



# VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

<b>Klasifikace:</b> Draft	<input type="checkbox"/> <i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
Oponovaný draft	<input type="checkbox"/> <i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
Finální dokument	<input type="checkbox"/> <i>Pro oficiální použití</i>
Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Pro veřejné použití</i>

## Název dokumentu:

**Bioanalytické metody pro hodnocení  
bezpečnosti zemědělských surovin a produktů**

## Poznámka:

### Zpracoval:

Garant: Ing. Václav Stejskal, PhD (VÚRV, v.v.i.), Prof. Ing. Jana Hajšlová (VŠCHT Praha)  
ve spolupráci s Doc.Ing. Vladimírem Kocourkem (VŠCHT Praha)

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 - Ruzyně**

Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytopsanitary.org>

## Souhrn

Použití moderních bioanalytických metod při kontrole / monitoringu potravinových surovin a produktů umožňuje nejenom snížení nákladů na provedení analýzy, ale přispívá i k omezení výdajů na skladování neprověřeného materiálu či minimalizaci prodlev ve výrobě nebo prodeji hotových výrobků. Rychlé a dostatečně přesné bioanalytické metody umožní podstatně zvýšit rozsah kontroly kvality a zdravotní nezávadnosti, což dále podpoří důvěru spotřebitelů v produkční i zpracovatelskou sféru. Zapojení biosenzorů kombinujících rozpoznávací schopnosti biomolekul s elektronickými nebo optickými transduktory do systému kritických bodů (HACCP) umožňuje rovněž řízení rizik v reálném čase, případně efektivní a rychlou validaci CCP.

Ve studii je uveden přehled vybraných bioanalytických metod pro analýzu chemických kontaminantů v potravinách, které jsou využitelné v rámci screeningové strategie, nebo jako samostatné analytické postupy. Principy enzymové imunoanalýzy na pevné fázi (ELISA) jsou shrnuty podle použitých formátů a typů pevné fáze, přičemž jsou uvedeny příklady z vývoje postupů stanovení některých zástupců mykotoxinů, reziduí pesticidů a procesních kontaminantů. Podrobně jsou diskutovány též principy imunoafinitní chromatografie a lateral flow immunochromatography - tzv. strip testů. Jsou také naznačeny možnosti konstrukce biosenzorů s ohledem na jejich rozpoznávací i transduktorovou část. Detailně je probírán imunoafinitní senzor založený na povrchové plazmonové rezonanci (SPR), který dnes díky komerčně dostupným komponentům nachází uplatnění zejména v analýze reziduí veterinárních farmak.

Studie přesvědčivě ilustruje výhody bioanalytických metod, které představují komplementární strategii ke stávajícím, často velmi nákladným instrumentálním postupům.

## Summary

The use of modern bioanalytical methods within the surveillance or monitoring of food contaminants results not only in a decrease of testing costs but also of expenses associated with any lag in storage, processing or marketing of crops and foods.

Fast and cheap bioanalytical methods with sufficient accuracy are essential for the extensive testing of food commodities. The application of biosensors, combining recognition capabilities of biomolecules with electronic or optical transducers, in the HACCP system can be used either for the real-time risk management or (at least) for the effective CCP verification.

Bioanalytical methods available for analysis of chemical contaminants in food are presented in this study. They are commonly used as a part of screening strategy or as autonomous analytical procedures. Principles of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) are classified according to employed formats and forms of solid phase. Examples of development / implementation of new approaches for determination of mycotoxin representatives, pesticide residues and food processing contaminants are described. Principles of immunoaffinity chromatography and lateral flow immuno-chromatography are explained. Possible constructions of biosensors considering their recognition and transduction part are described in the second part of the study. Surface plasmon resonance (SPR) immunoaffinity biosensor is presented in details because of its wide use in detection of residues of veterinary drugs due to the availability of commercial kits. Some of examples of methods using SPR for this purpose are presented.

This study clearly illustrates advantages of bioanalytical methods and documents their complementary role to existing, often very expensive, instrumental approaches.

# Obsah

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>4</b>
<b>2 IMUNOCHEMICKÉ METODY .....</b>	<b>5</b>
2.1 Definice reagujících molekul .....	5
2.2 Křížová reaktivita a matriční efekty při použití imunochemických metod.....	6
2.3 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) .....	8
2.3.1 Význam a provedení enzymatického značení.....	8
2.3.2 Využití proteinů jako nosičů imobilizované složky a blokujícího prvku .....	9
2.3.3 Rozdělení techniky ELISA podle formátů.....	9
2.3.4 Nekompetitivní ELISA (sendvičová) .....	10
2.3.5 Kompetitivní ELISA .....	11
2.3.6 Rozdělení techniky ELISA podle použité pevné fáze .....	15
2.3.7 Příklady aplikací techniky ELISA v analýze kontaminantů .....	17
2.4 Imunoafinitní chromatografie .....	21
2.4.1 Stanovení mykotoxinů pomocí imunoafinitních kolonek .....	21
2.4.2 Plošná imunochromatografie (strip testy).....	22
2.5 Radioimunoanalýza (RIA).....	25
<b>3 METODY VYUŽÍVAJÍCÍ BIOSENZORY .....</b>	<b>27</b>
3.1 Konstrukce biosensorů.....	27
3.1.1 Biokatalytické senzory .....	27
3.1.2 Bioafinitní (imunochemické) senzory .....	29
3.2 Konstrukce a princip SPR imunosenzoru .....	34
3.2.1 Interpretace senzogramu.....	37
3.2.2 Regenerace povrchu .....	38
3.2.3 Výhody použití SPR biosenzorů.....	39
3.2.4 Příklady aplikace SPR biosenzorů v analýze kontaminantů.....	39
<b>4 POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>48</b>

# 1 Úvod

Při vymezení pojmu bioanalytické metody se v zásadě lze setkat se dvěma odlišnými koncepty. První z nich zahrnuje alternativní přístupy k analýze „biomolekul“. Druhý, potom vykládá termín jako **soubor technik využívajících biologické molekuly k získání biospecifické interakce umožňující kvalitativní nebo kvantitativní stanovení stanovovaných látek (analytů)**.

V této studii se pozornost zaměřuje na druhou z uvedených skupin, tedy na ty techniky, které vycházejí ze schopnosti klíčových biologických molekul, jako jsou protilátky či receptory, rozpoznat jedinečné strukturní vlastnosti analytu. Případně se též využívá schopnost celých buněk nebo dokonce organismů poskytnout diagnostický signál specifický pro určité analyty.

Bioanalytické metody tradičně nacházejí využití v řadě oborů zahrnujících různá diagnostická vyšetření v lékařství, zkoumání struktury DNA a jejích modifikací v genetice a další. Široké uplatnění nachází ale i v oblasti analýzy potravin, zejména při tzv. screeningových vyšetřeních.

Níže uvedená **Tabulka I** shrnuje přednosti a limitující faktory imunoanalytických postupů, které jsou v praxi nejrozšířenější. V následujících kapitolách jsou detailněji představeny principy a aplikace imunochemických metod, zvláště pak enzymové imunoanalýzy na pevné fázi (ELISA) a metod využívajících biosenzory.

**Tabulka I.** Výhody a limitující faktory bioanalytických metod

Výhody	Limitující faktory
<ul style="list-style-type: none"><li>• Citlivé a specifické</li><li>• Jednoduché a rychlé stanovení s možností automatizace</li><li>• Malé objemy vzorků – velká průchodnost</li><li>• Variabilní použití</li><li>• Použitelné i v terénu</li><li>• Cenově výhodné</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nákladný a dlouhodobý vývoj, obtížný zejména ve fázi syntézy protilátek k haptenům</li><li>• Nebezpečí ovlivnění křížovou reaktivitou a nespecifickými interakcemi</li><li>• Potřeba nezávislého posouzení výsledků (konfirmasi)</li></ul>

## 2 Imunochemické metody

Z bioanalytických metod zaujímají přední místo techniky založené na specifické reakci mezi protilátkami a antigeny, přičemž je k detekci proběhnutí reakce možné využít značení jednoho z reaktantů. Ke značení se v minulosti často používaly radioaktivní izotopy v metodě RIA (radioimmunoassay), které v současnosti v naprosté většině aplikací nahradilo značení enzymy - ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Některé aplikace založené na specifické vazbě mezi protilátkou a antigenem, jako například imunoafinitní chromatografie a určité typy biosenzorů, nevyžadují použití značky.

Reakce mezi antigenem a protilátkou je realizována prostřednictvím sil krátkého dosahu (van der Waalovy síly, vodíkové vazby, Coulombovské a hydrofobní interakce). Pevnost těchto vazeb je často srovnatelná s pevností kovalentních vazeb, ale energie nutná k jejich vzniku a rozrušení je mnohem nižší. Biomolekuly a jejich konjugáty jsou zpravidla citlivé už k malým změnám pH, čehož se využívá při rozrušení vazby mezi antigenem a protilátkou.<sup>1,2,3</sup>

### 2.1 Definice reagujících molekul

Na úvod je vhodné nejprve v krátkosti definovat termíny monoklonální a polyklonální protilátky a antigen, protože jejich vlastnosti bezprostředně ovlivňují pracovní charakteristiky bioanalytických metod.

**Protilátky** jsou proteiny produkované bílými krvinkami obratlovců jako reakce na vniknutí chemické sloučeniny nebo mikroorganismu. K laboratorní přípravě protilátek slouží převážně myši, králíci a pro větší objemy potom kozy, prasata a koně. Podle způsobu přípravy rozeznáváme **monoklonální** a **polyklonální** protilátky. V případě, že invazivní činitel (antigen) je mikroorganismus nebo velká molekula, např. protein, obsahuje větší množství specifických antigenních zón – epitopů. Proto se proti němu tvoří směs protilátek, které jsou sice specifické vůči svému epitopu, ale jako směs reagují s množstvím antigenů a proto je nazýváme polyklonálními protilátkami. Směs protilátek izolovaných z imunizovaných zvířat obsahuje také protilátky proti všem antigenům, se kterými se dané zvíře setkalo v průběhu svého života, což může při použití způsobovat navýšení nálezu vazbou necílových analytů. Nízká specifická může ale být i výhodou, jestliže sledujeme celou skupinu podobných analytů a nevyžadujeme kvantifikaci jednotlivých individuí. Nicméně v praxi se často dává

přednost vysoce specifickým monoklonálním protilátkám, které se připravují proti jedinému epitopu na kultuře bílých krvinek.

**Antigeny** jsou chemické sloučeniny, nebo bílkovinné struktury na povrchu mikroorganismu, které jsou schopné u imunizovaného organismu vyvolat tvorbu protilátek.

**Hapteny** jsou nízkomolekulární látky mající jen jeden epitop. Samotné neindukují u organismu tvorbu protilátek. Protilátky se proti nim syntetizují v případě, že jsou navázané na bílkovinný nosič. Hapten na povrchu bílkovinného nosiče je považován za její další epitop. Takto vzniklé protilátky mají potom schopnost vázat hapteny i bez nosičové bílkoviny. Definici haptenu splňuje většina chemických kontaminantů.<sup>1,2,4,5</sup>

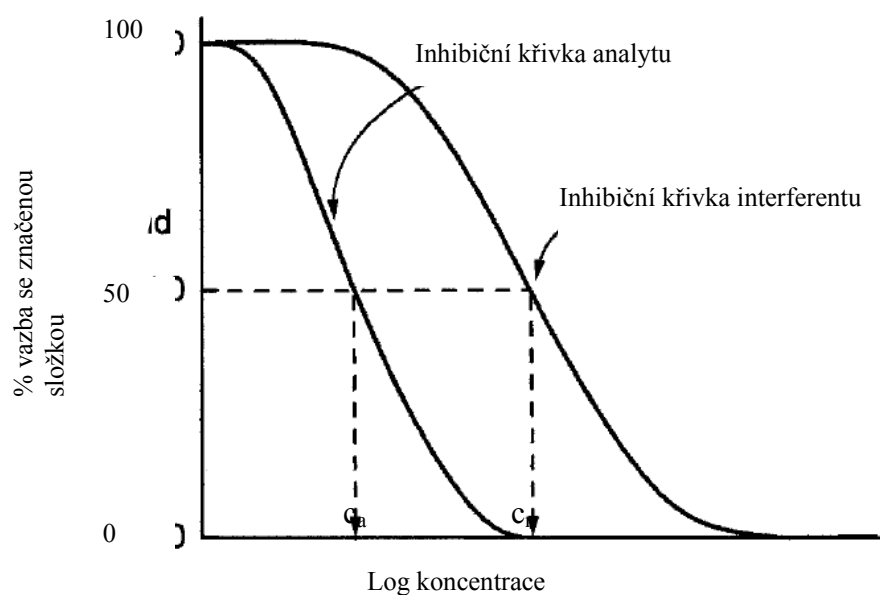
Z uvedeného je zřejmé, že imunochemické metody stanovení lze použít pro stanovení chemických kontaminantů ale i nežádoucích mikrobiálních činitelů. V textu bude dále popisováno hlavně stanovení chemických kontaminantů s tím, že většinu metod zde popsaných lze genericky aplikovat i na mikrobiální kontaminanty.

## **2. 2 Křížová reaktivita a matriční efekty při použití imunochemických metod**

**Matricí** se rozumí veškeré sloučeniny ve vzorku kromě analytu, který se stanovuje. Potraviny jsou svou povahou zpravidla vysoce komplexní matrice jak z hlediska fyzikálního, tak i chemického – mimo řady dalších komponent obsahují proteiny a ionty, které mohou výsledky analýzy podstatně ovlivňovat či dokonce znemožňovat.

**Křížovou reaktivitou** (*Cross-reactivity*) se rozumí reakce mezi antigenem a protilátkou, která byla syntetizována proti jinému, ale podobnému antigenu. Stejně epitopy se mohou vyskytovat na různých molekulách. Velký význam má křížová reaktivita jako ukazatel selektivity dané bioanalytické metody. Křížovou reaktivitou mohou být zatíženy metody pro stanovení jednoho chemického individua v komplexní matrici za přítomnosti množství jeho metabolitů. Například při stanovení reziduí farmak, pesticidů nebo mykotoxinů v potravinách takto může docházet k nadhodnocení nálezů. Proto je nezbytné validaci bioanalytických metod provádět vždy porovnáním výsledků cíleně kontaminovaných vzorků v reálných matricích s výsledky získanými některou z přesných konvenčních metod založených na odlišném principu (např. LC/MS a GC/MS).

Křížová reaktivita se obvykle vyjadřuje jako koncentrace interferentu ( $c_n$ ), která je potřeba pro vazbu s 50 % značených molekul tak, jak ukazuje **Graf 1**. Křížová reaktivita závisí na selektivě protilátek k určitému epitopu. Tato vlastnost se dá výrazně ovlivnit vhodným návrhem imunogenu při produkci protilátek.



**Graf 1.** Křížová reaktivita; hodnoty koncentrací  $c_a$  a  $c_n$  ukazují koncentraci cílového analytu a koncentraci interferentu potřebnou pro navázání 50 % značeného reaktantu; Mikkelsen, Cortón

Procentuální vyjádření křížové reaktivity je rovno stonásobku podílu koncentrací analytu ( $c_a$ ) a interferentu ( $c_n$ ) při dosažení 50 % vazby se značeným reaktantem tak, jak ukazuje rovnice 1. Hodnota křížové reaktivity je různá pro různé interferenty, protože dosahují 50 % nasycení značené složky při odlišné koncentraci  $c_n$ .

$$\%C = 100 \times \frac{c_a}{c_n} \quad (1)$$

Dalším činitelem ovlivňující stanovení jsou **nespecifické interakce**, při nichž nereaguje ani protilátka ani antigen, ale různé jiné složky matrice. Nespecifické interakce mohou navýšit či snížit stanovení analytu tím, že se interferující složky matrice částečně naváží na volný povrch pevné fáze nebo na reagující molekuly. Aby se předešlo vazbě interferentů na pevnou fázi, používá se po imobilizaci antigenů nebo protilátek tzv. blokovacích proteinů, které pokryjí volný povrch.<sup>1,2</sup>



## 2. 3 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA)

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je imunochemická metoda sloužící v analýze potravin k rozpoznání přítomnosti antigenu (analytu) ve vzorku prostřednictvím jeho biospecifické interakce s protilátkou. Detekce produktu enzymatické reakce slouží ke sledování tohoto procesu.

Vedle specifčnosti stanovení, která se odvíjí od použití specifických protilátek, je dalším důležitým parametrem citlivost detekce opticky aktivního produktu enzymatické reakce. Možnost snadného přenášení detekčních ELISA souprav (instrumentace není těžká a nevyžaduje speciální prostředí) předurčuje testy založené na ELISA k terénnímu použití. Flexibilita je daná možností použití různých formátů analýzy. ELISA je vhodná - mimo řady dalších aplikací - též pro stanovení kontaminantů chemické i mikrobiální povahy. Za hlavní výhody se považuje zpracování velkého množství vzorků a vytvoření kalibrační závislosti a proměření slepých vzorků současně na jedné mikrotitrační destičce, což eliminuje vliv měnících se podmínek v průběhu stanovení.<sup>1,2,4,6</sup>

### 2. 3. 1 Význam a provedení enzymatického značení

Pro rozpoznání vzniku komplexu „antigen – protilátka“ se používá značení jednoho z reaktantů enzymem. Enzym vytvoří se svým přidaným substrátem barevný produkt, který se změní spektrofotometricky. Mezi nejčastěji používané kombinace enzym - substrát patří křenová peroxidáza (HRP) a tetramethylbenzidin (TMB), alkalická fosfatáza (AP) a její substrát p-nitrofenyl fosfát (pNPP). TMB dává modré zbarvení s maximem absorbance při 650 nm, při zastavení reakce v části jamek kyselinou potom žluté zbarvení s maximem absorbance při 450 nm. Absorbance se proměřuje primárně při 450 nm a referenčně při 650 nm. Enzymatickou reakcí vytvoří pNPP žluté zbarvení s absorpčním maximem při 450 nm. pNPP je činidlo citlivé na teplo a je třeba ho skladovat v chladu, nebo ho používat ve formě tablet, které se rozpustí až těsně před použitím.

V některých případech, kdy je potřeba zvýšit citlivost, je vhodné měřit míru enzymové reakce jako fluorescenci nebo chemiluminiscenci.<sup>1,4</sup>

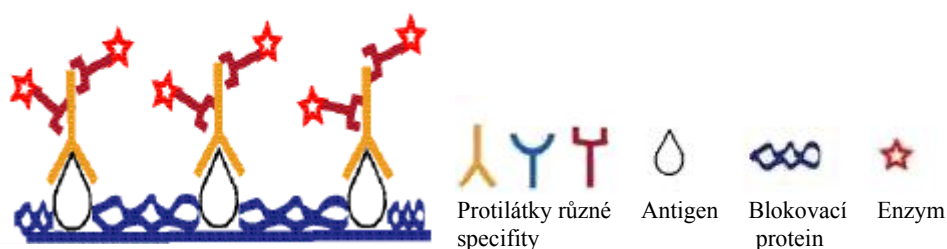
### 2. 3. 2 Využití proteinů jako nosičů imobilizované složky a blokujícího prvku

V případě slabých vazebných vlastností imobilizovaného prvku je možné tento nejdříve navázat na nosičovou bílkovinu a teprve vzniklý konjugát imobilizovat. Místa na pevném nosiči, kde není navázán antigen nebo protilátka, je třeba pokrýt blokovací bílkovinou, aby se předešlo nespecifickým vazbám látek ze vzorku a z promývacích roztoků. Za blokovací bílkoviny se nejčastěji používá hovězí sérový albumin (BSA) v koncentracích mezi 1 – 5 %. Používá se i kasein nebo odtučněné sušené mléko. Použití stejné nosičové a blokovací bílkoviny se nedoporučuje. <sup>4,6</sup>

### 2. 3. 3 Rozdělení techniky ELISA podle formátů

Podle vlastností odvozených od velikosti molekuly analytu bylo vyvinuto několik formátů metody ELISA. Mezi nejčastěji používané formáty pro detekci kontaminantů v potravinách počítáme kompetitivní a nekompetitivní (sendvičový) formát. Jednotlivé formáty se mohou lišit imobilizovaným prvkem.

Sendvičový i kompetitivní formát mohou být použity jako přímé nebo nepřímé. V případě nepřímého stanovení (**Obr. 1**) se na komplex „imobilizovaný antigen - neznačená protilátka“ váže v dalším kroku značená protilátka, čímž se zvyšuje citlivost stanovení. <sup>4,7</sup>



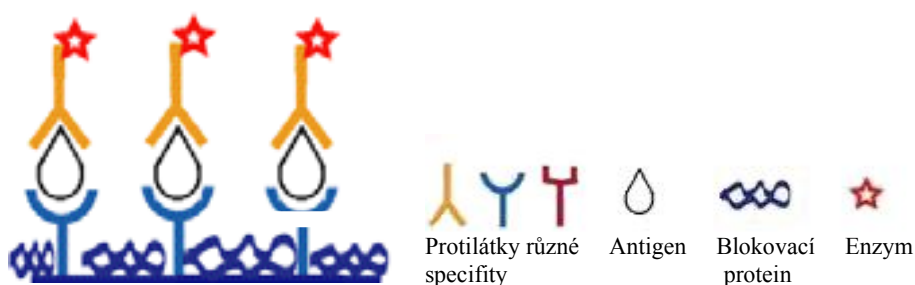
**Obrázek 1.** Nepřímé stanovení s imobilizovaným antigenem;  
<http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tc=3>.

K dalšímu zvýšení citlivosti se používá například silné nekovalentní interakce mezi vitamínem biotinem a proteinem avidinem. Sekundární protilátky jsou označeny několika molekulami biotinu. Přidá se avidin, který má 4 vazebná místa pro biotin. Přidáním konjugátu biotin-enzym dojde k navázání třech molekul nesoucích enzym. V porovnání s přímým stanovením je signál mnohonásobně silnější při stejné koncentraci antigenu, což dovozuje dosažení nižších detekčních limitů. <sup>1,4</sup>

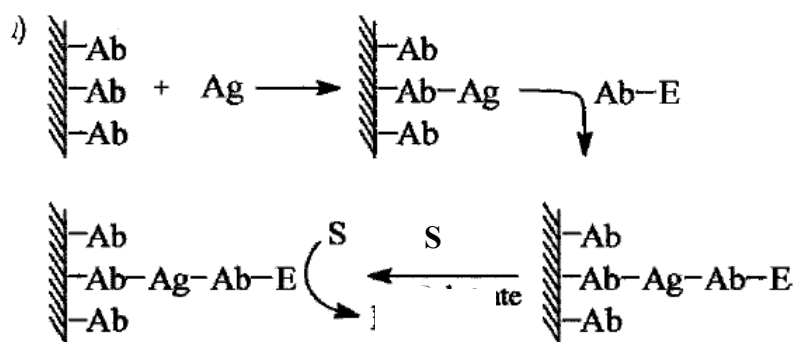
### 2. 3. 4 Nekompetitivní ELISA (sendvičová)

Nekompetitivní formát ELISA (**Obr. 2**) je často používaný v komerčních sadách. Podmínkou je ovšem přítomnost alespoň dvou vazebných míst na antigenu. Hapteny tuto podmínku vzhledem ke své velikosti nespĺňují a proto jejich detekce tímto formátem není možná. Stanovení kontaminantů chemické povahy tímto formátem není obvyklé.

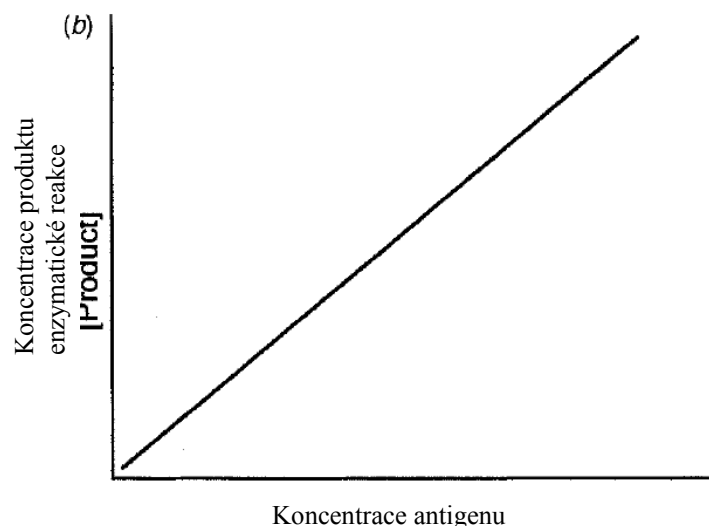
V tomto formátu se použijí dvě protilátky, které mezi sebou zachytí antigen a tvoří „sendvič“. Antigen se zachytí na imobilizované protilátce a po promytí se přidá značená protilátka. Další promytí odstraní nenavázané značené protilátky, přidá se substrát pro enzym a po určité době se reakce zastaví (**obr. 3**). Poté se změří intenzita vzniklého zbarvení. **Graf 2** ukazuje závislost koncentrace měřeného produktu enzymatické reakce na koncentraci antigenu.<sup>4,6,8</sup>



**Obrázek 2.** Nekompetitivní (sendvičový) formát ELISA Primární imobilizovaná protilátka (modře) značená protilátka (oranžově); <http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tc=3>



**Obrázek 3.** Schéma jednotlivých kroků stanovení nekompetitivním formátem ELISA; Ab značí protilátky, Ag antigen, E enzym, S substrát a P produkt; Mikkelsen, Cortón

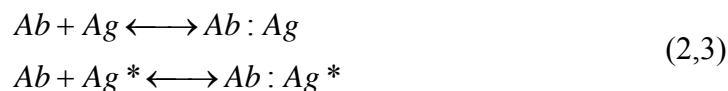


**Graf 2.** Závislost koncentrace detekovatelného produktu na koncentraci antigenu při stanovení nekompetitivním formátem ELISA; Mikkelsen, Cortón

### 2.3.5 Kompetitivní ELISA

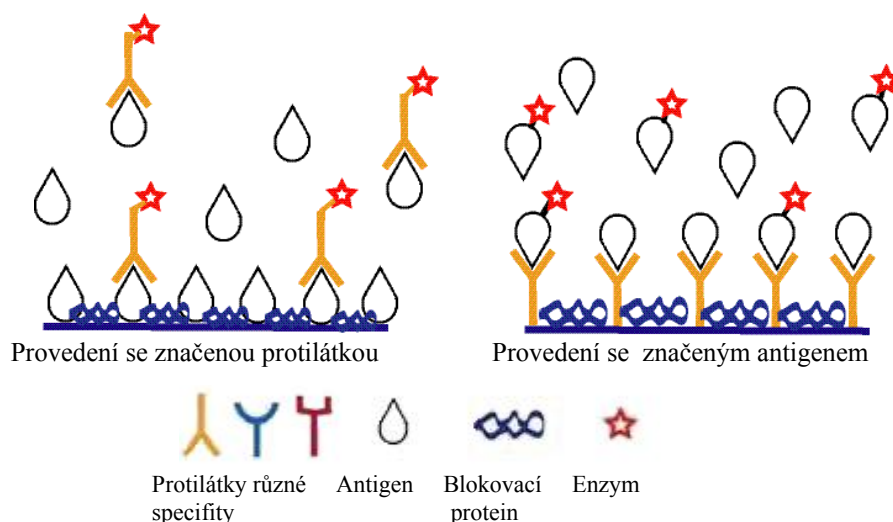
Kompetitivní postup (**Obr. 4**) stanovení se provádí s imobilizovaným antigenem, nebo s imobilizovanou protilátkou (**Obr. 5**). Po imobilizaci protilátky a vykrytí volných míst na nosiči některým z blokovacích proteinů dojde k přidání roztoku vzorku s přimíchanými značenými antigeny. Pokud je vzorek na stanovovaný antigen negativní, značený antigen se naváže na všechny imobilizované protilátky. Přidáním substrátu se vyvolá enzymatická reakce a vzniklé zbarvení se změří zpravidla jako absorbance.

V případě kontaminovaného vzorku dochází ke kompetici mezi antigeny ze vzorku a současně přidanými značenými. Protože předpokládáme, že značení nevyvolá změnu ve vazebných schopnostech, je uskutečnění vazby se značeným antigenem závislé pouze na jeho koncentraci. Rovnováhu při takto provedeném kompetitivním formátu, popisují rovnice 2 a 3. V rovnovážné směsi jsou obsaženy volně a na imobilizovaných protilátkách (Ab) vázáně antigen (Ag), značený antigen (Ag\*). Imobilizovaného prvku je omezené množství a volného a značeného je dostatečný přebytek, aby se dalo předpokládat, že na všech vazebných místech imobilizovaného prvku se navázal jeho protějšek.

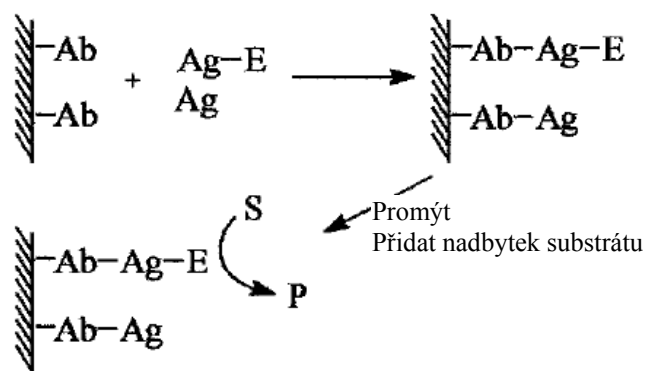


Po promytí od nenavázaných reaktantů a přidání substrátu dojde k enzymatické reakci, při které vzniká barevný produkt, jehož koncentrace je nepřímou úměrnou koncentraci antigenu v roztoku vzorku (**Graf 3**). Koncentrace barevného produktu se obvykle vyjadřuje jako

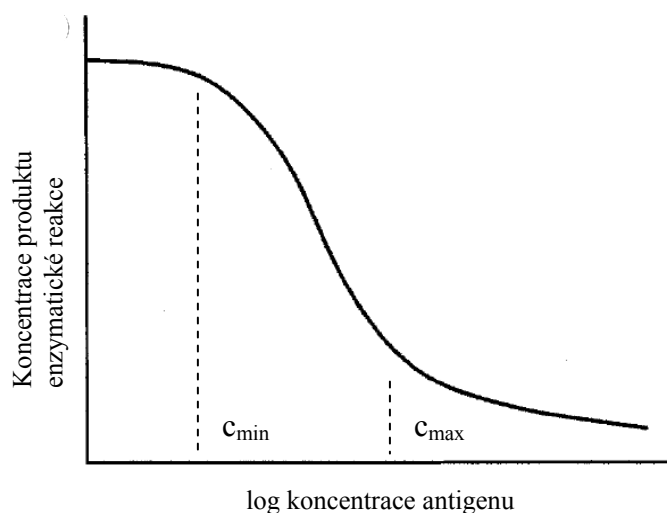
absorbance. Negativní vzorek má tedy větší intenzitu zabarvení a tím i větší absorbanci. Tento formát je zvláště vhodný pro malé molekuly, které nemají více než jedno vazebné místo, čímž k jejich detekci nelze použít sendvičový formát. Komerční kompetitivní ELISA sady jsou dostupné pro detekci reziduí mykotoxinů, veterinárních farmak, pesticidů a dalších látek. Kompetitivní formát nachází i uplatnění při detekci malých molekul pomocí SPR biosenzorů.<sup>2,4,6,8</sup>



**Obrázek 4.** Kompetitivní formát ELISA, vlevo imobilizovaný antigen, vpravo imobilizované protilátky; <http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tc=3>

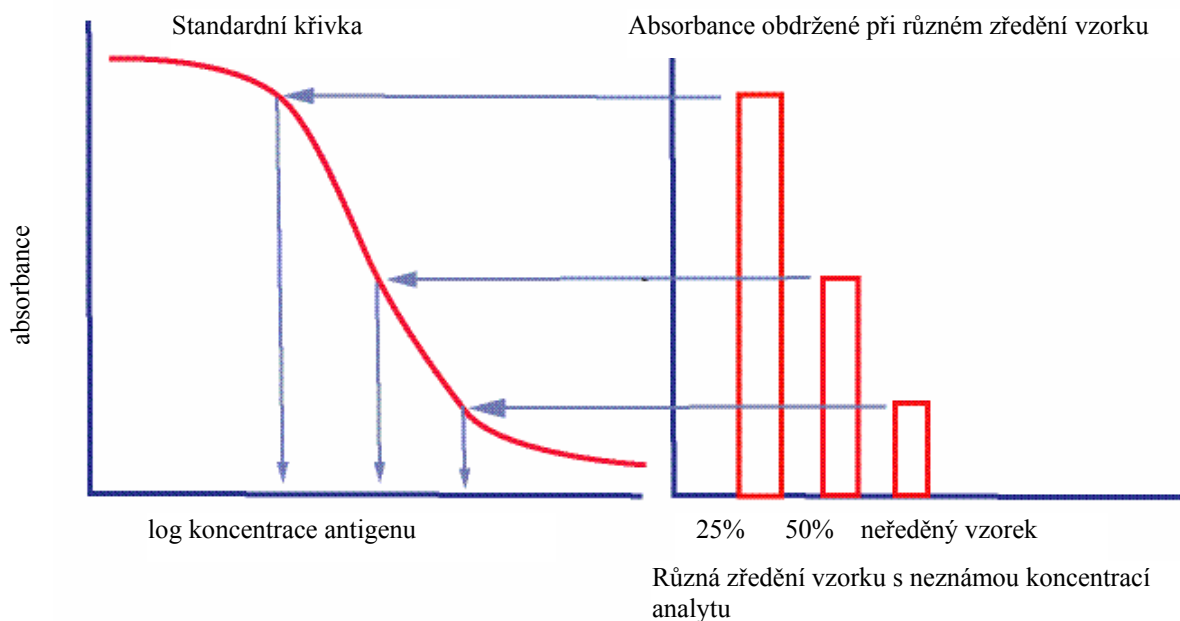


**Obrázek 5.** Kompetitivní formát ELISA s imobilizovanou protilátkou – schéma jednotlivých kroků; Ab značí protilátky, Ag antigen, E enzym, S substrát a P produkt; Mikkelsen, Cortón



**Graf 3.** Kompetitivní formát ELISA – závislost koncentrace detekovatelného produktu na logaritmu koncentrace antigenu; Mikkelsen, Cortón

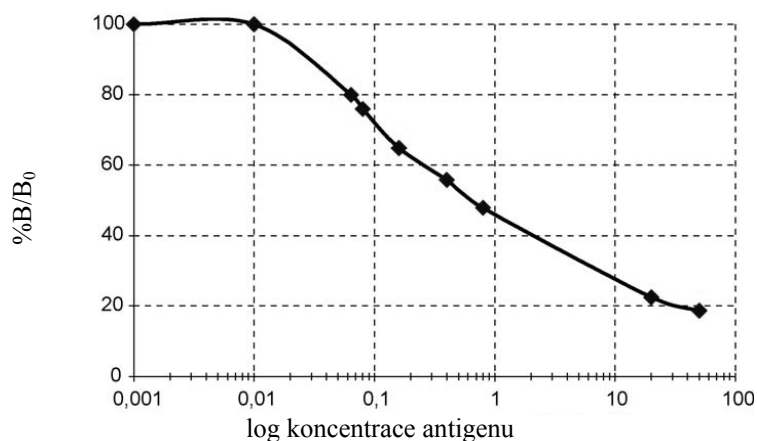
Pro výpočet koncentrace neznámého vzorku je třeba nejdříve proměřit kalibrační závislost. **Kalibrační závislost** se získá změřením absorbancí řady standardních roztoků. Vynášením hodnot absorbance proti hodnotám koncentrace v logaritmickém měřítku se získá sigmoidní standardní (kalibrační) křivka (**Graf 3**). Křivka je transformací souřadnic na ose x částečně linearizovaná. Na křivce lze nalézt lineární část, jejímuž definičnímu oboru odpovídá interval mezi  $c_{\min}$  a  $c_{\max}$  zvaný pracovní rozsah metody. Vzorek s neznámou koncentrací analytu ředíme do několika koncentrací, přičemž se snažíme, aby se absorbance získaná po proběhnutí reakce nacházela v lineární části křivky, ideálně blízko 50 % absorbance (**Graf 4**). Odečtením z grafu standardní křivky získáme koncentraci daného roztoku a po uvážení zředovacího faktoru vypočteme koncentraci analytu ve vzorku.



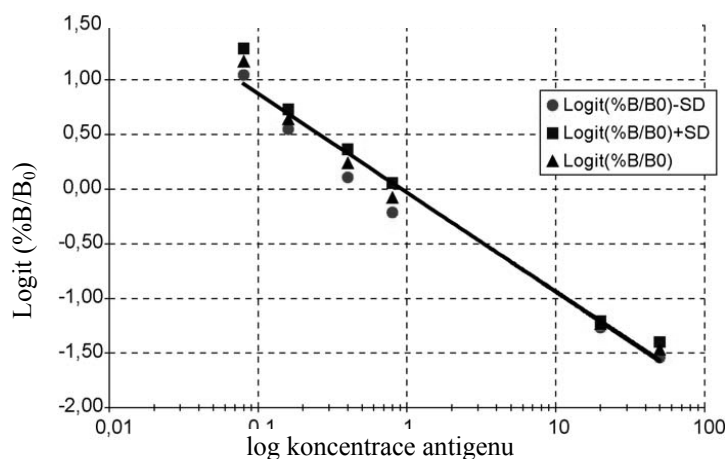
**Graf 4.** Standardní křivka kompetitivní ELISy - závislost absorbance na logaritmu koncentrace antigenu a odečet koncentrace analytu z absorbance různě zředěných roztoků vzorku; <http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tc=3>

Spektrofotometry, konstruované pro proměrování absorbance mikrotitračních destiček, jsou dodávány se softwarem umožňujícím automatickou konstrukci standardní křivky a výpočty koncentrací. Nabízejí také několik možností matematických transformací křivky tak, aby se dosáhlo lepší linearity. Nevýhodou těchto transformací je že v oblastech vysokých a nízkých koncentracích nedosahují takové přesnosti. **Grafy 5 a 6** ukazují, jak se projeví transformace souřadnic podle rovnice 4 na často používanou závislost logit-log.<sup>1,2,4,9</sup>

$$\text{Logit}(\%B/B_0) = \ln\left[\frac{\%B/B_0}{100 - \%B/B_0}\right] \quad (4)$$



**Graf 5.** Křivka kompetitivní ELISA; Mhadhbia et al.



**Graf 6.** Křivka kompetitivní ELISy v závislosti logit-log; Mhadhbia et al.

### 2. 3. 6 Rozdělení techniky ELISA podle použité pevné fáze

V názvu „enzyme linked immunosorbent assay“ vyjadřuje slovo immunosorbent skutečnost, že protilátky jsou navázané na povrchu nějaké formy pevného nosiče.

Techniky imobilizace protilátek a antigenů umožňují jejich aplikaci na nejrůznější povrchy. Protilátky se samovolně váží ke sklu, polystyrenu a jeho derivátům. Polymer styrenu má volné benzenové kruhy, které vytvářejí velmi hydrofobní povrch. Vazba na polystyren je proto hydrofobní. Pro vylepšení možností imobilizace se používají deriváty polystyrenu, které mají některé benzenové kruhy nahrazené karbonylovými nebo karboxylovými skupinami, což umožňuje navíc ještě vznik hydrofilních interakcí.

Pevné fáze, na které mohou být molekuly imobilizovány mají nejrůznější mechanické provedení. Mohou to být částice, vnitřní povrchy kolonek nebo stěny jamek na mikrotitrační destičce. Pevnou fází může být kromě stěn jamek mikrotitrační destičky nebo kolonek také „dipstick“ – polystyrenová tyčinka nebo míchadlo umožňující přenos navázaných protilátek nebo antigenů mezi různými rozpouštědly tak, že odpadá promývání nutné u ELISA v jamkách.

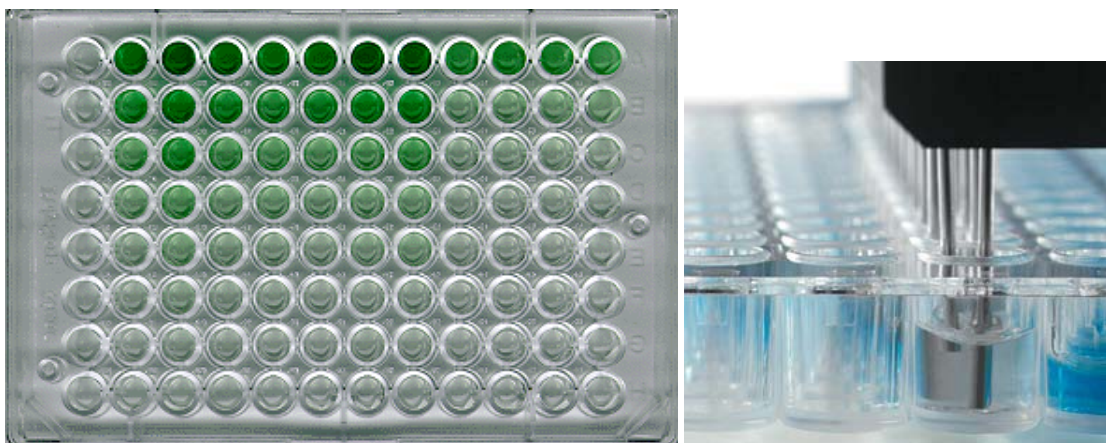
Další alternativou je využití magnetických nebo magnetizovatelných částic derivatizovaných základovou bílkovinou s konjugovanými protilátkami.

Principy stanovení se s rozdílnou pevnou fází nemění. Mění se pouze provedení promývání.<sup>2,4,6</sup>



### ***(i) ELISA na mikrotitrační destičce***

Při aplikaci metody ELISA se nejčastěji jako pevná fáze používá mikrotitrační destička s 96 jamkami, v 8 řádcích a 12 sloupcích o vnějších rozměrech 86 x 128 mm. Standardizace vnějšího rozměru mikrotitrační destičky umožňuje využívat stejná čtecí zařízení pro různé počty jamek. V poslední době se mikrotitrační destičky osazují také 384 nebo 1536 jamkami. V případě, že se provádí stanovení jen v malém množství jamek je možné použít rámeček standardního rozměru s vyjímatelnými sloupci jamek. V případě použití jamek s menším objemem se šetří reagentie a větší počet jamek umožňuje provedení komplexnějších testů. Dále se vyrábí destičky s oblým dnem jamek, místo rovným, což zlepšuje promývání. Testují se jamky s výstupkem uvnitř, zvětšujícím o 10 až 20 % plochu pro imobilizaci.<sup>2,4,6</sup>



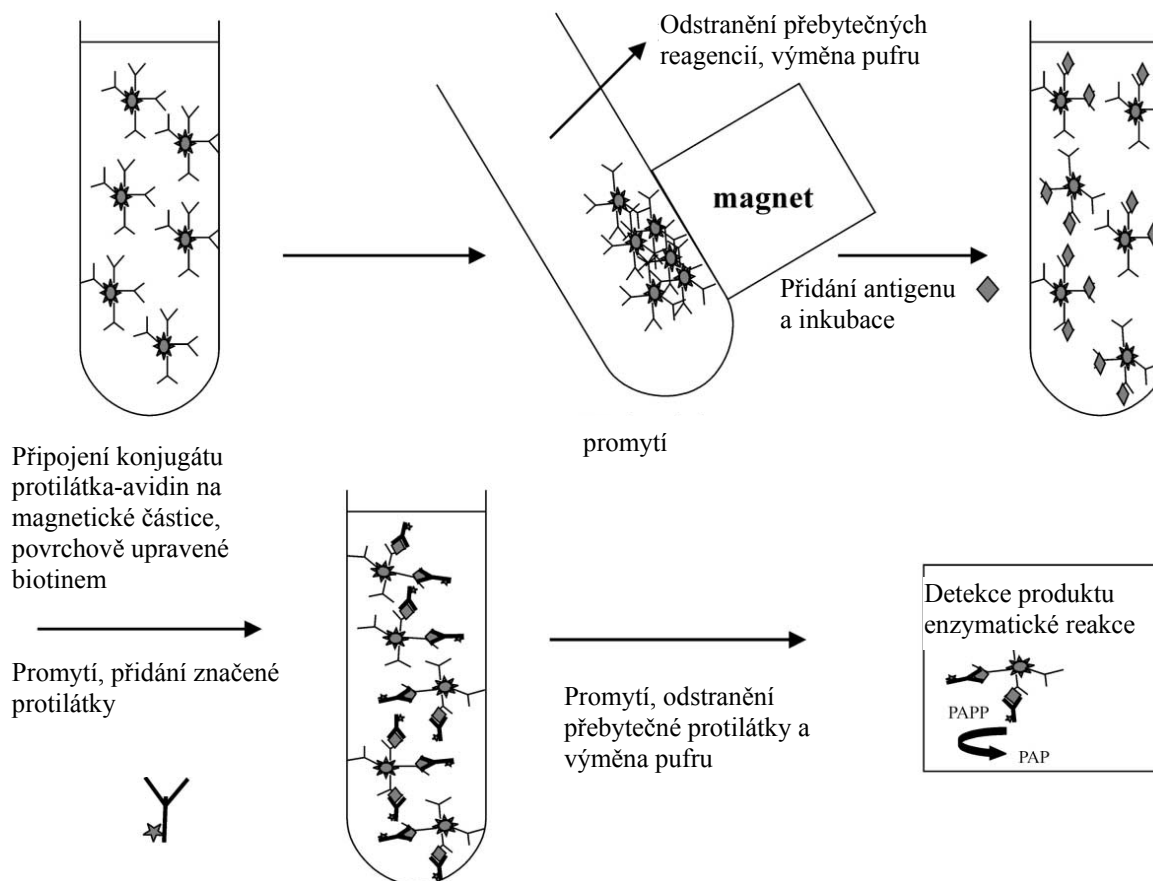
**Obrázek 6.** Mikrotitrační destička s 96 jamkami; vlevo pohled shora vpravo pohled z boku při promývání. [http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/elisa\\_intro.html](http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/elisa_intro.html) a <http://www.idexx.com/production/elisa/0965846.pdf>

### ***(ii) ELISA s využitím magnetizovatelných částic (paramagnetic beads)***

Magnetické nebo magnetizovatelné částice jsou pokryté specifickými protilátkami. Umožňují jednoduchou separaci pevné fáze se zachycenými antigeny od roztoku nezreagovaných činidel. Částice jsou malých rozměrů a dispergují se volně (případně se použije mixer) do roztoku. Takto je dosaženo větší plochy mezifázového rozhraní a proto je imunoafinitní reakce rychlejší. Výhodou představuje selektivní sběr antigenů z velkého objemu roztoku, po němž dojde ke zkoncentrování vlivem vloženého magnetického pole, a následující inkubace se značenými protilátkami probíhá již v malém objemu. Díky reakční kinetice se oproti ELISA na mikrotitrační destičce snižuje čas provedení testu. Využití nacházejí

v průtočných imunochemických detekčních systémech, ale i aplikacích s tradiční spektrofotometrickou detekcí, například při stanovení reziduí pesticidů.

Limitujícím parametrem použití je derivatizace magnetických částic bílkovinou tak aby byla umožněna tvorba komplexu mezi povrchovou bílkovinou a protilátkou. Magnetické částice jsou dostupné komerčně a některé i s navázanými protilátkami pro konkrétní použití. Postup analýzy založené na použití magnetických částic jako pevné fáze ukazuje **Obrázek 7**.  
10,11,12



**Obrázek 7.** Sendvičový formát metody založené na použití magnetických částic; Ronkainen-Matsuno et al.

### 2. 3. 7 Příklady aplikací techniky ELISA v analýze kontaminantů

S ohledem na vzrůstající požadavky na efektivní kontrolu kontaminantů v potravním řetězci vzrůstá potřeba zavádění postupů umožňujících rychlé a cenově přijatelné screeningové vyšetření různých kombinací analyt/matrice. Jak již bylo zmíněno, kompetitivní formát ELISA byl vyvinut pro řadu kontaminantů.

Důležitým předpokladem pro aplikaci v praxi je, aby **detekční limity (LOD)** byly nižší než hodnoty nejvyšších přípustných množství daných legislativními předpisy. Z velkého množství vzorků lze vybrat jen ty, které jsou pozitivní a předat je pro confirmaci pomocí nákladnější instrumentální metody. V takovém případě je pro screening bioanalytickými

metodami přípustná relativně vysoká pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků, pravděpodobnost falešně negativních výsledků musí být naopak minimální.

V následujících kapitolách jsou uvedeny příklady nedávno publikovaných studií, využívajících metody ELISA ke stanovení tří reprezentantů kontaminantů v potravinách. Mezi kontaminanty k jejichž stanovení se velmi často používá ELISA se řadí mykotoxiny.

**Mykotoxiny** jsou toxické sekundární metabolity produkované nižšími vláknitými houbami (plísněmi), které mohou kontaminovat potraviny nebo krmivo pro hospodářská zvířata. Mykotoxiny jsou stabilní za většiny podmínek průmyslových a kulinárních postupů a proto, pokud je již jednou surovina kontaminována, je obtížné zajistit, aby mykotoxiny nebyly přítomny v konečném produktu. Kontrola přítomnosti mykotoxinů nabývá na významu spolu s tím, že Evropská unie stanovuje Nařízením Komise č. 1881/2006/ES nejvyšší přípustné koncentrace pro některé mykotoxiny v určitých komoditách. Mezi regulované mykotoxiny, na které se logicky zaměřuje vývoj bioanalytických metod, patří dosud nejvíce studované aflatoxiny, ochratoxin A, a fusariové mykotoxiny reprezentované hlavně deoxynivalenolem. **Tabulka II** prezentuje některé ze společností vyrábějících ELISA sady pro stanovení mykotoxinů.

**Tabulka II.** Příklady výrobců sad pro stanovení mykotoxinů

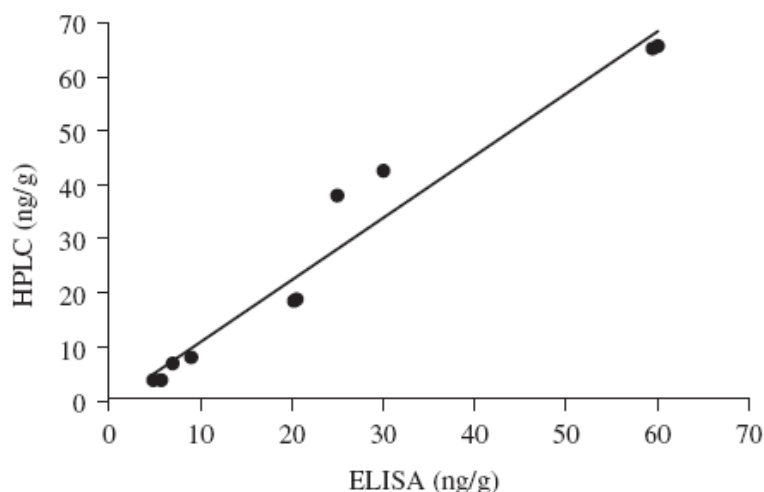
Výrobci sad ELISA pro stanovení mykotoxinů		
R-Biopharm	D	<a href="http://www.r-biopharm.com">www.r-biopharm.com</a>
Bioo Scientific	USA	<a href="http://www.biooscientific.com">www.biooscientific.com</a>
Euro-Diagnostica	EU	<a href="http://www.eurodiagnostica.com">www.eurodiagnostica.com</a>
International Diagnostical Systems	USA	<a href="http://www.ids-kits.com">www.ids-kits.com</a>
Neogen	USA	<a href="http://www.neogen.com">www.neogen.com</a>
Romer Labs	A	<a href="http://www.romerlabs.com">www.romerlabs.com</a>

### **(i) Stanovení ochratoxinu A**

Ochratoxin A (OTA) je mykotoxin produkovaný plísní *Aspergillus ochraceus* a některými druhy rodu *Penicillium*, u lidí způsobující poškození ledvin. Lze ho nalézt v potravinářských surovinách včetně cereálií, kávy, kakaa, sušeného ovoce, piva a vína. Je považován za možný karcinogen.

Detekce ochratoxinu A (OTA) v čerstvě sklizené kávě může být příkladem využití metody ELISA v nepřímém kompetitivním formátu. 68 vzorků čerstvě sklizených kávových bobů bylo analyzováno ELISA a pro porovnání také HPLC/FLD. Metoda ukázala silnou specifickou pro OTA a nízkou křížovou reaktivitu s analogy OTA OTB a OTα. Vysokou

křížovou reaktivitu vykazovala s OTC, který se ale v potravinářských surovinách vyskytuje jen zřídka. Bylo dosaženo detekčního limitu 3,75 ng/g. LOD dosažený metodou HPLC byl 0,8 ng/g. Výtěžnost stanovení cíleně kontaminovaných vzorků zelených kávových bobů na hladiny 5 – 70 ng/g OTA byla pro ELISA průměrně 81,5 % a pro HPLC 80,5 %.



**Graf 7.** Lineární regrese koncentrací nezávisle změřených metodou ELISA a HPLC/FLD v cíleně kontaminovaných vzorcích; Fujii S. et al.

Korelační koeficient lineární regrese (**Graf 7**) byl 0,98, což ukazuje na dobrou korelaci výsledků obou metod. Spolu se shodnou výtěžností to dokumentuje, že stanovení metodou ELISA může v tomto případě zastoupit stanovení instrumentální metodou. Nicméně v případě nápadně vysokých nálezů, bude potřeba výsledek následně konfirmovat ještě metodou HPLC, zda nedošlo ke křížové reaktivitě s OTC. Protože EU doporučuje, aby koncentrace OTA v kávě nepřekračovaly 8 ng/g, je stanovení popsanou metodou ELISA s LOD 3,75 ng/g stále ještě dostatečně citlivé.<sup>13</sup>

### ***(ii) Stanovení akrylamidu***

Akrylamid je toxická sloučenina s karcinogenními účinky. V dubnu 2002 byla švédskými vědci publikovaná studie upozorňující na vysoké koncentrace akrylamidu v potravinách s vysokým obsahem škrobu upravených při teplotách nad 120°C, hlavně smažením nebo pečením. V potravinách vzniká Maillardovou reakcí z prekurzorů asparaginu a redukujících cukrů.

V následujících letech bylo zaváděno stanovení akrylamidu v potravinách instrumentálními metodami jako GC/MS a LC/MS. Rychlé a nenáročné stanovení akrylamidu pomocí metody ELISA může mít kontrolní úlohu v průmyslu a také ve výzkumu takových kulinárních postupů, které by tvorbu akrylamidu omezily.

Studie publikovaná počátkem roku 2008 popisuje stanovení tohoto karcinogenu pomocí nepřímé kompetitivní ELISA (viz **Obr. 4 a 5**). Extrakce vzorku zahrnuje homogenizaci s vodou a přečištění pomocí SPE. Akrylamid (Ade), je s hmotností 71,08 Da řazen k haptenům a je třeba ho derivatizovat merkaptobenzoovou kyselinou (MBA), aby se získal účinný imunogen. Protilátky proti Ade-3-MBA nejsou schopny reakce se samotným Ade a proto je třeba Ade ze vzorku po extrakci a přečištění na SPE derivatizovat MBA. Konjugát Ade-MBA s lidským sérovým albuminem je imobilizován na povrchu jamek mikrotitrační destičky. Přidají se protilátky proti Ade-3-MBA spolu s extraktem vzorku obsahujícím derivát akrylamidu Ade-3-MBA. Po ustavení rovnováhy a promytí se přidají sekundární značené protilátky, reakce se zastaví přidáním 2,5 M kyseliny sírové a absorbance se změří při 450 nm.

Pracovní charakteristiky byly proměřovány na sérii cíleně kontaminovaných vzorků vody na hladiny 0 až 3 318  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Bylo dosaženo meze detekce 65,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vzorku a při použití stejného extrakčního procesu a stanovení (LC-MS/MS) 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Limit detekce je nutno proměřit v různých potravinách, aby se zohlednily matriční efekty. Na mikrotitrační destičce byla změřena současně osmibodová kalibrační křivka a 24 vzorků v trojím opakování.

Předpokládá se, že průměrný pracovník zvládne za den provést stanovení na čtyřech destičkách, což činí 192 vzorků za den. Metoda vyžaduje ustálení přes noc a další technologické přestávky. Naproti tomu, pokud odhlédneme od doby potřebné pro extrakce vzorků, můžeme předpokládat, že chromatografické stanovení zabere 30 minut pro jeden vzorek, za den pomocí automatizace lze zpracovat pouze 48 vzorků.

Nepřímá kompetitivní ELISA, byla shledána jako rychlá, vůči akrylamidu vysoce citlivá, metoda ačkoli při porovnání se zavedenými postupy při stejné extrakční metodě měla poněkud vyšší LOD. V současnosti probíhá optimalizace představené metody pro různé typy matic.<sup>14</sup>

### ***(iii) Stanovení N-methylkarbamátových pesticidů***

N-methylkarbamáty jsou důležitou skupinou pesticidů používaných v současné době jako náhrada za organochlorové pesticidy. Mezi N-methylkarbamáty se řadí například carbofuran, methiocarb a carbaryl. Vzhledem k jejich polaritě a nestabilitě za tepla se používá pro jejich stanovení LC s UV, FLD, DAD nebo MS detektory. Takovéto stanovení vyžaduje nákladné vybavení, obsluhované kvalifikovaným personálem a čas na provedení přečištění a zkoncentrování vzorku, což opět navyšuje cenu stanovení. Ve studii Míčkové et al.<sup>15</sup> bylo provedeno srovnání metod stanovení těchto zástupců N-methylkarbamátových pesticidů

pomocí ELISA na mikrotitračních destičkách, s detekcí absorbance a chemiluminiscence. Vzorky dětské výživy a ovocných šťáv byly připravovány pouze zředěním. V porovnání s kolorimetrickou detekcí bylo při stanovení chemiluminiscenční ELISA možné použít méně imunoreagencií, a bylo možno měřit v 3 až 10 krát zředěnějším roztoku, než při měření s kolorimetrickou detekcí, což demonstruje citlivost chemiluminiscenční detekce. Výtěžnost byla sledována u cíleně kontaminovaných vzorků dětské výživy směsí tří uvedených pesticidů na hladiny 1, 10 a 100 ng/ml a pohybovala se od 80 do 120 %. Opakovatelnost vyjádřená jako RSD při stanovení s chemiluminiscenční detekcí byla v rozmezí 1,4-18 % což je srovnatelné s technikou LC/ESI/MS/MS (liquid chromatography/electrospray mass spectrometry). Korelační koeficienty a směrnice lineární regrese při srovnání obou ELISA postupů a LC/ESI/MS/MS se blížily jedné, což ukazuje, že výsledky metod jsou srovnatelné.

## **2. 4 Imunoafinitní chromatografie**

Imunoafinitní chromatografie je příkladem kombinace zavedené instrumentální techniky s biologickým rozpoznávacím prvkem. Funkci stacionární fáze v chromatografické koloně mají imobilizované protilátky proti jednomu nebo směsi více analytů. Při průchodu roztoku vzorku obsahujícího antigen je tento zachycen na protilátkách zatímco další přítomné látky se eluují z kolony. Přidáním vhodného elučního činidla se v následujícím kroku rozruší vazba antigen-protilátka a z kolony je eluován stanovovaný analyt. Imunoafinitní chromatografie slouží buď jako extrakční krok před stanovením LC nebo GC (liquid a gas chromatography), nebo jako součást méně náročných technik s fluorimetrickou detekční koncovkou. V detekci kontaminantů potravin se používá pro rezidua pesticidů, mykotoxinů a dalších látek.

### **2. 4. 1 Stanovení mykotoxinů pomocí imunoafinitních kolonek**

Využití imunoafinitních kolonek pro stanovení mykotoxinů je díky jednoduchosti jejich použití a komerční dostupnosti často používanou metodou pro screening i pro extrakci a zkoncentrování před stanovením HPLC.

Kolonky AflaTest<sup>®</sup> firmy Vicam o objemu 1 ml obsahují na nosiči navázané specifické monoklonální protilátky, proti různým druhům mykotoxinů a jejich kombinacím. Rozetřený a navážený vzorek se smíchá s NaCl ve vodném roztoku metanolu a přefiltruje. Naředěný a znovu zfiltrovaný extrakt se nanese na kolonku, přičemž dojde k navázání mykotoxinu na protilátku. Promytím vodou se eluují rušivé látky a metanolem potom cílové

mykotoxiny. Eluát se jímá do kyvety a po přidání derivatizačních činidel se změří fluorescence.

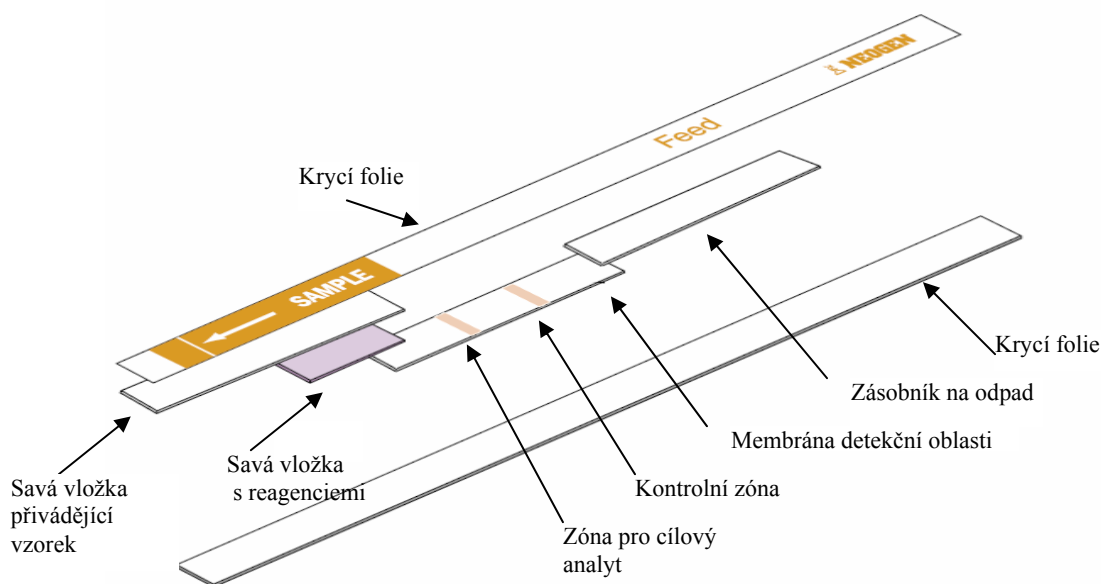
Metoda nevyžaduje speciální prostředí, není třeba vysoce odborný personál, protože odečtení výsledků se provede na displeji fluorometru nebo se zaznamená tiskem. Po přípravě a extrakci vzorku, časově závislé na komplikovanosti matrice, zabere stanovení méně než 10 minut. Vyniká velkou přesností a spolehlivostí v celé škále koncentrací od 0,1 do 300 µg/kg.

Použití imunoafinitních kolonek je také vhodné jako extrakce a zkoncentrování pro stanovení HPLC/UV. V takovém případě se nepoužijí derivatizační činidla a eluát se odpaří a rekonstituovaný v mobilní fázi se nanese na kolonu. V případě že je žádoucí větší průtok kolonkou a tím rychlejší stanovení, je možné použít „wide bore“ kolonku s objemem 3 ml.  
16,17

#### **2. 4. 2 Plošná imunochromatografie (strip testy)**

Rychlé, relativně levné kvalitativní stanovení různých analytů lze realizovat pomocí plošné imunochromatografie (lateral flow immunochromatography). Díky uživatelsky přijatelnému formátu, bez nutnosti speciálního vybavení a podmínek, je umožněno terénní stanovení. Základem detekčních souprav pracujících na tomto principu je plastový vícevrstvý proužek (strip) obsahující potřebné reagentie a protilátky k provedení stanovení.

Testovací strip sestává ze dvou slisovaných pružných plastových pásků, mezi nimiž jsou umístěny savé vložky, obsahující specifické protilátky značené částicemi barviva (oproti enzymu v ELISA) a další reagentie potřebné pro provedení stanovení a membrána s imobilizovanými protilátkami či deriváty analytů. Výplň stripu tvoří definované úseky – oblast pro reagentie, kontrolní oblast a zásobník na odpad.



**Obrázek 8.** Konstrukce stripu pro imunochromatografii;  
[http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/L\\_F\\_Diagram.pdf](http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/L_F_Diagram.pdf)

V nejjednodušších postupech se strip umístí na určenou dobu do roztoku vzorku. Sady, jejichž použití předpokládá aplikaci vzorku ve formě kapky obsahují ještě plastové zapouzdření, do kterého se strip umísťuje a které má perforace pro nanesení vzorku a odečítání výsledků. Pokud je žádoucí stanovení bez subjektivního vlivu operátora, umísťuje se strip do digitálního čtecího zařízení. Princip reakce probíhající ve stripu je stejný, bez ohledu na zapouzdření nebo způsob odečítání výsledků.

Pokud je strip test konstruován pro detekci analytu majícího více než jeden epitop, probíhající reakce bude obdobou sendvičového formátu ELISA. Mezi analytem a protilátkou vznikne vazba a komplex se pohybuje vložkou vlivem osmotických sil do detekčního prostoru. Detekční prostor je membrána, na které jsou imobilizované další protilátky proti analytu. Navázáním komplexu „antigen-protilátka“ vznikne „sendvič“ a ustavení rovnováhy se sleduje jako barevná linie.

Při stanovení haptenu (např. mykotoxiny) se použije kompetitivní formát a přítomnost analytu se prokáže jako absence barevné linie. V detekční zóně na stripu jsou imobilizované deriváty analytu. Pokud vzorek obsahuje analyt, tento tvoří s protilátkami značenými barevnou částicí komplex, který dále postupuje přes detekční zónu do části vložky pro odpad. V případě, že ve vzorku analyt není, volné konjugáty antilátka-barvivo se vážou v detekční zóně a linie se objeví.

Vložka je v místě pro reagentie dále napuštěná kontrolním konjugátem protilátka-barvivo, který se uvolňuje rozpouštědlem ze vzorku, bez ohledu na to zda je přítomen stanovovaný analyt. V detekční oblasti je oblast s imobilizovanou složkou, na kterou se



kontrolní konjugát váže a tvoří barevnou kontrolní linii. Její vznik je důkazem, že sada byla správně vyrobena, skladována a použita.<sup>18,19</sup>

Princip plošné imunochromatografie nalezl uplatnění při vyšetření na přítomnost přírodních toxinů (mykotoxiny a toxiny ryb), reziduí  $\beta$ -laktamových antibiotik v mléce a dalších. V **Tabulce III** jsou uvedeny některé ze společností dodávajících na trh testovací sady založené na principu plošné imunochromatografie a v následující kapitole je představena konkrétní aplikace pro screeningové vyšetření na přítomnost aflatoxinu.

**Tabulka III.** Příklady výrobců strip testů

Výrobci strip testů		
Vicam	USA	<a href="http://www.vicam.com">www.vicam.com</a>
Charm Sciences Inc	USA	<a href="http://www.charm.com">www.charm.com</a>
Euro-Diagnostica	EU	<a href="http://www.eurodiagnostica.com">www.eurodiagnostica.com</a>
Idexx laboratories	USA	<a href="http://www.idexx.com">www.idexx.com</a>
International Diagnostical Systems	USA	<a href="http://www.ids-kits.com">www.ids-kits.com</a>
Neogen	USA	<a href="http://www.neogen.com">www.neogen.com</a>
Unisensor	B	<a href="http://www.twinsensor.com">www.twinsensor.com</a>
Romer Labs	A	<a href="http://www.romerlabs.com">www.romerlabs.com</a>

### (i) Stanovení aflatoxinu

Příkladem použití testovacího stripu může být aplikace jedнокrokové sady pro stanovení aflatoxinu Aflacheck<sup>®</sup> firmy VICAM. Sada umožňuje kvalitativní stanovení na hladinách 10 nebo 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bez velkých nároků na laboratorní vybavení. Jednoduchý analytický proces zahrnuje extrakci vzorku metanolem, naředění extraktu vodou a ponoření testovacího stripu do roztoku. Po třech minutách následuje kontrola proužku a interpretace dat uživatelem – pozitivní nebo negativní nález se rozpozná podle počtu linií v detekční oblasti. Dvě linie (**Obr. 9**) signalizují negativní nález (jedna kontrolní a druhá ukazující podprahovou koncentraci).



**Obrázek 9.** Negativní výsledek stanovení aflatoxinu; na testovacím stripu ze sady AflaCheck jsou viditelné dvě linie (Vicam)

Objevení pouze kontrolní linie (**Obr. 10**) signalizuje pozitivní vzorek (koncentraci aflatoxinu vyšší než danou detekční mez metody) a neobjevení žádné ukazuje na chybu v procesu stanovení.



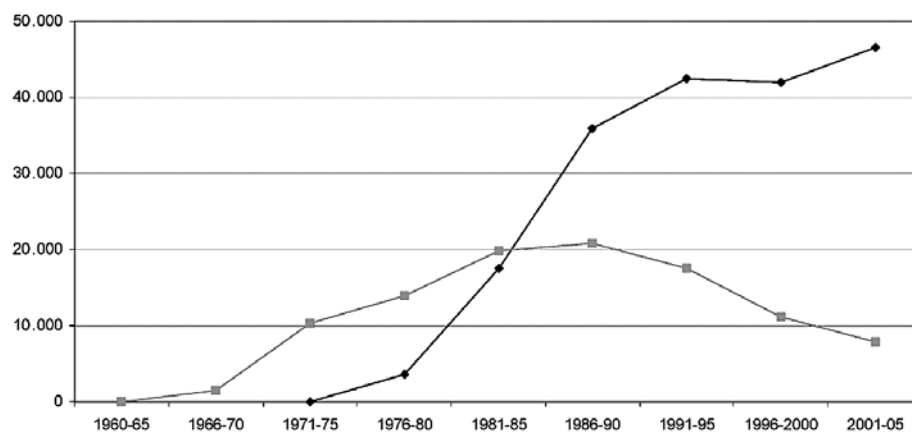
**Obrázek 10.** Pozitivní výsledek stanovení aflatoxinu; na testovacím stripu ze sady AflaCheck je vidět jen kontrolní linie. Vicam

Metoda nevyžaduje trénovaný personál, není třeba udržovat sadu za speciálních podmínek a data není třeba vyhodnocovat elektronicky. Všechny tyto výhody předurčují podobné sady pro terénní použití. Pro laboratorní použití spočívá jejich přínos v rychlém rozpoznání kontaminovaných vzorků, u kterých se dále provede klasická chromatografická analýza.<sup>6,20</sup>

## 2.5 Radioimunoanalýza (RIA)

Počátkem šedesátých let výzkumný tým Bersona a Yalowa využil značení protilátek radioaktivními izotopy. V průběhu sedmdesátých let došlo k velkému rozvoji použití v medicíně a později v dalších oborech. Byla vybudována řada laboratoří, které, umožňovaly bezpečnou práci s radioaktivním materiálem. Přetrvávající problematika zacházení s radioaktivními odpady, jejich sběr a likvidace, nutnost zvláštního vybavení laboratoří s důrazem na bezpečnost personálu, navyšovala cenu provedených testů tak, že RIA nemohla konkurovat metodám využívajícím enzymaticky značené reagenty. Používá se pět různých radioizotopů ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  a  $^{125}\text{I}$ ), přičemž pro rutinní analýzu se nejvíce hodí  $^3\text{H}$  a  $^{14}\text{C}$ , které mají delší poločas rozpadu a nízkou úroveň beta záření.

Zakomponování radioizotopu do různých organických sloučenin, bez toho aby se změnila struktura molekuly, je často náročné. Na základě RIA byly vyvinuty techniky pro stanovení různých herbicidů v potravinách, například picloramu a 2,4-D (2,4-dichlorofenoxy octová kyselina) v koncentracích 100 a 50 ppb. V dnešní době nachází využití při sledování metabolismu a jiných aplikacích, kde nelze použít enzymatické značení a tam, kde se dá předpokládat rozumná návratnost investic. Pro screening kontaminantů v potravinách se využívá již jen zcela výjimečně. Srovnání vývoje počtu publikací týkajících se metod RIA a ELISA za dobu jejich používání ukazuje **Graf 8**.<sup>21</sup>



**Graf 8.** Počet publikovaných článků s tématikou ELISA (černá) a RIA (šedá)  
<http://www.clinchem.org/cgi/content/full/51/12/2415>

### 3 Metody využívající biosenzory

V potravinovém průmyslu mohou biosenzory sloužit k provoznímu monitorování přítomnosti některých technologicky či výživově významných látek, ale také k detekci kontaminujících látek, např. pesticidů, průmyslových chemikálií nebo přírodních toxinů.

Biosenzory snižují časovou náročnost analýzy a tím náklady na její provedení. Jejich odezva je natolik rychlá, že jsou vhodné k začlenění do systému HACCP, který se obecně považuje za nejúčinnější systém jak zajistit bezpečnost potravin. Citlivost biosenzorů umožňuje rozpoznat mikroorganismy rodu *Escherichia* nebo *Salmonella*, pesticidy, herbicidy a další v časovém horizontu minut až hodin.<sup>22</sup>

Zatímco tradiční kultivační metody pro rod *Salmonella* mohou trvat až 6 dní a pro detekci nízkomolekulárních chemických kontaminantů jsou třeba extrakce upravených vzorků s následnou chromatografií, tedy procesy trvající v řádu hodin až dní, biosenzory umožňují detekci těchto kontaminantů v reálném čase.

#### 3.1 Konstrukce biosenzorů

Pojmem „senzor“ definujeme zařízení, které reaguje na fyzikální nebo chemické podněty činitele a převádí je přes hardware a software na měřitelné hodnoty (signálu). Biosenzor spojuje dva prvky: rozpoznávací biologickou část (např. imobilizované antigeny, protilátky, enzymy nebo mikrobiální buňky) a převodníkovou část (transduktor), která může být povahy elektronické, optické, piezoelektrické a termometrické, přičemž v oblasti optických transduktorů dochází k největšímu rozvoji. Biosenzory jsou rozdělovány podle povahy transduktorů nebo podle druhu biologického účinku rozpoznávací části. Podle provedení reakce na biologické části rozlišujeme dva druhy biosenzorů – biokatalytické a bioafinitní (imunosenzory).<sup>23</sup>

##### 3.1.1 Biokatalytické senzory

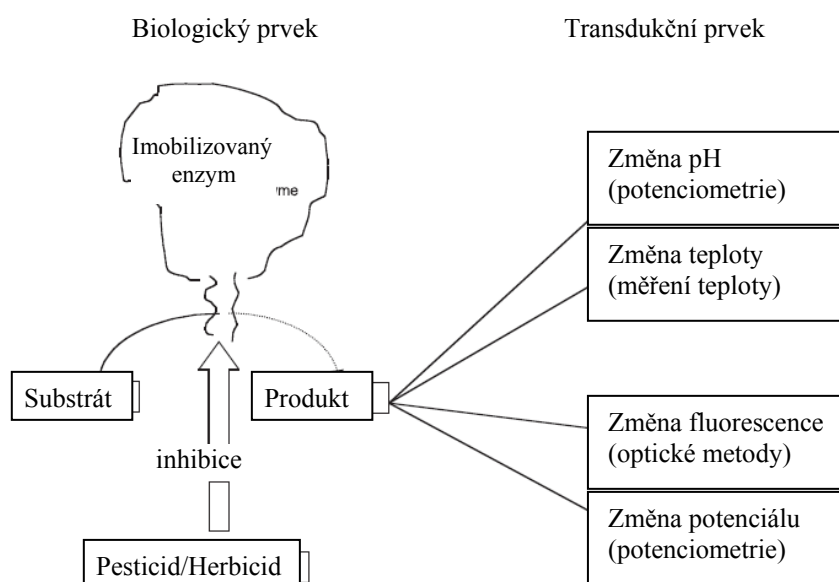
Rozpoznávací prvek obsahuje enzym, celou buňku, buněčné organely nebo tkáňové řezy. Výhoda využití celé buňky spočívá v tom, že enzym je buňkou produkován přímo na senzoru a není třeba ho složitě izolovat, přechovávat a imobilizovat. Takové biosenzory mají větší trvanlivost, lehce se dají regenerovat roztokem živin, nejsou v porovnání s použitím

samotných enzymů tak náročné na vyvážené pH a teplotu. Nevýhodou je nízká selektivita způsobená probíhajícím kompletním metabolismem živé buňky a dlouhá doba odezvy.

Senzory s imobilizovaným enzymem tyto nedostatky nevykazují. V analýze kontaminantů se používají pro pesticidy a herbicidy na bázi karbamátů (propraxur, carbaryl), nebo organického fosforu, méně potom pro rozpoznání antibiotik. Pro rozpoznání pesticidů se využívá jejich inhibiční efekt na enzymy acetylcholinesterázu nebo butyrylcholinesterázu, případně tyrozinázu nebo parathionhydrolázu pro stanovení koncentrace parathionu. Rozsah inhibice závisí na druhu a koncentraci pesticidu.<sup>23</sup>

Přibližně 30 % herbicidů inhibuje proces fotosyntézy, čehož se využívá k jejich detekci při dosažení LOD až 10 ppb pro atrazin. Při použití thylakoidů, membrán chloroplastů, jednobuněčných řas, fotosystému II nebo purpurových bakterií, jako receptorů v kombinaci s různými transduktory, byly detekovány herbicidy jako např. propanil, bromoxynil, chlortoluron, diuron a isoproturon. Hlavní překážka, která brání rozšíření takovýchto biosenzorů je nestabilita biologické složky a nutnost předchozí přípravy vzorku.

Enzymové biosenzory byly použity v technice FIA (flow injection analysis – průtoková analýza) např. pro detekci penicilinu V a G, receptorem byl enzym penicillináza. Enzymatickou reakcí dojde k přeměně penicilinu na penicilinovou kyselinu, pH v okolí senzoru se sníží a vzroste vodivost (využití v případě amperometrického transduktoru). V případě optického transduktoru se použije pH marker (např. polypyrrol), kde s poklesem pH dojde k poklesu intenzity fluorescence barviva.<sup>23</sup>



**Obrázek 11.** Schéma funkce biokatalytického receptoru a možností navazujících způsobů detekce; Patel P.D

### 3. 1. 2 Bioafinitní (imunochemické) senzory

Imunosenzory mají jako receptorovou část imobilizované protilátky nebo antigeny, ať již přímo, nebo prostřednictvím jiné biomolekuly. Navázáním protilátky nebo antigenu ze vzorku k svému imobilizovanému protějšku vznikne na senzoru termodynamicky stabilní komplex. Tento komplex nevytváří elektrochemicky detekovatelnou změnu v prostředí a reakci nelze detekovat elektrochemickými transduktory. Pro detekci je třeba provést značení protilátky nebo antigenu.

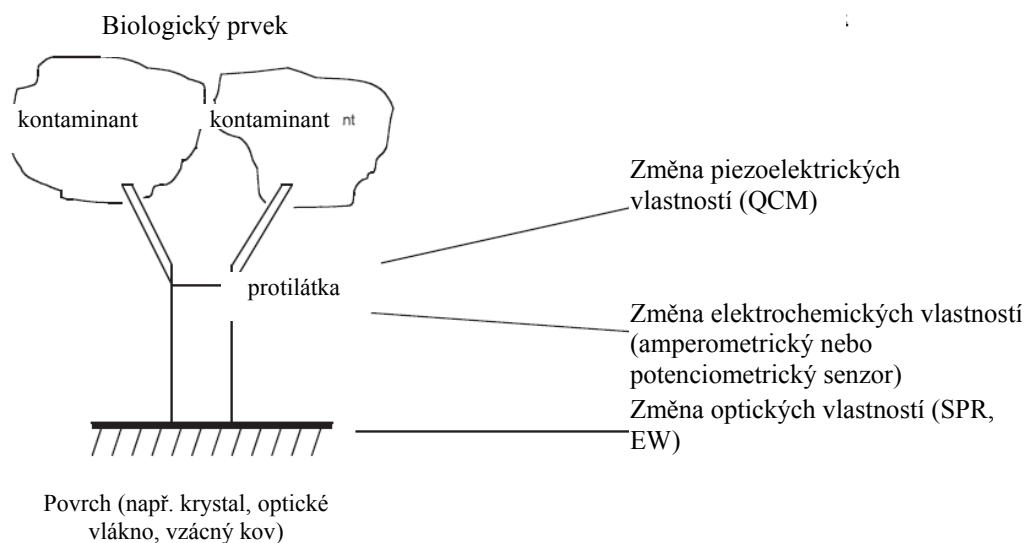
Pro nízkomolekulární kontaminanty se používá většinou kompetitivní formát metody. Jsou možné dvě varianty kompetitivního formátu. V jedné imobilizované protilátky a značené antigeny soutěží o vazebná místa s antigeny ze vzorku, v druhé pak imobilizované antigeny soutěží s antigeny ze vzorku o vazebná místa na značených protilátkách. Druhá varianta je v praxi preferovaná, protože nevykazuje potíže plynoucí z imobilizace protilátek – ztráta afinity nebo špatná orientace navázané protilátky. Nízkomolekulární antigeny jsou v takovém případě imobilizovány jako komplex s nosičovým proteinem (antigen-BSA Ag-OVA).

Při použití SPR a piezoelektrického biosenzoru odpadá použití značených protilátek nebo antigenů, z důvodu měření reakce jako přírůstku hmoty. SPR nemá ale takovou citlivost, aby stačila přímá reakce antigen – protilátka, což vytváří nutnost použití kompetitivního nebo sendvičového formátu metody pro malé molekuly ( viz **Obr. 12**).

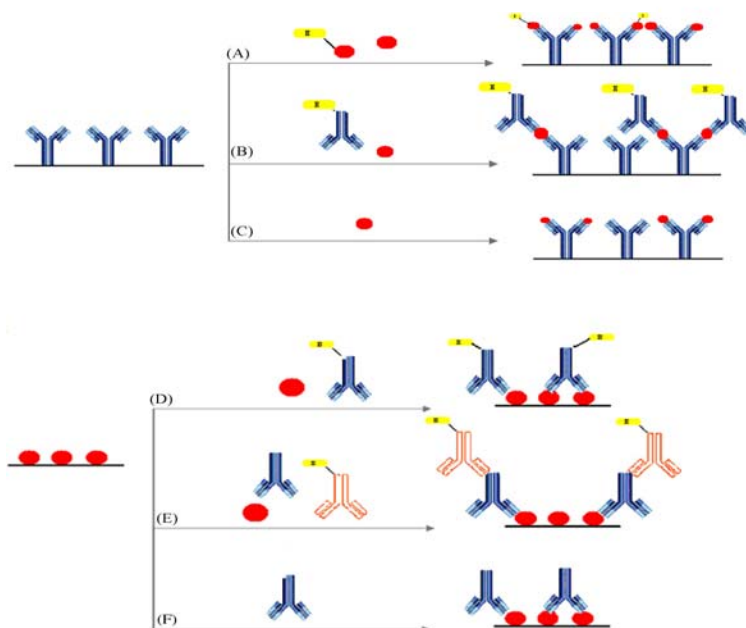
Rozvoj přípravy protilátek umožňuje syntetizovat vysoce účinné protilátky proti každé organické sloučenině.<sup>22,23,24</sup>

Podle použitých transduktorů se dále imunosensory dělí na piezoelektrické, elektrochemické, termometrické (kalorimetrické) a optické, přičemž dále v této práci bude dán prostor hlavně poslednímu jmenovanému principu.

U elektronických senzorů je nosičem pracovní elektroda, v případě SPR čip a QCM křemenný krystal. Pro kompetitivní a sendvičové metody (A,B,D) prováděné na SPR čipu nebo QCM se nepoužívá značení.



**Obrázek 12.** Funkce bioafinitního receptoru a možností navazujících způsobů detekce; Patel P.D



**Obrázek 13.** Schematické zakreslení formátů imunochemických metod; Ricci et al.

Nahoře: protilátky imobilizované na povrchu

A) přímá kompetitivní metoda s enzymem značeným antigenem.

B) sendvičový formát využívající protilátky navázané na povrchu a protilátky značené enzymem.

C) přímý formát metody pro SPR a QCM

Dole: antigen imobilizovaný na povrchu.

D) přímý kompetitivní formát využívající protilátky značené enzymem

E) nepřímý formát metody se sekundárními značenými protilátkami

F) přímý formát metody pro SPR a QCM

### *(i) Elektrochemické imunosenzory*

Počítáme mezi ně amperometrické a potenciometrické. Potenciometrické imunosenzory měří potenciál, který je úměrný logaritmu koncentrace aktivních částic, proti referenční elektrodě a vzniká navázáním antigenu ze vzorku na protilátky vázané na povrchu měřicí elektrody. Příkladem takového imunosenzoru jsou iontově selektivní elektrody (ISE) s membránou s imobilizovanými protilátkami a transistorovými zesilovači signálu.

Amperometrický imunosenzor vytváří jako výstupní signál proud, který vzniká redukcí nebo oxidací částic na povrchu elektrody pokryté protilátkou nebo antigenem. Interakce mezi protilátkou a antigenem dává jen slabou odezvu a proto je třeba využít značení enzymy, jejichž reakce se substrátem vyvolá přenos elektronu. Přenos elektronu z biologických molekul na elektrodu je zaznamenán jako proud, který je přímo úměrný koncentraci enzymem značených navázaných částic. Amperometrické senzory jsou ve své reakci rychlejší, citlivější a přesnější než potenciometrické. Obvykle se používají stejné konjugáty protilátek a enzymů jako u metody ELISA.<sup>22,23,25</sup>

Elektrody se obvykle vyrábějí z inertních kovů jako je platina, zlato nebo různé formy uhlíku. Uhlíkové pasty a inkousty slouží k natištění elektrod na plastový nosič čímž vznikne SPE (screen-printed electrode). SPE technologie umožňuje miniaturizaci a komerční výrobu těchto senzorů.

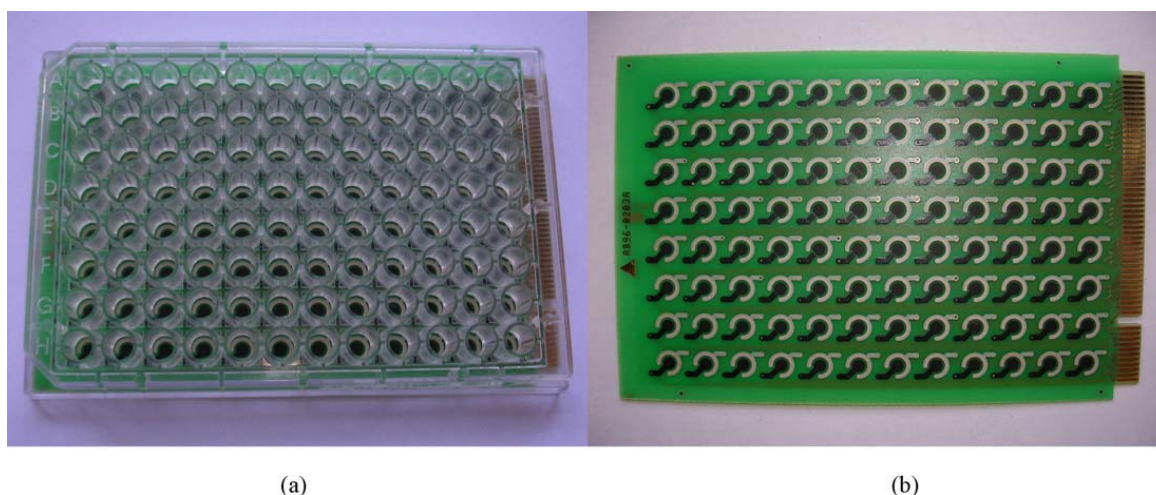
Zajímavý typ elektrochemické detekce imunochemické reakce je multichannel elektrochemical immunoassay (MEI), kombinující výhody provedení stanovení na mikrotitrační destičce s citlivostí elektrochemické detekce. Mikrotitrační destička s 96 jamkami má modifikované dno ve kterém je zakomponováno 96 SPE senzorů pracujících v několika milisekundových intervalech stejného potenciálu oddělených delším obdobím prodlevy (IPA – intermittent pulse amperometry). Studie Piermarini et al.<sup>26</sup> z roku 2007 popisuje stanovení aflatoxinu B1 v pšenici prostřednictvím MEI metody. Pracovní grafitová a referenční stříbrná elektroda byly natištěny na plastový nosič (obr. 14). Mikrotitrační destička se přímo propojí s čtecím zařízením.

Princip stanovení kopíruje nepřímý kompetitivní formát ELISA s pomocí nosičového proteinu imobilizovaným antigenem. Povrch SPE elektrod byl pokryt konjugátem aflatoxin-BSA a proběhla inkubace. Kompetiční krok byl realizován přidáním roztoku obsahujícího aflatoxin současně s protilátkami proti aflatoxinu. Následně po promytí se přidaly sekundární protilátky značené alkalickou fosfatázou. Byl přidán substrát pro alkalickou fosfatázu, naftyl fosfát sodný, a množství vzniklého produktu enzymatické reakce (1-naftolu) bylo detekováno pomocí IPA. Parametry popisované metody ilustruje **Tabulka IV**.



**Tabulka IV.** Srovnání analytických parametrů ELISA a MEI při detekci aflatoxinu B1

analytický parametr	spektrofotometrická detekce	MEI
LOD (ng/ml)	0,15	0,03
Lineární rozsah (ng/ml)	0,25-2,0	0,05-2,0
B/B-50% (ng/ml)	0,77	0,26
RSD (n=8) intra (%)	4	5
čas provedení (h)	3	1



Obr. 14. a) mikrotitrační destička MEI, b) 96 SPR elektrod na nosiči, vpravo konektor k detektoru; Piermarinu et al

Možnost provést opakované stanovení v několika neznámých vzorcích spolu s kalibrací a stanovením blanků naráz řeší jednu z nevýhod elektronických imunosenzorů – nutnost provádět stanovení jednotlivě. MEI umožňuje komplexnější stanovení než jednotlivé elektrody, protože je možno imobilizovat do jednotlivých řad jamek různé protilátky a vzorek testovat na více různých kontaminantů.<sup>26</sup>

### ***(ii) Piezoelektrické imunosenzory***

Jsou založené na rezonanci křemenného krystalu v střídavém elektrickém poli. Na povrchu krystalu jsou navázané protilátky. Frekvence vznikající oscilace je funkcí hmoty krystalu, která se změní navázáním antigenů na povrchově vázané protilátky. Pokud se měří změna frekvence oscilace celého krystalu, hovoříme o bulk acoustic (nebo také quartz crystal microbalance – QCM) zařízení (frekvence se sníží se zvětšením hmoty a je funkcí navázání antigenů). V případě že akustická vlna běží pouze po povrchu potom se jedná o tzv. surface acoustic wave zařízení.

QCM sestává ze dvou kruhových elektrod, mezi nimiž je vložen řez krystalu. Střídavý proud mezi elektrodami způsobuje oscilaci krystalu, kterou ovlivňuje navázání analytu na

imobilizované protilátky nebo antigeny.<sup>1,27</sup> Stejně jako SPR senzory nevyžadují ani tyto značení antigenů nebo protilátek.

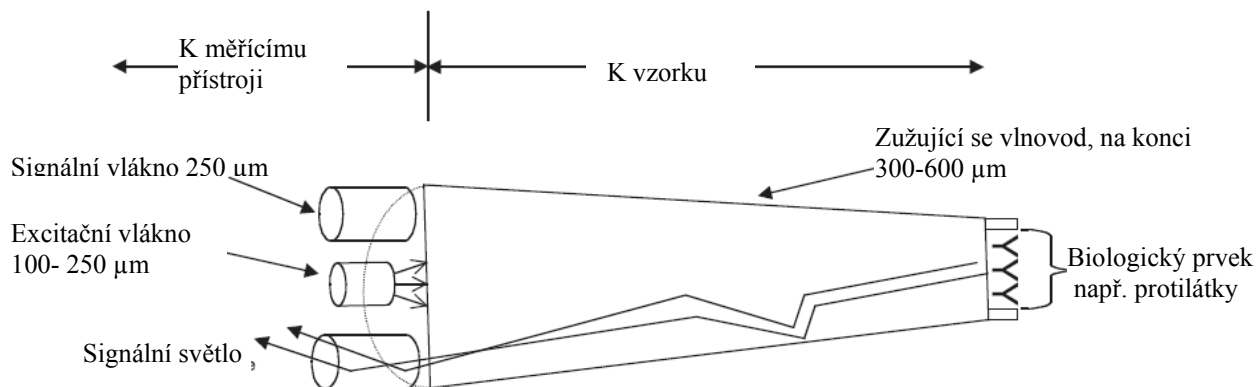
Využití QCM našlo zatím v detekci mikrobiálních kontaminantů potravin, například patogenních bakterií rodů *Escherichia* a *Salmonella* - pro stanovení chemických kontaminantů není zatím obvyklé.

### (iii) Optické imunosenzory

#### a) založené na optickém vlákně:

Na zužujícím se optickém vlákně je na užším konci imobilizovaný biologický prvek, protilátka nebo antigen. Světlo vstupuje širším koncem a totálním vnitřním odrazem cestuje k užšímu konci, kde dojde k absorpci záření. Měří se buď emise fluorescence analytů, nebo v případě, že samotné analyty nefluoreskují, emise fluorescence vhodného reaktantu. Vztah (přímý nebo nepřímý) fluorescence ke koncentraci analytu závisí na formátu metody.<sup>23</sup>

Ačkoli optické fluorescenční senzory mají dobrou citlivost, jejich využití v praxi limitují faktory jako neselektivní adsorpce a interferující fluorescence pozadí.<sup>24</sup>



**Obrázek 15.** Schéma biosenzoru na principu optického vládovodu; Patel P.D

### ***b) založené na tlumených vlnách***

Světlo cestuje vlnovodem pomocí mnohačetných vnitřních odrazů, čímž vzniká elektromagnetické tlumené vlnění, která proniká přibližně 200 nm nad povrch vlnovodu. Analyty navázané na protilátky imobilizované na povrchu vlnovodu energii vlny absorbují a potom ji jako fluorescenci vyzáří. Fluorescence je funkcí koncentrace analytu.<sup>24</sup>

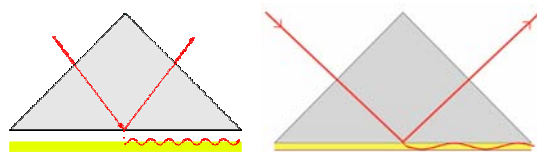
### ***c) surface plasmon resonance (SPR)***

SPR je optický jev dovolující monitoring interakce mezi analytem ze vzorku a imobilizovanou biomolekulou v reálném čase bez nutnosti značení reaktantů. SPR imunosenzor je nejatraktivnější z biosenzorů pro analýzu kontaminantů z důvodu jeho citlivosti, selektivity, rychlosti a spolehlivosti. Za nejužitečnější vlastnost se považuje schopnost SPR imunosenzoru detekovat malé molekuly (obvykle se v souvislosti s analýzou potravin považuje za malé menší než 1000 Da) s neobvykle nízkým LOD v komplexních matricích jako jsou potraviny. Nejčastěji se používá v průtokové analýze, kdy v roztoku pufru prochází vzorek přes povrch receptoru, kde dochází ke specifické bioafinitní reakci.<sup>22,23,28</sup>

## **3.2 Konstrukce a princip SPR imunosenzoru**

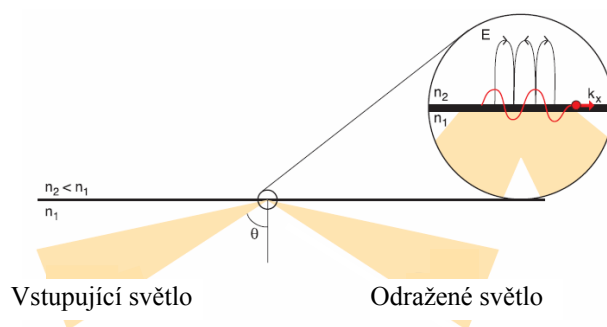
SPR imunosenzory sestávají ze zdroje světla, transparentního hranolu, transdukčního povrchu (film vzácného kovu), biomolekul (protilátek nebo antigenů) a průtočného systému přivádějícího roztok vzorku. Transdukční povrch je obvykle tvořen 50-100 nm silným zlatým filmem na sklíčku (čip SPR biosenzoru), které je imerzním olejem opticky spojeno s hranolem. Kromě zlata se používají ještě další kovy např. stříbro, měď nebo hliník, ale zlato je preferováno pro svou chemickou stabilitu a chování volných elektronů.

Umístěním zlatého filmu se odlišují dvě konstrukce, Ottova a Kretschmannova (viz **Obr. 16**). V Ottově nastavení je zlatý film dostatečně blízko k rozhraní, na kterém se vstupující světlo odráží, aby byl v dosahu stojatého vlnění, ale není s hranolem v přímém kontaktu. Plazmony se vybudí a šíří se po kovovém povrchu v prostoru mezi hranolem a kovovou vrstvou. Pro praktické použití se tato konfigurace příliš nehodí, a používá se Kretschmannovo uspořádání, tak jak je popsáno v této práci. Původně v Kretschmannově uspořádání byl film kovu nanesen přímo na hranol. Výměnná sklíčka se zlatou vrstvou umožňují provedení různých analýz, přičemž hranol zůstává stejný.



**Obrázek 16.** Jednoduché schéma Ottova (vlevo) a Kretschmannova uspořádání

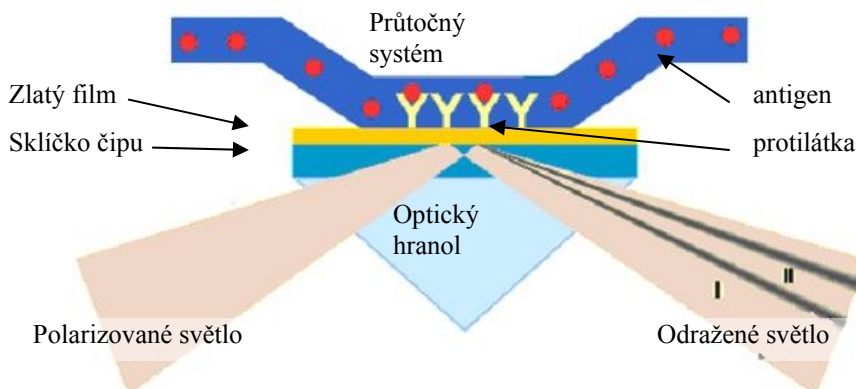
Pro popis SPR je užitečné nejdříve definovat jev totální vnitřní odraz (total internal reflection – TIR). Vzniká na rozhraní dvou prostředí s různými indexy lomu (obr. 17). Paprsek procházející prostředím s větším indexem lomu se na rozhraní s prostředím o menším indexu lomu, za předpokladu, že úhel vstupu je větší než kritický, úplně odrazí zpět. Ačkoli paprsek při TIR neztratí nic ze své počáteční energie, vybudí se v místě odrazu v prostředí s nižším indexem lomu stojaté vlnění (evanescent field – E). Amplituda tohoto vlnění klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní. Hloubka, do které stojaté vlnění pronikne, se definuje jako vzdálenost kde intenzita vlny klesne na  $1/e$  nebo přibližně 37 % její maximální intenzity.



**Obrázek 17.** Schéma vzniku stojatého vlnění (E) na rozhraní s různými indexy lomu;  
<http://www.protein.iastate.edu/seminars/BIACore/TechnologyNotes/TechnologyNote1.pdf>

Pokud na výše popsané rozhraní připojíme vrstvu vzácného kovu vhodné tloušťky, p-polarizovaná složka (složka rovnoběžná s rovinou tvořenou vstupním a odraženým paprskem) stojatého vlnění může proniknout kovem, vybudí volné elektrony v kovu a na povrchu se projeví jako plazmon- vlnění elektronového náboje, které se šíří podle povrchu kovu. Pro nemagnetické kovy jako je zlato bude potom plazmon také p-polarizovaný a díky svým elektromagnetickým vlastnostem a způsobu šíření zvětší stojaté vlnění. Toto stojaté vlnění proniká jenom na krátkou vzdálenost do prostředí nad zlatým filmem a vzdálenost je ovlivněna indexem lomu prostředí. Vybuzení plazmonu způsobí charakteristický pokles

intenzity odraženého světla. Bioafinitní interakce na povrchu zlatého filmu způsobují změny v koncentraci prostředí a tím jeho refrakčního indexu.



**Obrázek 18.** Schéma průtočné cely SPR biosenzoru umístěné na hranolu s čipem;  
<http://www.protein.iastate.edu/seminars/BIAcore/TechnologyNotes/TechnologyNote1.pdf>

Vstupní p-polarizované světlo je zaostřeno do svazku klínového tvaru, který pokrývá potřebné vstupní úhly. Vzrůstající koncentrace analytu na povrchové vrstvě senzoru způsobuje růst indexu lomu. Úhel vstupního paprsku se mění tak, aby se stále tvořil plazmon. Změna vstupního úhlu je sledována změnou pozice detektoru, zachycující odražené světlo. (viz **Obr. 18** posun z I – II). Výstupem ze zařízení používajícího SPR je sensorgram.<sup>28, 29, 30, 31</sup>

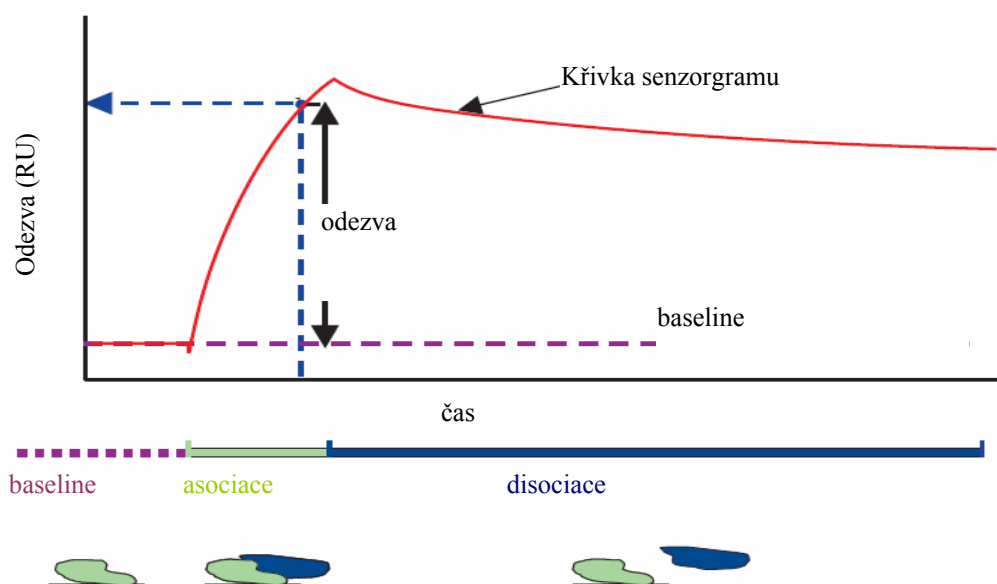
Je znám vliv teploty na index lomu vodných roztoků a proto je třeba při stanovení dodržovat konstantní teplotu, pro kterou je navržen. Hlavně imobilizované protilátky vyžadují specifickou konstantní teplotu pro optimální vazebné vlastnosti. S teplotními výkyvy se lépe vyrovnávají senzory s více průtokovými komorami. Použití v terénu, ke kterému miniaturizace SPR biosenzorů také směřuje, vyžaduje termostabilizační systém, který zajistí konstantní teplotu v průběhu stanovení. Změna teploty o 0,1 °C v průběhu stanovení může způsobit změnu RI v řádu  $1 \times 10^{-5}$ , což je hodnota srovnatelná s nejnižším detekovatelným signálem senzorů s dvěma celami. Malou změnu teploty (1 °C) lze korigovat softwarově, ale protože teplota má vliv i na RI vlastního senzoru, čipů i spojení čip – tělo senzoru (viskozita a hustota spojující kapaliny), vazebných vlastností protilátek, intenzitu světla produkovanou LED (light emitting diode) diodami a další, hrozí nebezpečí, že signál analytu bude touto korekcí deformován. Změny teploty se projeví také „znovuobjevením“ optických vad, které byly při výrobě pro určitou teplotu senzoru vyrovnány. Proto má na citlivost vůči výkyvům světla vliv kvalita provedení optických prvků senzoru. Univerzálnějším řešením než

softwarová korekce se ukázalo izolování senzoru do vhodného boxu, s termostabilizačním systémem řízeným mikroprocesorem.

Pro terénní použití jsou oproti laboratorním jednotkám upraveny i další základní komponenty SPR biosenzoru. Kromě prvků, jejichž úkolem je kontrolovat a udržet konstantní teplotu je patrná změna hlavně v optice, kde LED nahrazují křehké a nákladné lasery.<sup>32</sup>

Použití druhého a třetího průtočného kanálu u senzorů s více celami se využívá pro kvantifikaci nespecifických vazeb na povrch čipu.

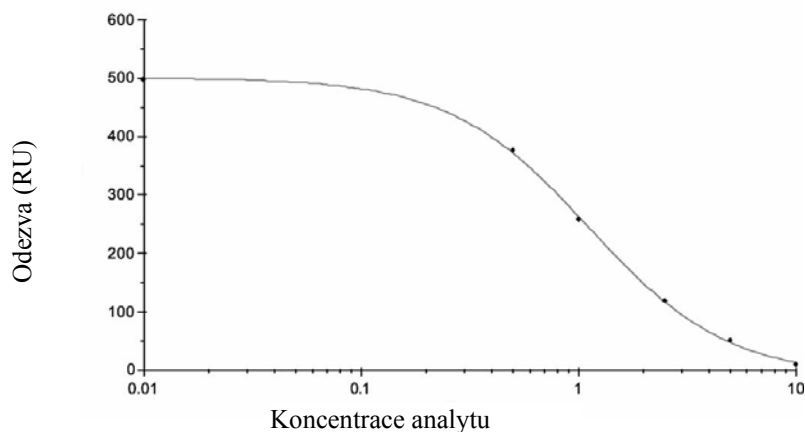
### 3.2.1 Interpretace senzogramu



**Graf 9.** Senzogram; modrá čárkovaná linie ukazuje možnost odečítání závislosti odezvy na čase; [http://www.biacore.com/food/technology/assay\\_principles/following\\_an\\_interaction/index.html?backurl=%2Ffood%2Ftechnology%2Fassay\\_principles%2Findex.html](http://www.biacore.com/food/technology/assay_principles/following_an_interaction/index.html?backurl=%2Ffood%2Ftechnology%2Fassay_principles%2Findex.html)

Senzogram (**Graf 9**) je grafickým vyjádřením probíhající imunochemické reakce na povrchu senzoru. Vynáší se odezva (změna úhlu odraženého světla) v rezonančních jednotkách (RU, 1 RU je ekvivalentní 1  $\mu$  jednotce indexu lomu) proti času. Základní linie reprezentuje stav, kdy přes senzor protéká čisté rozpouštědlo, křivka senzogramu je v takovém časovém intervalu konstanta. V okamžiku, kdy přes senzor protéká roztok vzorku obsahující stanovované analyty, se tyto váží na biologickou složku senzoru a odezva se zvětšuje. Křivka senzogramu klesá, když dochází k disociaci analytů. V případě, že asociace a disociace jsou v rovnováze, odezva je konstantní. Senzogram reflektuje reakce v reálném čase a umožňuje odvození kinetických konstant reakcí a koncentrace vzorku.<sup>29,31</sup>

Neznámá koncentrace se určí v závislosti na použitém formátu metody z kalibrační závislosti, kterou tvoří křivka v souřadnicích koncentrace analytu a odezva SPR senzoru. Nejpoužívanější formát stanovení pro malé molekuly je kompetitivní s imobilizovaným analytem nebo jeho analogem na povrchu senzoru (viz **Obr. 13**). Kalibrační křivka má potom obdobný tvar jako při aplikaci kompetitivního formátu metody ELISA (**Graf 10**).



**Graf 10.** Závislost odezvy SPR biosenzoru na koncentraci analytu v kompetitivním formátu; Traynor et al.

### 3. 2. 2 Regenerace povrchu

Při výrobě čipu je třeba uvážit jeho opakované používání a z toho vyplývající potřebu stability navázané biologické složky, která se nesmí z povrchu vymývat. Pro adsorpci biologické složky je vyvinuta řada metod např. přímá adsorpce nebo použití self-assembled monolayers (SAM). Dále je důležité zajistit, aby nemohlo dojít k navázání jiných proteinů ze vzorku (mimo protilátky) na povrch senzoru, což by mělo za následek falešně pozitivní signál. Proto se stejně jako u ELISA blokuje volný povrch BSA (bovine serum albumine) nebo jinou bílkovinou. Signál tvořený touto vrstvou a protilátkami tvoří základní linii sensogramu.

Pro snížení nákladů je výhodné konstruovat biosenzory pro opakované použití v různých vzorcích. Povrch biosenzoru musí být schopný regenerace a při dalším použití musí metoda dosahovat dobré opakovatelnosti. Reakce vedoucí k tvorbě komplexu antigen-protilátka je reversibilní. Regenerace povrchu probíhá disociací tohoto komplexu působením různých procesů, na jejichž provedení mají vliv faktory jako je původ protilátek, použité chemikálie při procesu imobilizace a další. Protože je terciární struktura protilátek citlivá na změny pH, používá se na rozrušení vazby často roztoků o různém pH od silně kyselého po alkalické. Nejpoužívanější jsou roztoky HCl, NaOH, glycin-HCl, pepsinu a ethanolaminu. Silné eluenty ale mohou postupně poškodit vazebné schopnosti protilátek a tím snížit účinnost

čipu. Imunosenzory, které využívají imobilizovaný analyt nebo jeho konjugát s nosičovou bílkovinou, jsou vhodnější pro regeneraci, než ty které využívají imobilizovaných protilátek právě proto, že antigen je zpravidla dlouhodobě stabilnější při použití elučních činidel.

Počet cyklů, které lze dosáhnout při regeneraci SPR biosenzoru, se liší od 100 do 500 a některé studie uvádějí dokonce 1500 cyklů.<sup>28</sup>

### 3. 2. 3 Výhody použití SPR biosenzorů

SPR analýza nevyžaduje značkování reaktantů. Značkování je nákladné a časově náročné na provedení, v případě značení radioaktivním izotopem vyžaduje speciální zacházení a vybavení. Značkování dokonce může změnit reaktivitu nebo specifickou reakci. Hydrofobní fluorescenční značky mají tendenci k vazbám na pozadí, čímž může vzniknout falešně pozitivní signál.

Aktivní povrch senzoru může být po použití regenerován speciálním roztokem, což umožňuje mnohonásobné použití stejného čipu. Jeden SPR biosenzor umožňuje opakovanou analýzu roztoků, které neobsahují cílový analyt, protože nedochází k žádné reakci, což je ideální pro průtokovou analýzu.

Změna metody pro jiné cílové látky, spočívající ve výměně čipu a jeho základní stabilizaci v roztoku pufru je operace trvající v řádech minut.

### 3. 2. 4 Příklady aplikace SPR biosenzorů v analýze kontaminantů

Vývoj na poli využití SPR biosenzorů se stále zrychluje. Vzhledem k tomu že se předpokládá možnost přípravy protilátky pro prakticky jakoukoli organickou sloučeninu, je vývoj nových metod odvislý hlavně od jejich syntézy a dále potom na odstranění rušivých matričních efektů.

V následujícím textu bude uvedeno několik studií popisujících vývoj metod, využívajících SPR biosenzorů k detekci reziduí veterinárních farmak a mykotoxinů. Sady čipů a potřebných reagentů pro stanovení některých ze zde uvedených kontaminantů (rezidua tylosinu, celkových sulfonamidů, sulfamethazinu, sulfadiazinu a beta agonistů) již byly uvedeny na trh firmou Biacore, na jejíž základních čipech probíhá většina výzkumů nových



aplikací. Sady slouží k jednoduchému rozšíření možností detekce kontaminantů uživatelům zařízení Biacore Q.

### **(i) Rezidua veterinárních farmak**

Rezidua veterinárních farmak se stanovují v mase, vejcích nebo tělních tekutinách hospodářských zvířat a drůbeže z důvodu kontroly dodržování ochranných lhůt při jejich aplikaci a odhalování případného zneužívání léčiv. S rozšiřováním použití různých léčiv přirozeně roste i potřeba kontroly jejich pohybu v potravním řetězci s důrazem na zajištění nezávadných potravin. Rostoucí význam má společné stanovení různých látek s podobnou strukturou a účinky, které se používají jednotlivě v povolených koncentracích, ale spolu v sumě mohou v konečných produktech překročit MLR pro svou definiční skupinu.

#### **a) Tylosin**

Slouží jako veterinární léčivo pro zvířata pěstovaná pro maso a současně u prasat podporuje růst svalové hmoty. Použití tylosinu jako růstového přípravku pro prasata bylo v EU zakázáno v roce 1999, s tím že použití tylosinu jako léčiva není omezeno. V posledních letech se začalo ve včelařství ve větší míře používat tylosinu jako náhrady za oxytetracyklin, ke kterému si bakteriální kmeny vytvořily rezistenci. Současně s tímto nárůstem vyvstal požadavek na screeningovou metodu pro detekci tylosinu v medu.

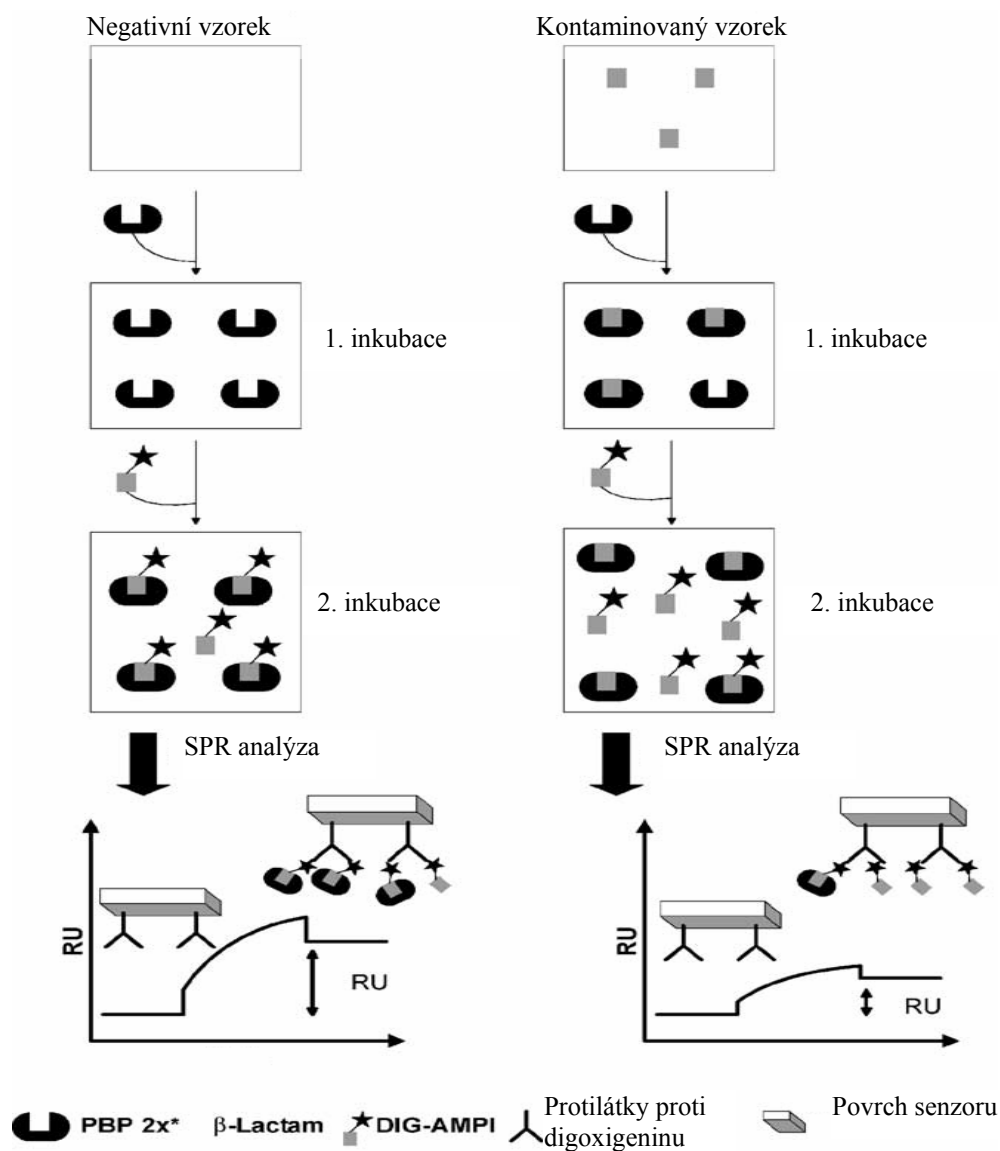
Senzor založený na využití SPR Biacore čipu byl připraven pro kompetitivní formát stanovení a imobilizovaným antigenem (**Obr. 13. B**). Vzorek medu se rozpustil ve fosfátovém pufru a byl přečištěn na SPE. Pracovní rozsah metody byl stanoven proměřením cíleně kontaminovaných vzorků na hladiny 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 a 10  $\mu\text{g/kg}$  jako interval od 0,5 do 4  $\mu\text{g/kg}$ . Při všech stanoveních byla dosahována průměrná výtěžnost 60,3 % a RSD 9,1 %. Metoda vykazovala 60 % křížovou reaktivitu se spiramycinem, což lze považovat za hlavní nevýhodu tohoto postupu. S jinými látkami prakticky ke křížové reakci nedochází. Při srovnání stanovení dvaceti prokazatelně negativních a stopová množství reziduí tylosinu obsahujících vzorků pomocí biosenzoru a LC/MS/MS bylo dosaženo dobré korelace zjištěných hodnot.<sup>33</sup>

Komerčně dostupný Qflex Kit Tylosin při respektování popsané přípravy vzorku vykazuje  $\text{LOD} = 2,82 \mu\text{g/kg}$ , při zjednodušené přípravě vzorku, spočívající v pouhém naředění roztokem pufru a přefiltrováním potom 5  $\mu\text{g/kg}$ .<sup>34</sup>

## ***b) $\beta$ -Laktamová antibiotika***

$\beta$ -Laktamová antibiotika představují hlavní zdroj reziduí antibiotik v kravském mléce. Jsou to nejčastěji předepisovaná antibiotika proti klinické mastitidě, nemoci dojníc, způsobující vady mléka (nestejná hustota, sraženiny).

SPR metoda pro stanovení reziduí antibiotik odvozených od penicilinu a cephalosporinu v syrovém mléku, je založená na použití vysokomolekulárního penicilin vázajícího derivátu proteinu bakterie *Streptococcus pneumoniae* (PBP 2 $\times$ \*). Vazba antibiotika ampicilinu značeného digoxigeninem (DIG-AMPI) a PBP 2 $\times$ \* je inhibovaná přítomností jiných  $\beta$ -laktamových antibiotik. Biacore senzor je osazen čipem s protilátkami proti digoxigeninu. V průběhu první inkubace dochází k vazbě mezi PBP 2 $\times$ \* a  $\beta$ -laktamovým antibiotikem, pokud je přítomno. V negativním vzorku k vazbě nedojde. Přidá se DIG-AMPI, který zaujme místa na PBP 2 $\times$ \* dosud neobsazená antibiotiky ze vzorku. V negativním vzorku DIG-AMPI zaujme místa na všech molekulách PBP 2 $\times$ \*, zatímco v pozitivním pouze ty, na kterých není dosud navázán analyt. Roztok se injektuje na povrch biosenzoru. Dochází k vazbě mezi DIG a jeho specifickými protilátkami. Z výše uvedeného plyne, že větší odezvu má negativní vzorek, protože komplex stanovovaných antibiotik s PBP 2 $\times$ \* se na senzor neváže (**Obr. 19**).



**Obrázek 19.** Schéma tanovení  $\beta$ -laktamových antibiotik v negativním (vlevo) a kontaminovaném vzorku pomocí SPR biosenzoru; Cacciatore et al.

Bylo zjištěno, že syrové mléko vykazuje silné matriční efekty, pravděpodobně díky nescifickému vázání. Matriční efekty se snížily záhřevem vzorku. Přesto se podařilo u benzylpenicilinu (MLR 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a dalších  $\beta$ -laktamových antibiotik dosáhnout LOD srovnatelného s MLR. Metoda je tedy vhodná pro screenig. Pro další použití bude ještě potřeba nalézt způsob jak eliminovat matriční efekty syrového mléka.<sup>35</sup>

### *c) Sulfonamidy*

Sulfonamidy jsou skupinou antibakteriálních přípravků podávaných zvířatům z preventivních i terapeutických důvodů. Přestože si bakteriální kmeny za 50 let používání sulfonamidových přípravků vytvořily jistou rezistenci, používají se stále samostatně i jako doplňková léčba hospodářských zvířat. Vzhledem k masivnímu používání, vedlejším účinkům a tvorbě rezistence u konzumentů v případě chronického vystavení konzumaci reziduálních koncentrací, byl stanoven MLR. Pro souhrn sulfonamidů v jedlém podílu potravin v EU i USA je stanoven MLR 100 µg/kg.

V roce 2005 byl publikován vývoj biosenzoru založeného na komerčním čipu CM5 firmy Biacore, který umožňoval detekovat 20 různých sulfonamidů jako skupinu ve vepřovém masu při jedné analýze s tím, že neúčinné acetylované metabolity nezvyšovaly výsledky stanovení. Tradiční imunochemické metody mohou být ovlivněny těmito metabolity a současně neumožňují stanovení sulfonamidů jako skupiny ale pouze jako chemických individuů.

Příprava vzorku pro vepřové maso spočívala v odstranění viditelné tukové tkáně a homogenizace s roztokem HBS (HEPES buffered saline). Po odstředění byl odebrán alikvot roztoku pro analýzu. Formát metody byl navržen jako inhibiční – známá koncentrace proteinu vázajícího sulfonamidy (SBP) byla přidána do roztoku vzorku, který se následně analyzoval na SPR zařízení s imobilizovanými deriváty sulfonamidů. V případě negativního vzorku došlo k vazbě SBP na čip což se projevilo jako nárůst odezvy. Sulfonamidy v pozitivním vzorku utvoří komplex s přidaným SBP a na biosenzor se již neváží - úroveň inhibice je úměrná koncentraci analytu. Kontaminovaný vzorek má tedy nižší odezvu.

Bylo dosaženo LOD 2,7 ng/ml, což při uvážení zředění odpovídá 16,9 ng/g vepřové tkáně. Při cílené kontaminaci 10 negativních vzorků na koncentrace 100 a 50 ng/g (MLR a polovina MLR) sulfamethazinem a sulfadiazinem bylo dosažena opakovatelnost stanovení menší než 8 %.<sup>36</sup>

Q flex kit pro stanovení celkových sulfonamidů vychází z výše popsané studie je použitelný pro různé matrice – vepřové a drůbeží maso, ledviny, med, sérum a plazmu.<sup>37</sup>

Q flex kit pro stanovení sulfadiazinu vykazuje LOD = 6 µg/kg vepřového masa a kit pro stanovení sulfamethazinu potom 86 µg/kg.<sup>38,39</sup>

Všechny tři komerčně dostupné sady využívají jednoduché přípravy vzorku spočívající v homogenizaci s extrakčním pufrům a následném odstředění.

#### d) *Flumequin*

Flumequin je fluorochinolová sloučenina s antimikrobiálními účinky, zvláště proti gramnegativním bakteriím. Slouží k předcházení bakteriálních infekcí u zvířat chovaných pro maso. V lidské medicíně našla omezené použití při léčení onemocnění močových cest. Pokusy na myších a krysách ukázaly její hepatotoxicitu a bylo zjištěno, že u myši dlouhodobě vystavených jejímu orálnímu požívání rostla pravděpodobnost vzniku rakoviny jater. MRL byl stanoven na 400 ng/g.<sup>40</sup>

Byla zjišťována koncentrace reziduí flumequinu v drůbežím mase a krevním séru. Vzorky séra byly připravovány pouze pětinasobným naředěním, homogenizovaná tkáň byla extrahována pufrům a extrakt byl také pětkrát naředěn. Na standardním CM5 Biacore čipu byl imobilizován flumequin a použil se přímý inhibiční formát metody (**Obr. 13. D**). Metoda nevykazovala žádnou křížovou reaktivitu vůči ostatním chinolinům a rozsah stanovitelných koncentrací byl 15 – 800 ng/ml. Stanovení včetně regenerace povrchu trvalo 7,5 minuty a uvádí se, že senzor vydržel bez změny vlastností tisíce cyklů. Výťažnost cíleně kontaminovaných vzorků masa byla maximálně 75 %. **Tabulka V** ukazuje, jak si lišily nálezy ve vzorcích masa cíleně kontaminovaných na hladiny násobků MLR při stanovení biosenzorem a LC-MS/MS. Ačkoli byly zjištěné hodnoty u obou vyšších koncentrací přibližně o 20% nižší než při stanovení LC-MS/MS, výsledky byly velmi dobře korelované. Nižší nálezy se dají obecně přisoudit zmíněné nízké výťažnosti.<sup>41</sup>

**Tabulka V.** Výťažnost cíleně kontaminovaných vzorků drůbežím mase při použití biosenzoru a LC-MS/MS

Koncentrace v cíleně kontaminovaných vzorcích (ng/g)	nálezy (ng/g)	
	Biosenzor	LC-MS/MS
200	81±16	82±6
400	248± 6	312±12
800	447±48	562±23

#### d) *Beta-Agonisty*

Používají se k léčení bronchiálních onemocnění u hospodářských zvířat a pro uvolnění svalů člověka při astmatickém záchvatu. Ve velkých dávkách podávaných zvířatům dochází k vylepšování poměru mezi masem a tukem ve prospěch masa. V případě zneužívání tohoto léčiva producenty masa hrozí konzumentům alimentární intoxikace. Dosud vzniklé otravy se přisuzují přítomnosti reziduí clenbuterolu v hovězích játrech. Při vývoji SPR biosenzoru proti

celkovým beta agonistům byl použit následující postup, který přejímá i komerčně dostupný Qflex kit fy. Biacore pro stanovení této skupiny látek. Příprava vzorku hovězích jater zahrnovala proteolytický rozklad, enzymatický rozklad a extrakci pomocí SPE patron (Oasis-Waters). Clenbuterol byl imobilizován na povrch senzoru a roztok extraktu z jater a monoklonálních protilátek byl přiveden na povrch senzoru (**Obr. 13 D**). Byla proměřena kalibrační závislost cílenou kontaminací matrice různými sloučeninami ze skupiny beta agonistů na hladiny 0,5; 1; 2,5; 5 a 10 ng/g a byla určena křížová reaktivita proti salbutamolu (SLB). Pohybovala se od 13% pro pirbuterol do 726 % u malbuterolu. Podle rovnice 5 byly potom vypočteny jednotlivé LOD.

$$LOD_A = 100 \times \left( \frac{LOD_{SLB}}{\%C_A} \right) \quad (5)$$

LOD pro SLB byl určen jako 0,19 ng/g a například pro malbuterol byl vypočten na 0,02 ng/g. Metoda s popsanou jednoduchou extrakcí se dá využít pro screeningové vyšetření přítomnosti 14 látek z této skupiny s vysokou citlivostí v játrech skotu, ovcí a prasat. Kontaminované vzorky se pro určení konkrétní látky musí analyzovat další metodou.<sup>42</sup>

Firma Biacore dodává i sady pro stanovení jednotlivých beta-agonistů – ractopaminu a clenbuterolu pro použití ve vzorcích moči a jater hospodářských zvířat. Podle způsobu přípravy vzorku moči pro stanovení ractopaminu lze dosáhnout LOD 0,11 a 0,22 ng/ml, v játrech potom 0,17 ng/g.

Sada pro stanovení clenbuterolu předpokládá stanovení v extraktu z vzorku jater, který se odpaří a rekonstituuje v roztoku pufru. LOD je při použití tohoto kitu 0,27 ng/ml.<sup>43</sup>

#### *e) Nicarbazin*

Nicarbazin je veterinární léčivo (anticoccidikum) tvořené komplexem 4,4'-dinitrokarbanilidu (DNC) a 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidinu (DHP) v poměru 1:1. Nicarbazin se po celém světě přidává do krmení pro drůbež. Je zakázáno jeho použití u drůbeže pěstované pro vejce. Ačkoli se neprokázala karcinogenita ani mutagenita nicarbazinu, jeho sledování v potravinářských surovinách má význam z hlediska sledování použití v agrovýrobě. Předpokládá se, že má vliv na metabolismus cholesterolu. Pro DNC, jako indikátor reziduí nicarbazinu stanovila JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) MLR = 200 µg/kg.

Při vývoji metody popsané ve studii B. McCarneyho et al.<sup>44</sup> byl použit přímý inhibiční formát s imobilizovaným antigenem (**Obr. 13. D**). Na povrch komerčně dodaného

základu čipu CM5 (Biacore) byl imobilizován analog DNC. DNC ze vzorků jater a vajec byl extrahován acetonitrilem, přičemž extrakt z jater byl ještě dále zbaven nepolárních interferentů extrakcí hexanem. Extrakty byly následně převedeny do 1ml roztoku 20 % methanolu v HBS a naředěny do 20 ml HBS.

Takto připravený extrakt se smíchal s určitým množstvím protilátky a po dobu 2 min při průtoku 25  $\mu$ l/min protékal přes čip biosenzoru. Regenerace probíhala 1 min při stejném průtoku roztokem DMF v 0,18 M NaOH.

Negativní jaterní tkáň byla cíleně kontaminována DNC na hladiny 50, 100, 250, 500 a 1000 ng/g pro získání kalibrační závislosti.

Pro jaterní tkáň byl LOD stanoven jako 17,1 ng/g a LOQ jako 33,2 ng/g. Pro vejce byl potom LOD 18,9 ng/g a LOQ 34,8 ng/g.

Výsledky měření biosenzorem byly porovnány s nálezy metodou LC/MS a korelační koeficient  $R=0,94$  ukazuje na dobrou shodu mezi oběma metodami.

Byla též zjišťována rychlost stanovení pomocí obou metod, jejichž srovnání ukazuje tabulka VI. Použitím biosenzoru se snížil čas pro provedení jedné analýzy vzorku jater z 1,1 h na 0,57 h a z 1,1 h na 0,33 h u vzorku vajec. Hlavní úspora času nastala zjednodušenou přípravou vzorku umožňující zpracování větších objemů materiálu a kratší dobou měření a vyhodnocování. Software dodaný firmou Biacore umožňuje výpočet koncentrace analytu ve vzorku v okamžiku ukončení analytického cyklu.

**Tabulka VI.** Srovnání času v hodinách potřebného na zpracování vzorku

	Biosenzor		LC-MS	
	játra	vejce	játra	vejce
max. počet vzorků v sérii	20	30	14	14
příprava extraktů	6	3,5	5	3,45
přepnutí na metodu stanovující nicarbazin	0,1	0,1	0,45	0,45
doba analýzy	5,3	6,5	8,15	8,15
interpretace výsledků	0	0	1,5	1,5
celkový čas	11,4	10,1	13,6	12,05
čas na jeden vzorek	0,57	0,33	1,1	1,1

## **f) Kontaminace mykotoxiny**

Význam sledování hladin kontaminace potravin toxickými sekundárními metabolity nižších vláknitých hub byl již v obecnější rovině rozebrán v předchozím textu. Pro středoevropský region a Českou republiku představuje největší riziko kontaminace potravinářských surovin a krmiv rod *Fusarium*. V hospodářsky rozvinutých zemích s dostatečným kontrolním mechanismem sledujícím kvalitu a bezpečnost potravinářských komodit, kde nehrozí akutní intoxikace lidí, má kontaminace fusariotoxiny největší dopad na chov hospodářských zvířat, kde se snižuje jejich užitkovost. Ke kontaminaci plodin dochází již v průběhu pěstování, přičemž v okamžiku sklizně je dosaženo nejvyšší koncentrace, která se potom při skladování nesnižuje.<sup>45</sup>

### ***Deoxynivalenol***

Deoxynivalenol patří mezi fusariové toxiny s nejčastějším výskytem. Často kontaminuje pšenici, ječmen oves a žito. Díky dobré stabilitě při záhřevu přechází z kontaminovaných surovin do konečných produktů. Vzhledem k nepříznivým dopadům konzumace potravin vyrobených z kontaminovaných surovin byly Evropskou komisí přijaté maximální limity reziduí pro nezpracované suroviny a produkty z nich.<sup>46,47</sup>

Metoda kvantitativního stanovení DON pomocí SPR efektu je založena na využití kompetice mezi imobilizovaným konjugátem DON – kasein a volnými molekulami DON ve vzorku o protilátky (viz **Obr. 6. D**). Při regeneraci 6M roztokem guanidinchloridu lze DON – kasein senzor použít více než 500 krát. Optimální rozsah koncentrací je 2,5 – 30 ng/ml testovaného roztoku. Bylo provedeno srovnání výsledků analýzy extraktů vzorků přírodně kontaminované pšenice mezi biosenzorem a LC/MS/MS. Pro vzorky mleté za mokra obě metody vykazovaly dobrou shodu. Když se analyzoval suchý prášek ze zrn, bylo potřeba použít větší koncentraci acetonitrilu (80 %) a byly pozorovány matriční efekty a křížová reakce s dalšími trichotheceiny (3-acetyldeoxynivalenol, 5-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, HT2-toxin, T2-toxin).<sup>24</sup>



## 4 Použitá literatura

1. Králová B., Fukal L., Rauch P., Ruml T.; Bioanalytické metody; VŠCHT Praha, 2007; ISBN 978-807080-449-3.
2. Mikkelsen S. R., Cortón E. Bioanalytical chemistry; 2004; John Wiley & Sons, Inc; Online ISBN: 9780471623625.
3. Sherry J. : Enviromental immunoassays and other bioanalytical methods: overview and update; Chemosphere, 34 (1997) 1011-1025.
4. Technical Guide for ELISA [online]. [cit. 2008-04-10]. Available from www: <http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tcat=3>
5. Kodíček M. Biochemické pojmy, výkladový slovník; 2004; VŠCHT Praha; ISBN 80-7080-551-X.
6. McCarthy J., Immunological techniques: ELISA; Unilever R&D Colworth, 2003, UK; Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
7. Vass M., Diblíková I. Černoch I., Franěk M. 2008 ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination; Analytica Chimica Acta 608 (2008 ) 86-94.
8. Nunes S. G., Toscano I. A., Barcelo D. Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assay; Trends in Analytical Chemistry, 17 (2), 1998, 79-87.
9. Mhadhbia H., Ben-Rejeb S, Cléroux Ch, Martel A, Delahaut P.; 2006; Generation and characterization of polyclonal antibodies against microcystins—Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection; Talanta 70 (2006) 225–235.
10. Ronkainen-Matsuno N.J., Thomas J. H., Halsall H. B., Heineman W. R.: Electrochemical immunoassay moving into the fast lane. Trends in Analytical Chemistry, 21(2002) 213-225.
11. Gascón J., Barceló D.: Rapid Magnetic Particle-Based ELISA Assay Compared with Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detection for Determining Atrazine in Freeze-Dried Water Samples. Chromatographia 38 (1994) 157-162.
12. Kourilov V., Steinitz M.: Magnetic-bead enzyme-linked immunosorbent assai verifies adsorption of ligand and epitope accessibility; Analytical Biochemistry 311 (2002) 166–170.
13. Fujii S., Ribeiro R. M. R., Scholz M.B.S, Ono E.Y.S, Prete C.E.C, Itano E.N., Ueno Y. Kawamura O., Hirooka E.Y : Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. Food Additives & Contaminants, 23, (2006) 902 – 909.
14. Preston A., Fodey T., Elliot C.: Development of a high-throughput enzyme linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis. Analytica Chimica Acta 608 (2008) 178–185.
15. Mickova B., Kovalczuk T., Rauch P., Moreno M. J., Abad A., Montoya A., Ferri E., Fini F., Girotti S.: Analytical performances of validated chemiluminescent enzyme

- immunoassays to detect *N*-methylcarbamate pesticides; *Analytica Chimica Acta* 528 (2005) 243–248.
16. AflaTest [online]. [cit. 2008-04-05]. Available from [www http://vicam.com/products/aflatest.html](http://vicam.com/products/aflatest.html)
  17. AflaTest Wide Bore [online]. [cit. 2008-04-05]. Available from [www http://vicam.com/products/aflatest-wb.html](http://vicam.com/products/aflatest-wb.html)
  18. Immunochromatographic, Lateral Flow or Strip Tests Development Ideas [online]. [cit. 2008-18-05]. Available from [www http://www.pall.com/34445\\_4154.asp](http://www.pall.com/34445_4154.asp)
  19. Lateral Flow Immunochromatic Assay [online]. [cit. 2008-18-05]. Available from [www http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/L\\_F\\_Diagram.pdf](http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/L_F_Diagram.pdf)
  20. AflaCheck [online]. [cit. 2008-04-05]. Available from [www http://vicam.com/products/aflacheck.html](http://vicam.com/products/aflacheck.html)
  21. Yau K. Y. F., Lee H., Hall J. H. : Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies - *Biotechnology Advances* 21(2003) 599-637.
  22. Mello L.D. Kubota L.T.: Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77 (2002) 237–256.
  23. Patel P.D. : (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 96-115.
  24. Ricci F., Volpe G., Micheli L., Palleschi G.: A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta* 605 (2007) 111–129.
  25. Belluzo S. M., Ribone M.E., Lagier C.M.; 2008; Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics; *Sensors*, 8 (2008) 1366-1399.
  26. Piermarini S., Micheli L., Ammida N.H.S., Palleschi G., Mascone D. 2007 Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1; *Detection Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1434–1440.
  27. Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., Quinn J., Chakraborty T., O’Kennedy R.: Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water; *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 3–13.
  28. Shankaran D.R. Gobi K.V. Miura N.2007. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest; *Sensors and actuators B121* (2007) 158-177.
  29. Overview of Surface Plasmon Resonance [online]. [cit. 2008-03-12]. Available from [www: http://www.discoverensiq.com/uploads/file/support/spr/Overview\\_of\\_SPR.pdf](http://www.discoverensiq.com/uploads/file/support/spr/Overview_of_SPR.pdf)
  30. Surface plasmon resonance; Biacore (Technology note 1) [online]. [cit. 2008-03-12]. Available from [www: http://www.protein.iastate.edu/seminars/BIACore/TechnologyNotes/TechnologyNote1.pdf](http://www.protein.iastate.edu/seminars/BIACore/TechnologyNotes/TechnologyNote1.pdf)
  31. Surface plasmon resonance; Biacore (Technology note 23) [online]. [cit. 2008-03-17]. Available from [www: http://www.biacore.com/food/technology/assay\\_principles/following\\_an\\_interaction/index.html?backurl=%2Ffood%2Ftechnology%2Fassay\\_principles%2Findex.html](http://www.biacore.com/food/technology/assay_principles/following_an_interaction/index.html?backurl=%2Ffood%2Ftechnology%2Fassay_principles%2Findex.html)

32. Naimushin A. N., Soelberg S. D., Bartolomew D. U., Elkind J.L, Furlong C. E.; 2003 A potrable surface plasmon resonance (SPR) sensor system with temperature regulation *Sensors and Actuators B* 96 (2003) 253 – 260.
33. Caldwell M., Stead S. L., Day J., Sharman M., Situ C., Elliot C. 2005 Development and Validation of an Optical SPR Biosensor Assay for Tylosin Residues in Honey *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7367-7370.
34. Qflex tylosin product info sheet [cit. 2008-06-03]. Available from [www](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11890) [http://www.biacore.com/food/service/lit\\_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11890](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11890)
35. Cacciatore G., Petza M., Rachid S., Hakenbeck R., Bergwerff A.A. 2004 Development of an optical biosensor assay for detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x\*. *Analytica Chimica Acta* 520 (2004) 105–115.
36. McGrath T., Baxter A., Ferguson J., Haughey S., Bjurling P. 2005 Multi sulfonamide screening in porcine muscle using a surface plasmon resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta* 529 (2005) 123–127.
37. Qflex sulfonamides product info sheet [cit. 2008-06-03]. Available from [www](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11889) [http://www.biacore.com/food/service/lit\\_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11889](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11889)
38. Qflex sulfadiazine product info sheet [cit. 2008-06-03]. Available from [www](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11883) [http://www.biacore.com/food/service/lit\\_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11883](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11883)
39. Qflex sulfamethazine product info sheet [cit. 2008-06-03]. Available from [www](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=118892) [http://www.biacore.com/food/service/lit\\_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=118892](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=118892)
40. Flumequine (addendum) (JECFA Food Additives Series 51) [online]. [cit. 2008-06-05]. Available from [www](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v51je03.htm) <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v51je03.htm>
41. Haasnoot W., Gercek H., Cazemier G., Nielen M.W.F.; Biosensor immunoassay for flumequine in broiler serum and muscle. *Analytica Chimica Acta* 586 (2007) 312–318.
42. Traynor I.M., Crooks S. R. H., Bowers J., Elliott C.T Detection of multi-beta-agonist residues in liver matrix by use of a surface plasma resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta* 483 (2003) 187–191.
43. Qflex beta agonist product info sheet [cit. 2008-06-03]. Available from [www](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11886) [http://www.biacore.com/food/service/lit\\_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11886](http://www.biacore.com/food/service/lit_soft/literature/index.html?backurl=%2Ffood%2Fproducts%25&doc=11886)
44. McCarney B., Traynor I.M., Fodey T.L., Crooks S.R.H, Elliott C.T: Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues. *Analytica Chimica Acta* 483 (2003) 165–169.
45. Nedělník J.: Mykotoxiny, jejich výskyt v surovinách, produktech a krmivech rostlinného původu [cit. 2008-18-05]. Available from [www](http://www.phytopsanitary.org/projekty/2002/vvf-05-02.pdf) <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2002/vvf-05-02.pdf>
46. Velíšek J. *Chemie potravin 3*; Tábor, 2002 OSIS.
47. Nařízení č. 1881/2006/ES [cit. 2008-23-05]. Available from [www](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_364/1_36420061220en00050024.pdf) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l\\_364/1\\_36420061220en00050024.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_364/1_36420061220en00050024.pdf)

## Seznam zkratek

---

Ab	protilátka
Ade	akrylamid
Ag	antigen
AP	alkalická fosfatáza
BSA	hovězí sérový albumin
c	koncentrace
DAD	diodové pole-detektor
DHP	2-hydroxy-4,6 dimethylpyrimidin
DIG-AMPI	digoxigeninem značený ampimicin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNC	4,4'-dinitrokarbanilid
DON	deoxynivalenol
E	stojaté vlnění
E	enzym
ELISA	enzymatická imunoanalýza na pevné fázi
ESI/MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FIA	průtoková analýza
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
HACCP	systém kritických kontrolních bodů
HBS	pufr s obsahem (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonové kyseliny)
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidáza
HSA	lidský sérový albumin
IPA	přerušovaná pulzní amperometrie
ISE	iontově selektivní elektroda
JECFA	spojená komise pro hodnocení potravinářských aditiv
LC	kapalinová chromatografie
LED	světlo emitující dioda
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MBA	merkaptobenzoová kyselina
MEI	vícekanálová imunoanalýza s elektrochemickou detekcí
MLR	maximální limit reziduí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
OTA	ochratoxin A
OVA	ovalbumin
P	produkt
PBP	protein vážící penicilin
pNPP	paranitrofenylfosfát
QCM	senzor založený na rezonanci křemenného krystalu

RI	index lomu
RIA	radioimunoanalýza
RSD	relativní směrodatná odchylka
RU	rezonanční jednotka
S	substrát
SAM	samousazovací vrstva
SBP	protein vážící sulfonamidy
SLB	salbutamol
SPE	extrakce na pevné fázi
SPE	natištěná elektroda
SPR	povrchová plazmonová rezonance
TIR	totální vnitřní odraz
TMB	tetramethylbenzidin
UV	UV detektor
2,4D	2,4-dichlorofenoxy octová kyselina

---