měla díky imunomagnetické separaci výrazně zkrátit kultivační krok a to z původních 18 – 24 hodin na 6 – 8 hodin včetně identifikace zachycených patogenů. Úkolem této práce bylo připravit a ověřit kvalitu imunosorbentu pro zachycení buněk *Salmonella* sp., použít nosič k izolaci buněk z reálného vzorku a vyhodnotit účinnost a selektivitu tohoto nosiče na bázi magnetických mikročástic.

Díličními úkoly bylo:

1. Výběr a hodnocení reaktivity 2 typů specifických protilátek.
2. Vazba těchto specifických protilátek na magnetické částice
3. Imunomagnetická separace patogenních bakterií *Salmonella* sp. z mléka

7.2 Materiál a metody

7.2.1 Reagencie a chemikálie

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), sodná sůl N-hydroxysulfosukcinimidu (sulfo-NHS), 2-(*N*-morfolino)ethansulfonové kyseliny (MES), Hovězí sérový albumin (BSA), Tween 20, byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (). 3,3'-Diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) a PVDF membrána (Immuno-Blot PVDF Membrána, 0.2 μ m) byla zakoupena od Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Primární protilátka: myší monoklonální protilátky IgG proti *Salmonelovému* flagelárnímu proteinu (Virostat, Portland, ME, USA). Sekundární protilátka: koží anti-myší IgG-HRP byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Magnetické mikročástice ProMag™ 1 Series COOH Surface Free od Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, IN, USA). Všechny ostatní použité chemikálie analytické čistoty byly zakoupeny od firmy Penta (Chrudim, Česká republika). Voda použitá pro přípravu pufrů byla filtrována přes TKA Smart2Pure systém (Thermo Scientific TKA, Niederelbert, Německo). Plnotučné UHT mléko (obsah tuku 3.5%) bylo zakoupeno v obchodě s potravinami.

7.2.2 Bakteriální kultury

Salmonella enterica subsp. *enterica* Le Minor and Popoff sérovar *typhimurium* ATCC 43971, *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers ATCC 25922 (z České sbírky mikroorganismů, Brno, Česká republika) byli pěstováni na živném agaru No. 2 (HiMedia, Mumbai, Indie) při 37 °C. Pro techniku Dot-Blot byly použity 18-24 h bakteriální kultury *Salmonella Typhimurium* a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, které byly resuspendovány v PBS-pufu na optickou denzitu 1 při 600 nm. Pro techniku Dot blot byla z této suspenze připravena ředící řada o koncentracích 25, 50, 75 a 100 %. Pro imunomagnetickou separaci byly použity 18 - 24 h kultury *S. Typhimurium* a *E. coli*, které byly resuspendovány v PBS-T pufu na hodnotu zákalu 0,6 McFarlanda (0,6 MF odpovídá zředění 10^8 CFU/ml) Následně byla v mléce připravena řada ředění až po teoretických 10^3 CFU/ml.

7.2.3 Celobuněčný dot-blot

Pro ověření kvality protilátek proti buňkám Salmonel byla použita metoda celobuněčného dot blotu. Tato metoda byla provedena dle publikované metody^{195,196}. Pro tento experiment byl použit přístroj DHM-96 ze Scie-Plast (Cambridge, UK) a vakuová pumpa (0,8 Bar). Na PVDF membránu byla nanášena suspenze bakteriálních buněk (*S. Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica*) o požadované koncentraci, BSA (5 µg) a PBS puf o objemu 100 µl. Po nanášení vzorku na membránu byla provedena blokáce membrány, pomocí 5% roztoku BSA v PBS-T pufu. Blokáce byla prováděna 1 hodinu, na třepačce při laboratorní teplotě. Následně byla na membránu nanášena primární protilátka ředěná 1:1000 (PBS-T). Membrána s primární protilátkou byla inkubována po dobu 1 h, při laboratorní teplotě na třepačce. Po inkubaci byla přidána sekundární protilátka (konjugát s HRP- křenová peroxidáza) ředěná 1:1000 (PBS-T). Inkubace probíhala za stejných podmínek. Vizualizace byla provedena pomocí DAB jako chromogenu a H₂O₂ jako substrátu. Inkubace se substrátovým roztokem (DAB + 1 µl 30% H₂O₂ rozpustit v 10 ml TBS pufu) probíhala po dobu 30 minut, při laboratorní teplotě, na třepačce. Pokud je reakce pozitivní, na membráně se tvoří fialově zbarvený terčík. V opačném případě, pokud je reakce negativní, membrána zůstane bez barevné změny.

7.2.4 Imobilizace protilátek na magnetické mikročástice

Jeden mg mikročástic (ProMag™ 1 Series COOH od Bangs Laboratories, Inc.; Fishers, IN, USA) byl pětkrát promyt 0,1M MES pufrem (1 ml; pH 5) a aktivován pomocí EDC (7,5 mg

EDC ve 0,25 ml 0,1M MES pufru) a sulfo-NHS (1,25 mg ve 0,25 ml 0,1M MES pufru). Objem byl doplněn MES pufrům na 1 ml. Tato suspenze částic byla inkubována při laboratorní teplotě, na rotátoru po dobu 10 minut. Poté byly částice opět promyty 1 ml 0,1M MES pufru pH 5. Po promytí bylo k částicím přidáno 25 µg anti-*Salmonella* IgG a objem byl doplněn na 1 ml. Částice s anti-*Salmonella* IgG byly inkubovány při teplotě 4 °C, na rotátoru přes noc. Posledním krokem je promytí takto biofunkcionalizovaných částic: dvakrát 0,1M MES pH5 pufrům, jednou promýt stejným pufrům obsahujícím 1M NaCl a poté pětkrát promýt opět 0,1M MES pH5 pufrům.

7.2.5 Imunomagnetická separace

Imunomagnetická separace byla provedena ve vsádkovém uspořádání. 50 µg připraveného anti-*Salmonella* nosiče bylo třikrát promyto 1 ml PBS-T pufrům. Takto připravené biofunkcionalizované částice byly smíchány s 50 µl mléka uměle obohaceného *Salmonellovou* kulturou (nebo směsí kultur bakterií *Salmonella* Typhimurium a *E. coli*) o požadovaných koncentracích. Inkubace probíhala na rotátoru, při laboratorní teplotě po dobu 50 minut. Po inkubaci byly komplexy částice-bakterie magneticky separovány, supernatant byl odebrán (VF; vazebná frakce) a promyty 40 µl PBS-T pufru na třepačce, při laboratorní teplotě po dobu 28 minut. Částice byly magneticky separovány a supernatant byl odebrán (PF; promývací frakce). Po promytí byly částice s původní koncentrací buněk 10^3 a 10^4 resuspendovány v 100 µl PBS-T pufru a vyočkovány na živné médium. Částice s původní koncentrací buněk 10^5 a 10^6 byly resuspendovány v 1 ml a vyočkovány dvakrát v objemu 100 µl. VF a PF z původních koncentrací buněk 10^3 a 10^4 byly vyočkovány v celém objemu na živné médium. VF a PF z původních koncentrací buněk 10^5 a 10^6 byly zředěny 210 µl PBS-T pufru a vyočkovány dvakrát v objemu 100 µl na živné médium. Bakterie byly kultivovány 18-24 hodin při 37 °C. Po kultivaci byl spočítán nárůst kolonií u jednotlivých Petriho misek.

7.2.6 Výsev bakterií na Petriho misky a metodika výpočtu při kvantifikaci bakteriálních buněk

Při těchto experimentech byla použita standartní technika kultivace bakterií na Petriho miskách. Počet CFU na plotně byl vyhodnocen a byla vypočtena účinnosti záchytu. Při experimentech s buňkami bakterií *Salmonella* Typhimurium byl pro jejich kultivaci použit živný agar No. 2 (HiMedia, Mumbai, Indie). Při pokusech se smíšenou bakteriální kulturou (*Salmonella* Typhimurium, *E. coli*) byl použit jako živné médium Rambach agar (Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Pro výpočet efektivity záchytu byly použity VF, PF a částice se

zachycenými buňkami. Po 18 - 24 h inkubaci při 37 °C byly spočítány všechny narostlé kolonie. Tato data byla použita pro výpočet efektivity záchytu, dle vzorce:

$$\text{Efektivita záchytu (\%)} = \frac{N_c}{N_t} \times 100$$

N_c – suma veškerých buněk zachycených na částice (CFU/ml)

N_0 – celkový počet buněk v reakci (vazebná frakce, promývací frakce, zachycené buňky)

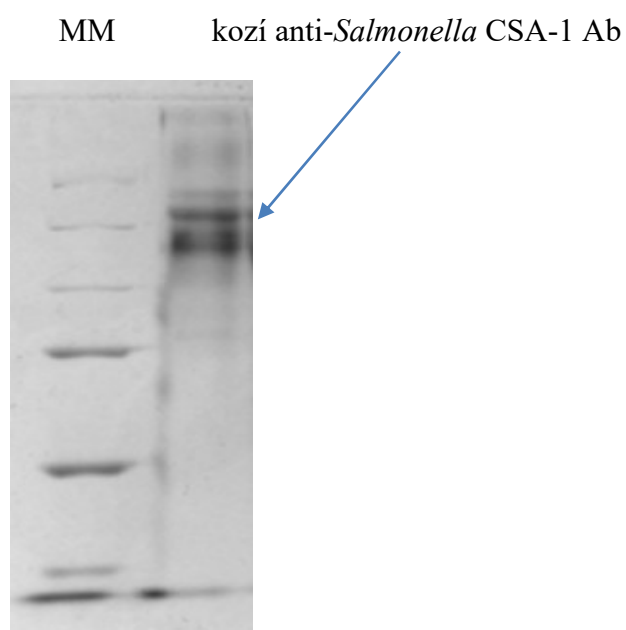
Veškerá stanovení počtů buněk z jednotlivých zředění se prováděla minimálně v triplikátech.

7.3 Výsledky a diskuze

7.3.1 Výběr a hodnocení reaktivity specifických protilátek.

S cílem připravit imunosorbent pro izolaci patogenních bakterií rodu *Salmonella* sp. byly vybrány dva typy specifických protilátek. Jednalo se o protilátky namířené proti somatickému antigenu, kozí anti-*Salmonella* CSA-1 Ab, a proti Salmonelovému flagelárnímu antigenu, myší monoklonální protilátky proti Salmonellovému flagelinu.

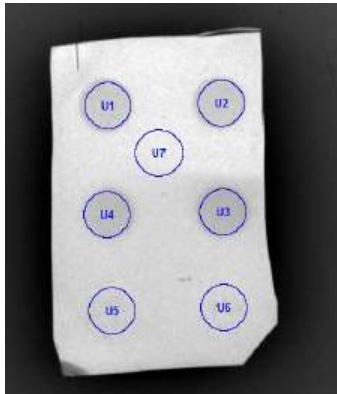
Kvalita protilátek byla hodnocena metodou SDS-PAGE, kde byla stanovena čistota a homogenita IgG protilátek.



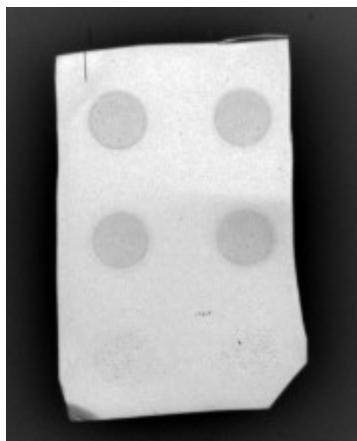
Obrázek 19: Snímek gelu SDS-PAGE. Barveno amoniakálním stříbrem.

Jak je na obrázku zřejmé, protilátky třídy IgG jsou celé, nejsou rozpadlé na jednotlivé řetězce a nejsou fragmentované. Takovéto protilátky je možné použít pro vazbu specifických protilátek na povrch magnetických mikročastic.

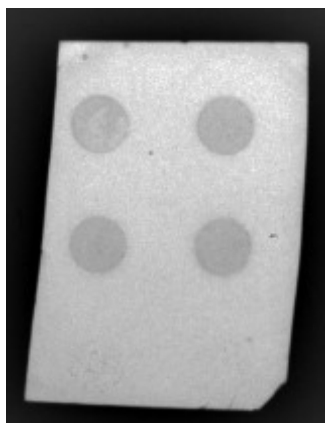
Reaktivita protilátek proti Salmonelovému flagelárnímu proteinu byla hodnocena metodou celobuněčného dot blotu. Pozitivní reakce, tj. reaktivita vybraných protilátek s bakteriálními buňkami, se projevuje intenzivním zbarvením bodu, kde reakce probíhala.



Obrázek 20: Příklad hodnocení reaktivity protilátek. (U1) 25% koncentrace buněk, (U2) 50% koncentrace buněk, (U3) 75% koncentrace buněk, (U4) 100% koncentrace buněk, vztaženo na zákal 1 McFarlanda. (U5) BSA, (U6) PBS-T pufr, (U7) blank.



Obrázek 21: Snímek PVDF membrány s nanesenými vzorky po obarvení. Na této membráně byly naneseny buňky *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Vizualizace pomocí DAB jako chromogenu a H_2O_2 jako substrátu.



Obrázek 22: Snímek PVDF membrány s nanesenými vzorky po obarvení. Na této membráně byly naneseny buňky *Salmonella* Typhimurium. Vizualizace pomocí DAB jako chromogenu a H₂O₂ jako substrátu.

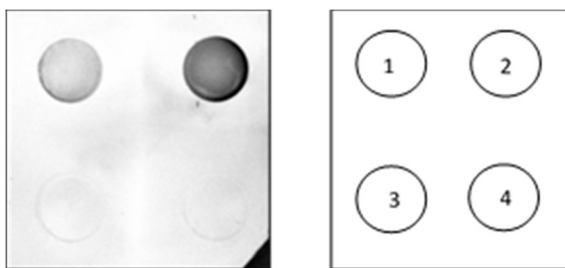
Snímky (obrázky 21, 22) byly vyhodnoceny ChemiDoc™ XRS+ systémem.

Vzorek	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
U1	30 805 847,00	34 477 387,00
U2	30 994 267,00	35 358 943,00
U3	35 560 719,00	38 128 391,00
U4	33 811 679,00	37 769 235,00
U5	30 721 979,00	34 266 023,00
U6	30 004 355,00	33 490 827,00
U7	25 503 419,00	29 773 947,00

Tabulka 5: Denzitometrické vyhodnocení dot blot metody

Ze snímků (Obrázky 21 a 22 a tabulky 5) je patrné, že protilátky nevykazují dostatečnou reaktivitu proti *Salmonelovému* flagellárnímu proteinu, tudíž nejsou vhodné pro přípravu imunosorbentu a následnou imunomagnetickou separaci buněk *Salmonella* sp. z mléka.

Hodnocení reaktivity protilátek (kozí anti-*Salmonella* CSA-1 Ab) proti tělovému antigenu, bylo hodnoceno metodou celobuněčného dotblotu a bylo provedeno paní Mgr. Pavlou Krulišovou.



Obrázek 23: Snímek celobuněčného dot-blotu a schéma aplikace vzorků. (1) Buňky bakterie *Salmonella* sp., (2) LPS 5 μg , (3) BSA 5 μg , (4) PBS pufr. Vizualizace pomocí DAB jako chromogenu a H_2O_2 jako substrátu.

Ze snímku (Obrázek 23) je patrné, že protilátky proti tělovému antigenu vykazují dostatečnou reaktivitu vůči bakteriálním buňkám *Salmonella* sp.

7.3.2 Vazba specifických protilátek na magnetické částice

Jeden mg mikročástic ProMag COOH byl pětkrát promyt 0,1M MES puforem (1 ml; pH 5) a aktivován pomocí EDC (7,5 mg EDC ve 0,25 ml 0,1M MES pufru) a sulfo-NHS (1,25 mg ve 0,25 ml 0,1M MES pufru). Objem byl doplněn MES puforem na 1 ml. Tato suspenze částic byla inkubována při laboratorní teplotě, na rotátoru po dobu 10 minut. Poté byly částice opět promyty 1 ml 0,1M MES puforem pH 5. Po promytí bylo k částicím přidáno 25 μg protilátky, kozí anti-*Salmonella* CSA-1 Ab, a objem byl doplněn na 1 ml. Částice s protilátkou byly inkubovány při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$, na třepačce, přes noc. Po inkubaci byly částice opět promyty, a to dvakrát 0,1M MES pH 5 puforem a jednou stejným puforem obsahujícím 1M NaCl. Následně byly ještě promyty 0,1M MES pH5 puforem.

7.3.3 Imunomagnetická separace patogenních bakterií z mléka

Připravený imunosorbent byl pětkrát promyt PBS-T puforem a následně byly částice magneticky separovány. K 50 μg imunosorbentu bylo přidáno 50 μl UHT mléka, které bylo uměle naočkováno patogenními bakteriemi rodu *Salmonella* při koncentracích 10^3 - 10^6 CFU/ml. Inkubace byla prováděna na třepačce, při laboratorní teplotě, po dobu 50 minut. Poté byly částice magneticky odseparovány, byla odebrána vazebná frakce (VF). Následně byly částice promyty ve 40 μl PBS-T pufru, inkubace probíhala na třepačce, při laboratorní teplotě po dobu 28 minut. Po promytí byly částice opět magneticky separovány a byla odebrána promývací frakce (PF).

Poté byly částice s původní koncentrací buněk 10^5 a 10^6 resuspendovány v 1 ml a vyočkovány dvakrát v objemu 100 μl . VF a PF z původních koncentrací buněk 10^3 a 10^4 byly vyočkovány

v celém objemu na živné médium. VF a PF z původních koncentrací buněk 10^5 a 10^6 byly zředěny 210 μ l PBS-T pufru a vyočkovány dvakrát v objemu 100 μ l na živné médium. Bakterie byly kultivovány 18-24 hodin při 37 °C. Po kultivaci byl spočítán nárůst kolonií u jednotlivých Petriho misek.

Zředění	Počet CFU zachycených na imunosorbent	Počet CFU z VF a PF
10^3	127	33
10^3	158	14
10^3	-	-
10^4	966	61
10^4	820	83
10^4	728	91
10^5	4370	555
10^5	3935	668,5
10^5	3970	-
10^6	23980	4868
10^6	25100	3784
10^6	19600	-

Tabulka 6: Počty zachycených a nenavázaných buněk na imunosorbent. První experiment.

Zředění	Počet CFU zachycených na imunosorbent	Počet CFU z VF a PF
10^3	45	6
10^3	44	13
10^3	47	9
10^4	410	71
10^4	394	82
10^4	459	65
10^5	2285	293
10^5	2895	-
10^5	2410	-
10^6	21035	2305
10^6	16100	2407
10^6	23735	1816

Tabulka 7: Počty zachycených a nenavázaných buněk na imunosorbent. Druhý experiment.

Efektivita záchytu (%) byla vypočtena dle následujícího vztahu:

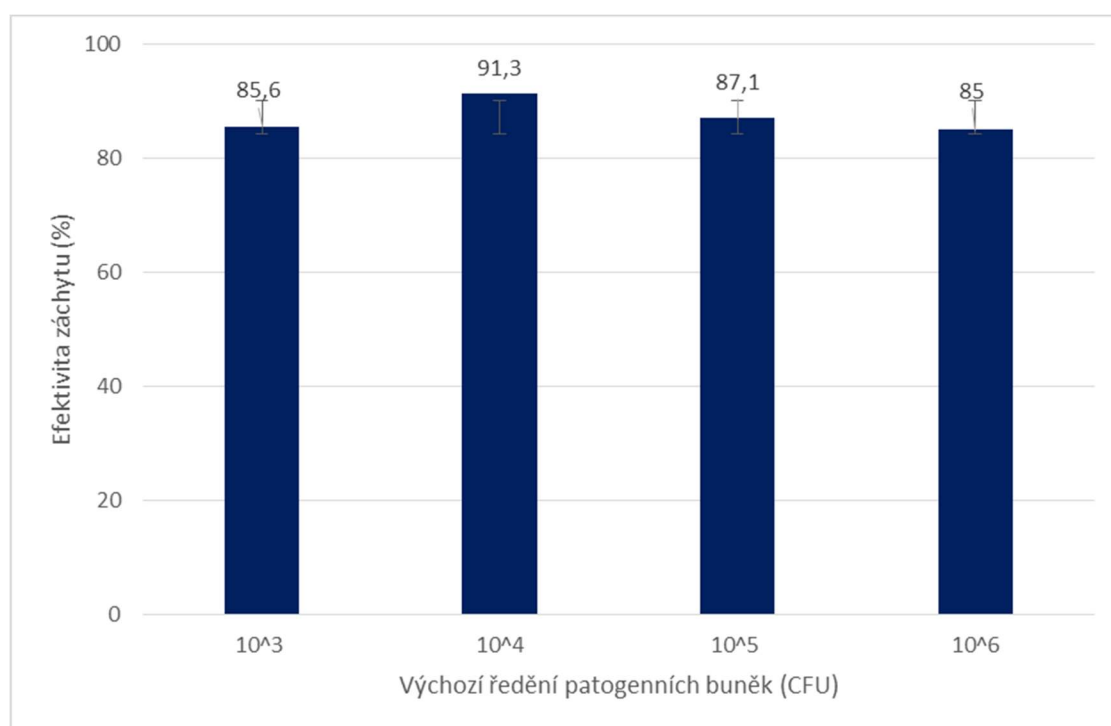
$$Efektivita\ zachytu\ (\%) = \frac{N_c}{N_t} \times 100$$

N_c – suma veškerých buněk zachycených na částice (CFU/ml)

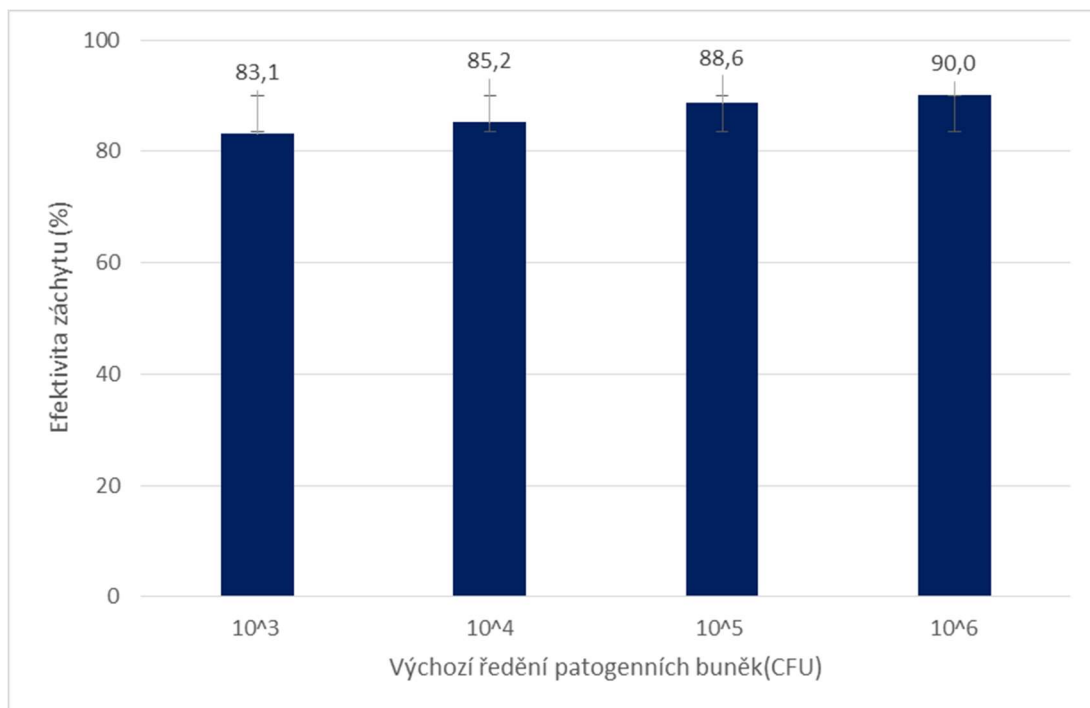
N_0 – celkový počet buněk v reakci (vazebná frakce, promývací frakce, zachycené buňky)

Veškerá stanovení počtů buněk z jednotlivých zředění se prováděla minimálně v triplikátech.

Účinnost zachytu byla vyhodnocena formou grafu, viz Obrázky 24 a 25.



Obrázek 24: Imunomagnetická separace buněk bakterií rodu *Salmonella* Typhimurium. První experiment.



Obrázek 25: Imunomagnetická separace buněk bakterií rodu *Salmonella Typhimurium*. Druhý experiment

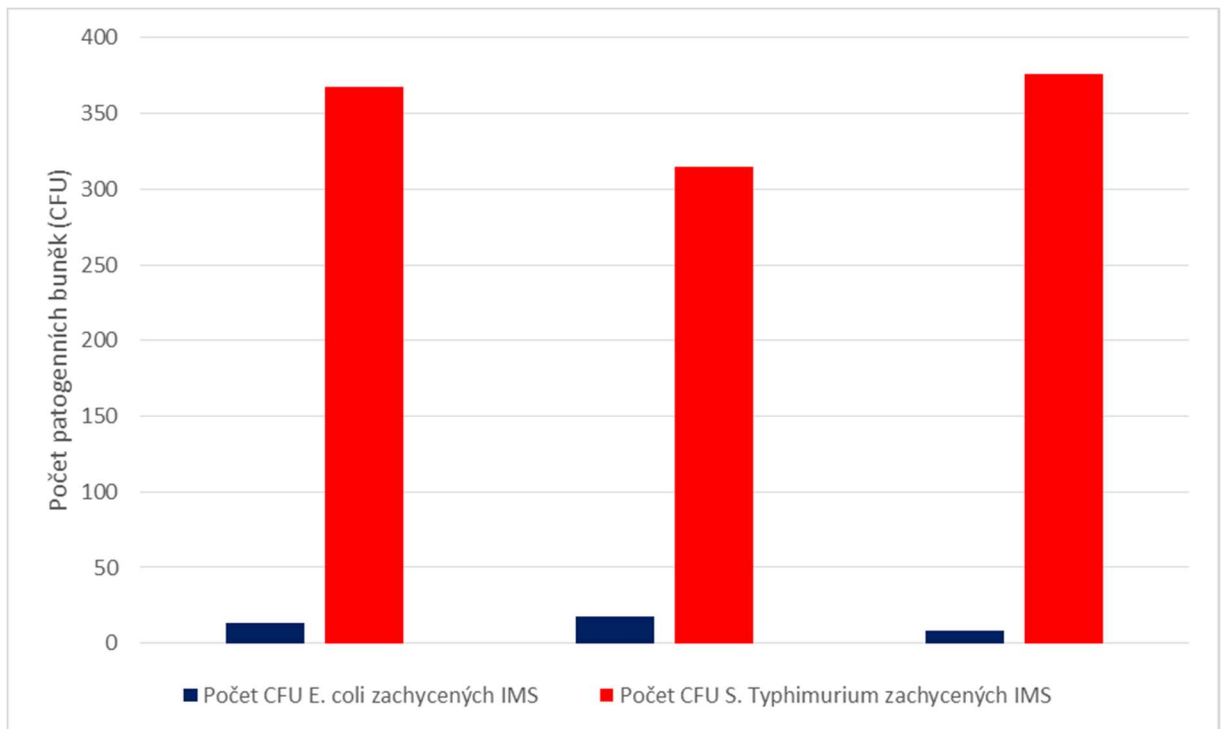
Předpokládané množství buněk v jednotlivých frakcích bylo ověřeno výsevem aliquotů kapalných vzorků mléka před imunomagnetickou separací. Takto bylo určeno celkové množství buněk ve vzorku mléka. Účinnost záchytu byla stanovena v procentech vztaženo k zjištěnému počtu kolonií (CFU) v promývacích a vazebných frakcích (Tabulka 8). Tímto experimentem bylo potvrzeno, že lze pomocí magnetických částic bakteriální buňky *Salmonella* sp. specificky separovat ze vzorku mléka a množství zachycených buněk kvantitativně vyhodnotit.

Další experiment měl potvrdit, zda je nosič dostatečně specifický a nedochází vlivem nespecifické sorpce k záchytu i dalších nepatogenních bakterií a mikroorganismů.

Imunomagnetická separace z mléka infikovaného *S. typhimurium* a *E. coli*.

Počet CFU <i>E. coli</i> zachycených IMS	Počet CFU <i>S. Typhimurium</i> zachycených IMS
13	368
18	315
8	376

Tabulka 8: Počty buněk izolovaných na magnetické částice z jednotlivých triplikátů.



Obrázek 26: Imunomagnetická separace *S. Typhimurium* z mléka uměle infikovaného *S. Typhimurium* a *E. coli* v poměru 1:1.

Z grafu (Obrázek 26) vyplývá, že nosič je dostatečně specifický a přednostně vychytává buňky patogenních bakterií *Salmonella* sp. dle specificity protilátek navázaných na povrch magnetických částic. Při průměrném záhytu buněk patogenní bakterie rodu *Salmonella* Typhimurium, tedy 353 CFU, činila nespecifická sorpce buněk *E. coli* na nosič, v průměru pouze 3,6 %. Při následujících experimentech by bylo vhodné otestovat i ředění, kde bude převaha buněk *E. coli* (např. 100:1, 1000:1).

8 ZÁVĚR

Patogenní bakterie rodu *Salmonella* sp. jsou původci nepříjemných, či život ohrožujících onemocnění. Jedinou účinnou obranou je jejich včasná detekce, nejlépe už u primární potraviny, tedy v našem případě mléka. Současná metodika průkazu bakterií *Salmonella* sp. je zdlouhavá (průkaz včetně identifikace trvá 3 - 5 dní), a náročná, jak na personál, tak na vybavení laboratoře. Cílem naší práce bylo vyvinout nosič, na bázi magnetických částic s kovalentně navázanou protilátkou, který bude efektivně vylučovat buňky patogenních bakterií *Salmonella* sp. z mléka. Tento cíl se nám podařilo splnit. Námi připravený imunisorbent vykazoval efektivitu záchytu až 91,3 %.

9 SEZNAM LITERATURY

1. Custom Affinity Chromatography Service - Creative Biostructure. Creative Biostructure [online]. Copyright © 2005 [cit. 19.03.2017]. Dostupné z: <http://www.creative-biostructure.com/custom-affinity-chromatography-service-257.htm>
2. HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013.
3. TURKOVÁ, Jaroslava. *Bioaffinity chromatography*. Elsevier, 1993.
4. JOHNSTONE, Alan; THORPE, Robin. *Immunochemistry in practice*. Oxford: Blackwell science, 1996.
5. SAFARIK, Ivo; SAFARIKOVA, Mirka. Magnetic nano-and microparticles in biotechnology. *Chemical Papers*, 2009, 63.5: 497-505.
6. PECOVA, Michaela, et al. Biologically active compounds immobilized on magnetic carriers and their utilization in biochemistry and biotechnology. *Chem Listy*, 2011, 105: 524-30.
7. ALBORNOZ, Cecilia; JACOBO, Silvia E. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2006, 305.1: 12-15.
8. KIM, Eun Hee, et al. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, 289: 328-330.
9. WAN, Junxi, et al. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods. *Journal of Crystal Growth*, 2005, 276.3: 571-576.
10. KIMATA, Mitsumasa; NAKAGAWA, Daiki; HASEGAWA, Masahiro. Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide. *Powder Technology*, 2003, 132.2: 112-118.
11. SALAZAR-ALVAREZ, German; MUHAMMED, Mamoun; ZAGORODNI, Andrei A. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chemical engineering science*, 2006, 61.14: 4625-4633.
12. BASAK, Soubir; CHEN, Da-Ren; BISWAS, Pratim. Electrospray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: modified scaling law. *Chemical engineering science*, 2007, 62.4: 1263-1268.
13. SJÖGREN, Carl E., et al. Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magnetic resonance imaging*, 1997, 15.1: 55-67.

14. NUNES, Anthony C.; YU, Zhong-Chen. Fractionation of a water-based ferrofluid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1987, 65.2-3: 265-268.
15. THURM, S.; ODENBACH, S. Magnetic separation of ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2002, 252: 247-249.
16. Digitální knihovna UPa [online]. Copyright ©Yq [cit. 10.02.2017]. Dostupné z: <http://dspace.upce.cz/bitstream/handle/10195/40845/Kissova%20a%20jej%20PH%202011.pdf?sequence=2>
17. HORÁK, Daniel, et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of separation science*, 2007, 30.11: 1751-1772.
18. MARTÍNEZ-MERA, I., et al. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Materials Letters*, 2007, 61.23: 4447-4451.
19. MORRISON, Shannon A., et al. Atomic engineering of mixed ferrite and core-shell nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2005, 5.9: 1323-1344.
20. CORR, Serena A.; RAKOVICH, Yury P.; GUN'KO, Yurii K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. *Nanoscale Research Letters*, 2008, 3.3: 87.
21. CORR, Serena A.; RAKOVICH, Yury P.; GUN'KO, Yurii K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. *Nanoscale Research Letters*, 2008, 3.3: 87.
22. LEE, Seung-Jun, et al. Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, 282: 147-150.
23. HORÁK, Daniel, et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of separation science*, 2007, 30.11: 1751-1772.
24. TADA, Dayane B., et al. Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir*, 2007, 23.15: 8194-8199.
25. TSANG, Shik Chi, et al. Silica-encapsulated nanomagnetic particle as a new recoverable biocatalyst carrier. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110.34: 16914-16922.

26. ZHANG, Chunfu, et al. Silica-and alkoxy silane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging. *Langmuir*, 2007, 23.3: 1427-1434.
27. ZHANG, Jian-Rong GAO. Lian (State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructure, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050); Hydrothermal Synthesis and Characterization of SnO₂ Nanoparticles [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 12.
28. GU, Shunchao; SHIRATORI, Toshiaki; KONNO, Mikio. Synthesis of monodisperse, magnetic latex particles with polystyrene core. *Colloid and Polymer Science*, 2003, 281.11: 1076-1081.
29. YANASE, Noriko, et al. Preparation of magnetic latex particles by emulsion polymerization of styrene in the presence of a ferrofluid. *Journal of applied polymer science*, 1993, 50.5: 765-776.
30. YAN, Junhong, et al. A tosyl-activated magnetic bead cellulose as solid support for sensitive protein detection. *Journal of biotechnology*, 2013, 167.3: 235-240.
31. JOSHI, Abhijeet, et al. Multifunctional alginate microspheres for biosensing, drug delivery and magnetic resonance imaging. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7.11: 3955-3963.
32. QU, Feng, et al. Synthesis of Cibacron Blue F3GA-coupled magnetic PMMA nanospheres and their use for protein affinity separation. *Polymer International*, 2009, 58.8: 888-892.
33. HORAK, Daniel, et al. Hydrazide-Functionalized Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) Microspheres for Immobilization of Horseradish Peroxidase. *Biotechnology progress*, 1999, 15.2: 208-215.
34. PARK, Hye-Young, et al. Fabrication of magnetic core@ shell Fe oxide@ Au nanoparticles for interfacial bioactivity and bio-separation. *Langmuir*, 2007, 23.17: 9050-9056.
35. XU, Zhichuan; HOU, Yanglong; SUN, Shouheng. Magnetic core/shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129.28: 8698-8699.
36. YANG, Piaoping, et al. A magnetic, luminescent and mesoporous core-shell structured composite material as drug carrier. *Biomaterials*, 2009, 30.27: 4786-4795.

37. HORÁK, Daniel, et al. New monodisperse magnetic polymer microspheres biofunctionalized for enzyme catalysis and bioaffinity separations. *Macromolecular bioscience*, 2012, 12.5: 647-655.
38. RASMUSSEN, James R.; STEDRONSKY, Erwin R.; WHITESIDES, George M. Introduction, modification, and characterization of functional groups on the surface of low-density polyethylene film. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99.14: 4736-4745.
39. BROWN, Laurie, et al. Fabrication and characterization of poly (methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents. *Lab on a Chip*, 2006, 6.1: 66-73.
40. CHAN, C.-M.; KO, T.-M.; HIRAOKA, Hiroyuki. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface science reports*, 1996, 24.1-2: 1-54.
41. LONG, Timothy M., et al. Water-vapor plasma-based surface activation for trichlorosilane modification of PMMA. *Langmuir*, 2006, 22.9: 4104-4109.
42. SITUMA, Catherine, et al. Fabrication of DNA microarrays onto poly (methyl methacrylate) with ultraviolet patterning and microfluidics for the detection of low-abundant point mutations. *Analytical biochemistry*, 2005, 340.1: 123-135.
43. PHANER-GOUTORBE, Magali, et al. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: A comparative study. *Materials Science and Engineering: C*, 2011, 31.2: 384-390.
44. HALLIWELL, Catherine M.; CASS, Anthony EG. A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces. *Analytical chemistry*, 2001, 73.11: 2476-2483.
45. JOSHI, Manoj, et al. Silanization and antibody immobilization on SU-8. *Applied surface science*, 2007, 253.6: 3127-3132.
46. SAHOO, Yudhistira, et al. Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109.9: 3879-3885.
47. HAJDÚ, A., et al. Magnetite nanoparticles stabilized under physiological conditions for biomedical application. In: *Colloids for Nano-and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 29-37.
48. MEHRING, Michael, et al. New sol-gel routes to organic-inorganic hybrid materials: Modification of metal alkoxide by phosphonic or phosphinic acids. *Journal of sol-gel science and technology*, 2003, 26.1-3: 99-102.

49. FLESCH, Christophe, et al. Grafting of poly (ϵ -caprolactone) onto maghemite nanoparticles. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2004, 42.23: 6011-6020.
50. LIN, Jun, et al. Gold-coated iron (Fe@ Au) nanoparticles: synthesis, characterization, and magnetic field-induced self-assembly. *Journal of Solid State Chemistry*, 2001, 159.1: 26-31.
51. VAN EWIJK, G. A.; VROEGE, G. J.; PHILIPSE, A. P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, 201.1: 31-33.
52. AUDONNET, Virginie; MALAQUIN, Laurent; VIOVY, Jean-Louis. Polymeric coatings on micro-and nanometric particles for bioapplications. *Bioanalytical Reviews*, 2011, 3.2-4: 41-66.
53. DUGUET, Etienne; DELVILLE, Marie-Hélène; MORNET, Stéphane. 2 Synthesis and Characterisation of Iron Oxide Ferrite Nanoparticles and Ferrite-Based Aqueous Fluids. *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*, 2012, 47.
54. BETANCOURT, Tania, et al. PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2009, 91.1: 263-276.
55. DAVIES, Owen R., et al. Surface modification of microspheres with steric stabilizing and cationic polymers for gene delivery. *Langmuir*, 2008, 24.14: 7138-7146.
56. LACAVALA, L. M., et al. Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Biophysical journal*, 2001, 80.5: 2483-2486.
57. MA, Hui-li, et al. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *International journal of pharmaceutics*, 2007, 333.1: 177-186.
58. TALBERT, Joey N.; HOTCHKISS, Joseph H. Chitosan-tethered microspheres for lactase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 78: 78-84.
59. GODDARD, Julie Melissa; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in polymer science*, 2007, 32.7: 698-725.
60. CAO, Linqiu. Introduction: Immobilized enzymes: Past, present and prospects. *Carrier-bound immobilized enzymes: Principles, application and design*, 2006, 1-52. LIESE, Andreas;

61. HILTERHAUS, Lutz. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42.15: 6236-6249.
62. DAVIES, C. Principles of competitive and immunometric assays (including ELISA). *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques, 4th edn.* Elsevier, Oxford, 2013.
63. HE, J. Practical guide to ELISA development. *The Immunoassay Handbook*, 2013, 381-395.
64. HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013.
65. MORAG, Ely; BAYER, Edward A.; WILCHEK, Meir. Immobilized nitro-avidin and nitro-streptavidin as reusable affinity matrices for application in avidin–biotin technology. *Analytical biochemistry*, 1996, 243.2: 257-263.
66. JOHNSTONE, Alan; THORPE, Robin. *Immunochemistry in practice*. Oxford: Blackwell science, 1996.
67. HERMANSON, Greg T.; MALLIA, A. Krishna; SMITH, Paul Keith. *Immobilized affinity ligand techniques*. Academic Press, 1992.
68. PROCHÁZKA, Vít. Fyzika pevných látek.
69. [online]. Dostupné z: <http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/3313/3392987/blb2307.html>
70. KNOBEL, M., et al. Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: a review on ideal and real systems. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2008, 8.6: 2836-2857.
71. MORALES, M. P., et al. The effect of the distribution of vacancies on the magnetic properties of γ -Fe₂O₃ particles. *Journal of materials research*, 1994, 9.1: 135-141.
72. JILES, David. *Introduction to magnetism and magnetic materials*. CRC press, 2015.
73. ŠAVEL, Josef. *Elektrotechnologie: materiály, technologie a výroba v elektronice a elektrotechnice*. BEN-technická literatura, 2004.
74. BLEANEY, Betty Isabelle; BLEANEY, Betty Isabelle; BLEANEY, Brebis. *Electricity and Magnetism, Volume 2*. Oxford University Press, 2013.
75. NEURAUTER, Axl A., et al. Cell isolation and expansion using Dynabeads®. In: *Cell Separation*. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 41-73.
76. BRONZEAU, Sandrine; PAMME, Nicole. Simultaneous bioassays in a microfluidic channel on plugs of different magnetic particles. *Analytica chimica acta*, 2008, 609.1: 105-112.

77. NOGI, Kiyoshi; NAITO, Makio; YOKOYAMA, Toyokazu. *Nanoparticle technology handbook*. Elsevier, 2012.
78. PAMME, Nicole. Magnetism and microfluidics. *Lab on a Chip*, 2006, 6.1: 24-38.
79. HORÁK, Daniel, et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of separation science*, 2007, 30.11: 1751-1772.
80. MIKHAYLOVA, Maria, et al. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification. *Langmuir*, 2004, 20.6: 2472-2477.
81. DANIEL-DA-SILVA, Ana L.; TRINDADE, Tito. Biofunctional composites of polysaccharides containing inorganic nanoparticles. *Nanotechnology and Nanomaterials*, 2011.
82. Colloidal Dynamics: Leaders in Colloid Measurement [online]. Dostupné z: <http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>
83. [online]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
84. KIM, D. K., et al. Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2001, 225.1: 30-36.
85. FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2010, 7.1: 1-37.
86. INOUE, Katsuya, et al. Oxygenation of ferrous ions in reversed micelle and reversed microemulsion. *J. Phys. Chem.:(United States)*, 1982, 86.8.
87. JAISWAL, Rinku; SINGH, Shripal; PANDE, Hemant. Magnetic Nanoparticles Activated Carbon: Preparation, Characterization and Application: A Review article. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2015, 8.12.
88. HILLAIROU, H., et al. Encapsulation of antiviral nucleotide analogues azidothymidine-triphosphate and cidofovir in poly (iso-butylcyanoacrylate) nanocapsules. *International journal of pharmaceuticals*, 2006, 324.1: 37-42.
89. ZEMB, Thomas; LINDNER, Peter (ed.). *Neutrons, X-rays and light: scattering methods applied to soft condensed matter*. North-Holland, 2002.
90. DE JAEGER, Nicolas, et al. Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy Part I: Monodisperse latices: Influence of scattering angle and concentration of dispersed material. *Particle & particle systems characterization*, 1991, 8.1-4: 179-186.

91. PLOUFFE, Brian D.; MURTHY, Shashi K.; LEWIS, Laura H. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Reports on Progress in Physics*, 2014, 78.1: 016601.
92. TAN, Siun Chee; YIAP, Beow Chin. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *BioMed Research International*, 2009, 2009.)
93. SAFARIK, Ivo; SAFARIKOVA, Mirka. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2004, 2.1: 7.
94. WIDDER, Kenneth J.; SENYEI, Andrew E.; SCARPELLI, Dante G. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo. *Experimental Biology and Medicine*, 1978, 158.2: 141-146.
95. LAVAN, David A.; MCGUIRE, Terry; LANGER, Robert. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature biotechnology*, 2003, 21.10: 1184-1191.
96. AMBASHTA, Ritu D.; SILLANPÄÄ, Mika. Water purification using magnetic assistance: a review. *Journal of hazardous materials*, 2010, 180.1: 38-49.
97. FRANZREB, Matthias, et al. Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 70.5: 505-516.
98. LIU, Kan, et al. Shape-controlled production of biodegradable calcium alginate gel microparticles using a novel microfluidic device. *Langmuir*, 2006, 22.22: 9453-9457.
99. MCKENNA, Timothy F.; SOARES, João BP. Single particle modelling for olefin polymerization on supported catalysts: A review and proposals for future developments. *Chemical Engineering Science*, 2001, 56.13: 3931-3949.
100. KIRKLAND, J. J., et al. Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. *Journal of Chromatography A*, 2000, 890.1: 3-13.
101. FÀBREGA, Anna; VILA, Jordi. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, 2013, 26.2: 308-341.
102. VLKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie*. 2. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2009. ISBN 978-80-213-1988-2.
103. DIÓSZEGHY, Zoltán, et al. Stabilization of flagellar filaments by HAP2 capping. *FEBS letters*, 2004, 568.1-3: 105-109.
104. Visuals Unlimited. Science Stock Photography Specialists | Visuals Unlimited [online]. Copyright © Visuals Unlimited [cit. 19.03.2017]. Dostupné

z: http://visualsunlimited.photoshelter.com/galleryimage/Salmonella/G0000vLM7YcISQG0/I0000JFCc_So53y0

105. Unlocking the secrets of nature's nanomotor Nikkei Asian Review, 2014.
106. MACNAB, Robert M. How bacteria assemble flagella. *Annual Reviews in Microbiology*, 2003, 57.1: 77-100.
107. [online]. Dostupné z: http://proteopedia.org/wiki/index.php/Flagella,_bacterial
108. WADA, Takeo, et al. EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 2011, 193.7: 1600-1611.
109. BLAIR, David F. How bacteria sense and swim. *Annual Reviews in Microbiology*, 1995, 49.1: 489-520.
110. AIZAWA, Shin-Ichi. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*, 1996, 19.1: 1-5.
111. KAWAGISHI, Ikuro, et al. Characterization of the flagellar hook length control protein fliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 1996, 178.10: 2954-2959.
112. EMERSON, Suzanne U.; TOKUYASU, Kiyoteru; SIMON, Melvin I. Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science*, 1970, 169.3941: 190-192.
113. CHILCOTT, Gavin S.; HUGHES, Kelly T. Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64.4: 694-708.
114. fliC - Flagellin - *Salmonella typhimurium* (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720) - fliC gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 22.11.2016]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06179>
115. fljB - Phase 2 flagellin - *Salmonella typhimurium* (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720) - fljB gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 22.11.2016]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P52616>
116. YANAGIHARA, Shigehiro, et al. Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes & genetic systems*, 1999, 74.3: 105-111.
117. BARTLETT, D. H.; FRANTZ, B. B.; MATSUMURA, P. Flagellar transcriptional activators FlbB and FlaI: gene sequences and 5'consensus sequences of operons under FlbB and FlaI control. *Journal of bacteriology*, 1988, 170.4: 1575-1581.

118. LIU, Xiaoying, et al. The C-terminal region of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase is required for transcriptional activation of the flagellar level II operons by the FlhD/FlhC complex. *Journal of bacteriology*, 1995, 177.17: 5186-5188.
119. LIU, Xiaoying; MATSUMURA, Philip. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the Escherichia coli flagellar class II operons. *Journal of bacteriology*, 1994, 176.23: 7345-7351.
120. OHNISHI, Kouhei, et al. Gene fliA encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in Salmonella typhimurium. *Molecular and General Genetics MGG*, 1990, 221.2: 139-147.
121. OHNISHI, K., et al. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of Salmonella typhimurium: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific Sigma factor, σ^F . *Molecular microbiology*, 1992, 6.21: 3149-3157.
122. HELMANN, John D.; CHAMBERLIN, Michael J. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in Escherichia coli and Salmonella typhimurium is controlled by an alternative sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84.18: 6422-6424.
123. GILLEN, KAREN L.; HUGHES, Kelly T. Molecular characterization of flgM, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in Salmonella typhimurium. *Journal of bacteriology*, 1991, 173.20: 6453-6459.
124. KARLINSEY, Joyce E., et al. Completion of the hook-basal body complex of the Salmonella typhimurium flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Molecular microbiology*, 2000, 37.5: 1220-1231.
125. HUGHES, Kelly T., et al. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 1993, 262: 1277-1277.
126. KUTSUKAKE, Kazuhiro. Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in Salmonella typhimurium. *Molecular and General Genetics MGG*, 1994, 243.6: 605-612.
127. ANDREWES, F. W. Studies in group-agglutination I. The salmonella group and its antigenic structure. *The Journal of Pathology*, 1922, 25.4: 505-521.

128. HAYKINSON, Michael J., et al. The Hin dimer interface is critical for Fis-mediated activation of the catalytic steps of site-specific DNA inversion. *Current Biology*, 1996, 6.2: 163-177.
129. GILLEN, KAREN L.; HUGHES, Kelly T. Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 1991, 173.7: 2301-2310.
130. FIERER, Joshua; GUINEY, Donald G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of clinical investigation*, 2001, 107.7: 775-780.
131. WILSON, Dan R.; BEVERIDGE, Terry J. Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Canadian journal of microbiology*, 1993, 39.5: 451-472.
132. HAYASHI, Fumitaka, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001, 410.6832: 1099-1103.
133. COOKSON, Brad T.; BEVAN, Michael J. Identification of a natural T cell epitope presented by *Salmonella*-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice. *The Journal of Immunology*, 1997, 158.9: 4310-4319.
134. FIERER, Joshua; GUINEY, Donald G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of clinical investigation*, 2001, 107.7: 775-780.
135. IKEDA, Jack S., et al. Flagellar Phase Variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Contributes to Virulence in the Murine Typhoid Infection Model but Does Not Influence *Salmonella*-Induced Enteropathogenesis. *Infection and immunity*, 2001, 69.5: 3021-3030.
136. ZIEG, Janine, et al. Recombinational switch for gene expression. *Science*, 1977, 196.4286: 170-172.
137. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences, 2015.
138. WHO | *Salmonella* (non-typhoidal). 301 Moved Permanently [online]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
139. MCQUISTON, John R., et al. Do *Salmonella* carry spare tyres?. *Trends in microbiology*, 2008, 16.4: 142-148. Grimont P. A. D., Weill F.-X. (2007):
140. NESTER, Eugene W., et al. *Microbiology: A Human Perspective*, 4th. 2004.
141. GRIMONT, Patrick AD, et al. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 2007, 9.

142. HEYMANN, David L., et al. *Control of communicable diseases manual*. American Public Health Association, 2008.
143. WHITAKER, Jennifer A., et al. Rethinking typhoid fever vaccines: implications for travelers and people living in highly endemic areas. *Journal of travel medicine*, 2009, 16.1: 46-52.
144. HASHIMOTO, Yasuhiro, et al. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of ViaB region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*. *Journal of bacteriology*, 1993, 175.14: 4456-4465.
145. HEYNS, K.; KIESSLING, G. Strukturaufklärung des vi-antigens aus *Citrobacter freundii* (E. coli) 5396/38. *Carbohydrate Research*, 1967, 3.3: 340-353.
146. HONE, DAVID M., et al. A galE via (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infection and immunity*, 1988, 56.5: 1326-1333.
147. LOONEY, R. John; STEIGBIGEL, Roy T. Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 1986, 108.5: 506-516.
148. HORNICK, R_B, et al. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *New England journal of medicine*, 1970, 283.14: 739-746.
149. ARRICAU, Nathalie, et al. The RcsB–RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Molecular microbiology*, 1998, 29.3: 835-850.
150. NESTER, Eugene W., et al. *Microbiology: A Human Perspective*, 4th. 2004.
151. PAUČKOVÁ, V., et al. Mikrobiologické vyšetřovací metody. *Laboratorní diagnostika nefermentujících gramnegativních tyčinek*. Avicenum, Praha, 1989.
152. VLKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie*. 2. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2009. ISBN 978-80-213-1988-2.
153. MITTAL, Rohit, et al. The acetyltransferase activity of the bacterial toxin YopJ of *Yersinia* is activated by eukaryotic host cell inositol hexakisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285.26: 19927-19934
154. INGRAHAM, John L., et al. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987.
155. ALEŠ, Macela, et al. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Grada Publishing as, 2006.

156. GALÁN, Jorge E.; WOLF-WATZ, Hans. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 2006, 444.7119: 567-573.
157. SCHRAIDT, Oliver, et al. Topology and organization of the Salmonella typhimurium type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog*, 2010, 6.4: e1000824.
158. CHAKRAVORTTY, Dipshikha, et al. Formation of a novel surface structure encoded by Salmonella Pathogenicity Island 2. *The EMBO journal*, 2005, 24.11: 2043-2052.
159. TOWNSEND, Stacy M., et al. Salmonella enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infection and immunity*, 2001, 69.5: 2894-2901.
160. OCHMAN, Howard; LAWRENCE, Jeffrey G.; GROISMAN, Eduardo A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 2000, 405.6784: 299-304.
161. NUCCIO, Sean-Paul; BÄUMLER, Andreas J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71.4: 551-575
162. ALTHOUSE, Carrie, et al. Type 1 fimbriae of Salmonella enterica serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and immunity*, 2003, 71.11: 6446-6452.
163. HOŘEJŠÍ, Václav; BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie. 4. vydání. Praha: TRITON, 2009. 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.*
164. ŠTERZL, Ivan. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0972-X.*
165. [online]. Dostupné z: http://sites.ffclrp.usp.br/pbbg/english/research/pla2/PLA2_index.htm
166. MUMY, Karen L., et al. Distinct isoforms of phospholipase A2 mediate the ability of Salmonella enterica serotype typhimurium and Shigella flexneri to induce the transepithelial migration of neutrophils. *Infection and immunity*, 2008, 76.8: 3614-3627.
167. SMITH, Anthony David; DATTA, Satya Prakash; SMITH, G. Howard. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, 1997.
168. LENNARZ, William J.; LANE, M. Daniel. *Encyclopedia of biological chemistry*. Academic Press, 2013.

169. Stefan Inst.: Dept. Biochem. & Mol. Biol. [online]. Copyright © [cit. 11.1.2017].
Dostupné
z: <http://bio.ijs.si/~krizaj/group/Predavanja%202011/Biochemistry%20Lipids%20Lipoproteins%20and%20Membranes/11.pdf>
170. CHALMEAU, Jerome, et al. α -Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 2011, 1808.1: 271-278.
171. BHAKDI, S., et al. The hemolysin of Escherichia coli. *European journal of epidemiology*, 1988, 4.2: 135-143.
172. THOMPSON, James R., et al. Rapid assembly of a multimeric membrane protein pore. *Biophysical journal*, 2011, 101.11: 2679-2683.
173. Salmonella - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf. National Center for Biotechnology Information [online]. Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch [cit. 12.01.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>
174. MIKI, Tsuyoshi, et al. Characterization of Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion-dependent hemolytic activity in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbial pathogenesis*, 2004, 37.2: 65-72.
175. MATSUI, Hidenori, et al. Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to Salmonella enterica serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *Journal of bacteriology*, 2001, 183.15: 4652-4658.
176. MCCLELLAND, Michael, et al. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 2001, 413.6858: 852-856.
177. PERNA, Nicole T., et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7. *Nature*, 2001, 409.6819: 529-533.
178. LIU, Shu-Lin; HESSEL, Andrew; SANDERSON, Kenneth E. The XbaI-BlnI-CeuI genomic cleavage map of Salmonella enteritidis shows an inversion relative to Salmonella typhimurium LT2. *Molecular microbiology*, 1993, 10.3: 655-664.
179. ČSN EN ISO 6785 (560646) Mléko a mléčné výrobky – Průkaz bakterií rodu *Salmonella*. 1. 1. 2009.
180. PAUDEL, Subhash. *Shear thinning in monoclonal antibodies*. 2016. PhD Thesis. Kansas State University.

181. Antibody Structure . ELISA Antibody, protocol and troubleshooting [online]. Copyright © Copyright 2004 [cit. 19.03.2017]. Dostupné z: <http://www.elisa-antibody.com/elisa-antibody/elisa-antibody-structure>
182. LITMAN, Gary W., et al. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Molecular biology and evolution*, 1993, 10.1: 60-72.
183. BORGHESI, Lisa; MILCAREK, Christine. From B cell to plasma cell. *Immunologic research*, 2006, 36.1-3: 27-32.
184. WOOFF, Jenny M.; BURTON, Dennis R. Human antibody–Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4.2: 89-99.
185. Antibody Basics | Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services. | Sigma-Aldrich [online]. Copyright ©matologie 1983 [cit. 19.03.2017]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html>
186. IGSF1 - Immunoglobulin superfamily member 1 precursor - Homo sapiens (Human) - IGSF1 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 19.03.2017]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N6C5>
187. BRANDTZAEG, Per; FJELLANGER, Ivar; GJERULDSEN, Sven T. Human secretory immunoglobulins. *European Journal of Haematology*, 1970, 7.S12: 1-83.
188. ARNOLD, James N., et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25: 21-50.
189. PelB leader sequence - ScienceDirect Topics. 307 Temporary Redirect [online]. Copyright © 2016 Elsevier B.V. or its licensors or contributors. [cit. 19.03.2017]. Dostupné z: http://topics.sciencedirect.com/topics/page/PelB_leader_sequence
190. NEZLIN, Roald. *The immunoglobulins: structure and function*. Academic Press, 1998.
191. TOMASI, Thomas B.; BIENENSTOCK, John. Secretory immunoglobulins. *Advances in immun*
192. SPIEGELBERG, Hans L. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subcl
193. JOHANSSON, S. G. O.; BENNICH, H.; WIDE, L. A new class of immunoglobulins in human serum. *Immunology*, 1968, 14.2: 265.
194. Affinity and Avidity of Antibodies | Bio-Rad. Bio-Rad Antibodies | Reagents, Antigens & Kits | Formerly AbD Serotec [online]. Copyright © 2017 [cit.

19.03.2017]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/antigen-antibody-interactions.html>

195. SVOBODOVA, Z., et al. Dot-ELISA Affinity Test: An Easy, Low-Cost Method to Estimate Binding Activity of Monoclonal Antibodies. *J. Anal. Bioanal. Tech*, 2013, 4.3.
196. KUČEROVÁ, Jana, et al. Quality evaluation of commercial anti-Salmonella antibodies for immunomagnetic separation using whole-cell dot blot. *Scientific papers of the University of Pardubice. Series A, Faculty of Chemical Technology. 19 (2013)*, 2013.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění průběhu bioafinitní chromatografie.

Obrázek 2: Morfologické typy magnetických mikročastic.

Obrázek 3: Schématicky znázorněný průběh vazby IgG na magnetické částice .

Obrázek 4: Typy chování magnetických materiálů.

Obrázek 5: Hysterezní křivka feromagnetického materiálu.

Obrázek 6: Magnetická křivka paramagnetického (1) a superparamagnetického (2) materiálu.

Obrázek 7: Chování feromagnetických a superparamagnetických materiálu v přítomnosti a nepřítomnosti magnetického pole.

Obrázek 8: Elektrochemické vlastnosti mikročastic ve vodných roztocích.

Obrázek 9: Hodnoty zeta potenciálu na povrchu mikročastic ve vztahu k pH vodného roztoku.

Obrázek 10: Snímek buněk *S. Typhimurium* zachycený pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).

Obrázek 11: Schématické znázornění bakteriálního bičíku.

Obrázek 12: Snímek transmisního elektronového mikroskopu zachycující izolované T3SS *Salmonella Typhimurium*.

Obrázek 13: Snímky zachycující T3SS bakterie *Salmonella Typhimurium*.

Obrázek 14: Schématické znázornění působení bakteriálních fosfolipáz na molekulu fosfatidylcholinu.

Obrázek 15: Kompletní genová sekvence *Salmonella typhimurium* LT2 a porovnání homologie genů s příbuznými bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*.

Obrázek 16: Schématické znázornění molekuly imunoglobulinu.

Obrázek 17: Schématické znázornění struktury imunoglobulinů (IgG, IgD, IgA, IgE, IgM).

Obrázek 18: Struktura molekuly lidského IgG.

Obrázek 19: Snímek gelu SDS-PAGE.

Obrázek 20: Snímek PVDF membrány s nanesenými vzorky po obarvení. Na této membráně byly naneseny buňky *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

Obrázek 21: Snímek PVDF membrány s nanesenými vzorky po obarvení. Na této membráně byly naneseny buňky *Salmonella* Typhimurium.

Obrázek 22: Příklad hodnocení reaktivity protilátek.

Obrázek 23: Snímek celobuněčného dot-blotu a schéma aplikace vzorků.

Obrázek 24: Imunomagnetická separace buněk bakterií rodu *Salmonella* Typhimurium. První experiment.

Obrázek 25: Imunomagnetická separace buněk bakterií rodu *Salmonella* Typhimurium. Druhý experiment

Obrázek 26: Imunomagnetická separace *S. Typhimurium* z mléka uměle infikovaného *S. Typhimurium* a *E. coli* v poměru 1:1.

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní charakteristika genomu *Salmonella* Typhimurium LT2.

Tabulka 2: Srovnání společných genových sekvencí u několika sérovarů *S. enterica* a příbuznými bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*.

Tabulka 3: Typy konfirmačních testů pro konfirmaci bakterií *Salmonella* sp.

Tabulka 4: Charakteristika jednotlivých tříd protilátek.

Tabulka 5: Denzitometrické vyhodnocení dot blot metody

Tabulka 6: Počty zachycených a nenavázaných buněk na imunosorbent. První experiment.

Tabulka 7: Počty zachycených a nenavázaných buněk na imunosorbent. Druhý experiment.

Tabulka 8: Počty buněk izolovaných na magnetické částice z jednotlivých triplikátů.