

**VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav biochemie a mikrobiologie

**Imunochromatografická detekce vybraných
kontaminantů potravin a životního prostředí**

HABILITAČNÍ PRÁCE

PRO OBOR

BIOCHEMIE

Praha 2017

Ing. Martina BLAŽKOVÁ, Ph.D.

Tato práce shrnuje výsledky mého vědeckého úsilí o vývoj rychlých a praktických detekčních systémů.

Děkuji všem svým kolegům, spolupracovníkům a studentům, kteří mi byli vždy oporou a často velmi podstatně přispěli svými výsledky k řešení našich společných úkolů. Děkuji prof. Pavlovi Rauchovi a prof. Ladislavovi Fukalovi, že mne přijali do svých řad a po celou dobu mé práce mě neúnavně podporovali. Děkuji své rodině a svým blízkým, že při mně stáli.

Praha 2017

Martina Blažková

OBSAH

1	Úvod	1
2	Imunochromatografické analytické metody	2
2.1	Princip metody	2
2.2	Součásti testu	3
2.3	Používání protilátek	6
2.4	Detekční metody	7
2.5	Uspořádání testu	9
2.6	Sestavení testu	15
2.7	Využití metody	18
2.8	Nevýhody imunochromatografických testů	20
3	Přehled řešené problematiky	22
3.1	Detekce patogenních bakterií v potravinách	22
3.2	Detekce pesticidů v potravinách a životním prostředí	28
4	Závěr	31
5	Seznam zkratk	32
6	Reference	33
7	Seznam příloh a přílohy	38

1 Úvod

Vysoké nároky společnosti na bezpečnost potravin a kvalitu životního prostředí, intenzivní kontrola zdravotního stavu populace, veřejné a národní zájmy, to jsou hlavní činitelé stimulující vývoj nových a rychlých technik pro detekci rozmanitých analytů. Jedním typem takových technik jsou imunochemické metody, které se z původní role doplňujícího nástroje biochemického výzkumu během několika minulých desetiletí etablovaly jako jedna z alternativ tradičních metod chemické analytiky. Jejich přednostmi jsou zejména rychlost, jednoduchost a nízká cena. Pro rychlou detekci velkých i malých molekul se nejprve rozšířila imunochemická metoda s imunoreagenciemi značenými enzymy probíhající na pevné fázi (ELISA – z angl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). V posledním období spěje vývoj technických uspořádání imunochemických analýz pro analytickou praxi k vytvoření alternativního semikvantitativního formátu, který by byl jednodušší než klasické uspořádání enzymové imunoanalýzy (ELISA) ve zkumavkách či mikrotitračních destičkách a tím i snadno byl snadno proveditelný, rychlejší, aplikovatelný v místě odběru vzorku (eventuálně by nevyžadoval použití přístroje ani uživatele odborníka specialistu) a umožnil tzv. POC testování („*Point of care*“).

Jako vhodný formát se pro řadu aplikací ukázala imunochromatografická technika využívající podélné migrace reagentů membránou. Používá proužek porézní membrány se zakotvenými imunoreagenciemi v detekční zóně. Analyzovaný vzorek migruje pomocí kapilárních sil podélně membránou a analyt je specificky zachycen v detekční zóně. Detekce je umožněna současnou aplikací reaktantu značeného signální látkou. Z důvodu urychlení detekce se používá především značka, která nevyžaduje k produkci signálu dodatečné reakce např. nanočástice koloidních kovů či barvené koloidní částice plastu. Metoda je velice oblíbená v klinické analýze a při kontrole bezpečnosti potravin a životního prostředí.

Předkládaná práce se věnuje imunochromatografickým testům, jsou popsány jejich jednotlivé součásti, problémy spojené s jejich vývojem a možné aplikace. V závěru textu jsou uvedeny konkrétní ukázky testů vyvinutých v naší laboratoři pro detekci vybraných analytů kontaminantů potravin a životního prostředí.

2 Imunochromatografické analytické metody

Imunochromatografické testy se objevily v 60. letech 20. století, kdy byly používány pro stanovení sérových proteinů. V sedmdesátých letech byl uveden na trh jednoduchý domácí test k detekci choriového gonadotropinu v moči pro prokázání raného těhotenství; jedná se o jeden z nejúspěšnějších testů v historii medicíny. Jeho objev znamenal revoluci v diagnostice těhotenství, ale byl tím odstartován i obrovský rozvoj imunochromatografických testů. V současné době je tento typ testů vyvíjen pro pestrobarevnou škálu různých analytů, např. nádorové markery, mikroorganismy, mykotoxiny, těžké kovy, pesticidy či alergenů. Za úspěchem testů stojí jejich rychlost, jednoduchost, možnost provedení testu kdekoliv, bez nutného vybavení či zkušenosti hodnotitele. Většinou jsou tyto testy určeny ke kvalitativní nebo semikvantitativní detekci.

Imunochromatografické testy jsou označovány celou řadou názvů a zkratk, pro zajímavost např. LFA (z angl. *Lateral Flow Assay*), LFD (*Lateral Flow Device*), LFIA (*Lateral Flow Immunoassay*), ICT (*Immunochromatographic test*), LFICS (*Lateral Flow Immunochromatographic Strip*), strip test (*Strip Test*).

Podstatou imunochromatografie je kombinace chromatografie, kdy se složky vzorku separují podle rozdílu v pohyblivosti stacionární fázi, a specifické imunochemické detekce. Termínem imunochromatografie je často také označována separačně izolační metoda, při které se separují a koncentrují vzorky (imunoafinitní chromatografie). Nicméně tato práce je věnována imunochromatografickým testům určeným k detekci látek.

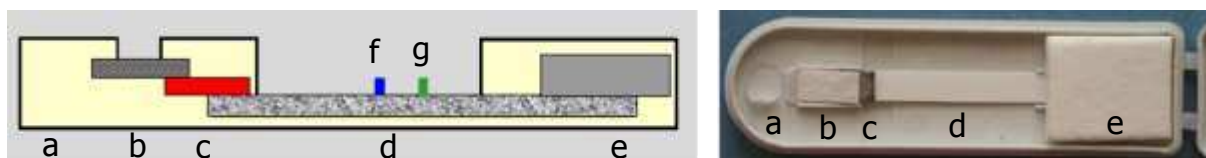
2.1 Princip metody

Podstatou detekce u imunochromatografických testů je specifická nekovalentní interakce protilátky s antigenem, přičemž celý test probíhá na membráně.

Jednotlivé imunoreagencie jsou imobilizovány v testovacích zónách na membráně a/nebo ve speciální podložce na začátku testu, kde je uložena i detekční molekula. Vzorek je po smíchání s reakčním pufrům aplikován na membránu, putuje membránou a dostává se do kontaktu s jednotlivými imunoreaktivními partnery. V průběhu toku spolu látky interagují a v testovací zóně jsou zachycovány. Vzniklé imunokomplexy jsou vizualizovány prostřednictvím značených imunoreagencií, např. protilátkami značenými částicemi zlata. Součástí celého testu je kontrolní zóna, která ověřuje správné provedení testu a jeho funkčnost.

2.2 Součásti testu

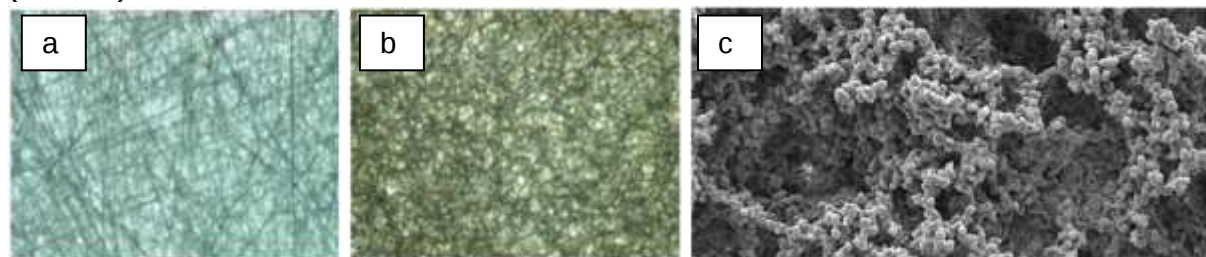
Standardní imunochromatografický test obsahuje čtyři základní části, které jsou uloženy v plastové krabici (Obr. 1).



Obr. 1: Schematické znázornění jednotlivých součástí testu (vlevo), fotografie testu (vpravo): a) plastová krabice, b) podložka pro vzorek, c) podložka pro konjugát, d) membrána, e) absorpční podložka, f) testovací zóna, g) kontrolní zóna

Na začátku testu je umístěna podložka pro vzorek (Obr. 1b), která slouží k aplikaci celého objemu vzorku a jeho následnému homogennímu a plynulému přenosu do systému. Je vyráběna z celulózy nebo skleněných vláken (Obr. 2, Tab. 1), neboť tyto materiály mají minimální afinitu vůči proteinům (Technical note - Bangs Laboratories, 2013). Dalšími důležitými vlastnostmi podložky pro vzorek (i ostatních podložek, viz dále) je tloušťka a objem lože*, které ovlivní, kolik vzorku může být použito či jaké množství imunoreagencií může být aplikováno na podložku. Speciální materiály pro výrobu podložek jsou vyvíjeny s cílem co nejlépe eliminovat vliv původní matrice vzorku, např. druh analyzované potraviny, krev či moč. Různá velikost pórů v podélném průřezu podložkou umožňuje především odstranění případného znečištění (např. pevných částic) (Technical note - GE Healthcare Life Sciences, 2017). Podložky mohou být chemicky upraveny proteiny, solemi nebo detergenty pro omezení variability vzorku a vlivu interferujících složek, dále látkami ovlivňujícími viskozitu a pH vzorku (Technical note - Millipore, 2013).

Na podložku pro konjugát (Obr. 1c) se umísťuje detekční molekula s navázanou značkou. Podložka se vyrábí převážně ze skleněných vláken, ale používá se i celulóza nebo polyester (Obr. 2, Tab. 1). Použitý materiál musí zajistit stabilitu detekční molekuly a umožnit její rychlé, rovnoměrné a kvantitativní uvolnění z podložky na testovací membránu (Obr. 1d).



Obr. 2: Ukázky materiálů pro podložky a membrány (Millipore): a) skleněná vlákna, b) celulóza a c) nitrocelulóзовá membrána (převzato z www.merckmillipore.com/diagnostics, III/2017)

*Objem lože je definován jako množství vzduchu v pórech podložky vztahený na jednotku její plochy (např. $\mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Tab. 1: Přehled materiálů pro podložky imunochromatografických testů od výrobců Millipore (nahore) a GE Healthcare Life Sciences (dole)

označení	plošná hustota [g·m ⁻²]	tloušťka [mm]	tok [mL·min ⁻¹]	materiál	typ podložky
G027	50	0,27		skleněná vlákna	pro konjugát
GFDX	75	0,41		skleněná vlákna	pro konjugát
C048	179	0,48	360	celulóza	pro vzorek/ absorpční
C068	186	0,68	260	celulóza	pro vzorek/ absorpční
C083	291	0,83	196	celulóza	pro vzorek/ absorpční
C248	702	2,48	220	celulóza	pro vzorek/ absorpční

označení	absorpce vody [mg·cm ⁻²]	tloušťka [mm]	doba kapilárního toku [s·(4 cm) ⁻¹]	materiál	typ podložky
CF1	18,7	0,176	207,3	bavlna	pro vzorek
CF3	34,6	0,322	174,3	bavlna	pro vzorek
CF4	49,9	0,482	67,3	bavlna	pro vzorek/ absorpční
CF5	99,2	0,954	63,3	bavlna	absorpční
CF6	136,3	1,45	65	bavlna	absorpční
CF7	252,3	1,873	35	bavlna	absorpční
Fusion 5	40	0,370	38	není k dispozici	kompletní test
St 14	50,9	0,355	23,1	skleněná vlákna	pro konjugát
St 17	44,9	0,370	34,5	skleněná vlákna	pro konjugát

Kritickou součástí určující kvalitu testu je použitá membrána, která tvoří reakční zónu celého systému (Obr. 1d). V první řadě musí umožnit dobrou vazbu jednotlivých imunoreagencií na testovací a kontrolní zóny při přípravě samotného testu (Obr. 1f, Obr. 1g). Kromě toho membrána ovlivňuje rychlost průtoku reakční směsi testem a tedy dobu interakce detekčního činidla a analytu, dále pak vazbu vzniklého imunokomplexu nebo volných imunoreagencií na testovací či kontrolní zónu (Mansfield a kol., 2005, Technical note - Millipore, 2013). Konstruktor testu musí brát v úvahu *velikost pórů* dané membrány a *rychlost průtoku kapaliny membránovými kapilárami* v cm·s⁻¹, deklarované výrobcem (Henderson a kol., 2002). Rychlost průtoku kapaliny je výrobcem membrán častěji nahrazována nepřímo úměrným parametrem *doba kapilárního toku* (capillary flow time), který je udáván v s·(4 cm)⁻¹ (Mansfield a kol., 2005). Tloušťka membrány (100 - 150 μm) má vliv na množství molekul, které se vážou v detekčních zónách a tedy na množství molekul podílejících se na interakci. Dále ovlivňuje vizuální kvalitu výsledku - šířku a ostrost detekčních linií.

V současné době je na trhu dostupná celá škála různých membrán (Tab. 2). Převažují membrány vyráběné z nitrocelulózy (Obr. 2) (Bahadir a kol., 2016). Podle některých autorů (Postuma-Trumpie a kol., 2009, Mansfield a kol., 2005) jsou využívány i jiné polymerní

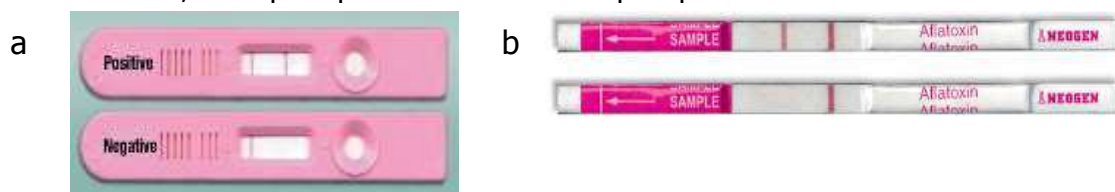
Tab. 2: Příklady membrán pro imunochromatografické testy

Označení	Doba kapilárního toku [s×4cm ⁻¹]	Tloušťka [μm]	Materiál	Výrobce
HF180	180 ± 45	135/185/235	nitrocelulóza	Millipore
HF135	135 ± 34	185/236	nitrocelulóza	Millipore
HF120	120 ± 30	185/237	nitrocelulóza	Millipore
HF090	90 ± 23	185/238	nitrocelulóza	Millipore
HF075	75 ± 19	185/239	nitrocelulóza	Millipore
AE99	120 - 160	-	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
AE100	90 - 120	120	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
FF120HP	90-150	100	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
FF170HP	140-200	100	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
FF80HP	60-100	100	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
Immunopore FP	190-280	100	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
Immunopore SP	90-150	100	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
Immunopore RP	140-200	100	nitrocelulóza	GE Healthcare Life Sciences
UniSart® CN140	110-165	125-155	nitrocelulóza	Sartorius AG
UniSart® CN95	90-135	140-170	nitrocelulóza	Sartorius AG

materiály, např. nylon, polyethylen, polyethersulfon, nicméně konkrétní aplikace nebyly publikovány.

Proudění vzorku membránou je usnadňováno absorpční podložkou (Obr. 1e), která zároveň zabraňuje zpětnému toku, který by mohl negativně ovlivnit výsledek či kvalitu jeho odečtení (znečištění testu přebytečnými barevnými částicemi, rozmazání testovacích linií). Její hlavní úlohou je pojmout veškerou kapalinu vzorku. Spolu s podložkou pro vzorek je absorpční podložka limitujícím faktorem pro použitý objem vzorku. Zpravidla bývá vyrobena z celulózy (Obr. 2, Tab. 1).

Všechny součásti testu jsou pospojovány lepicí plastovou folií a většinou uloženy v plastové krabičce (Obr. 1a). Kryt krabičky pomáhá uživateli orientovat se v testu – je na něm vyznačeno, kam aplikovat vzorek, kde odečíst výsledek a kontrolu. Dále zabraňuje kontaminaci testu a jeho případnému poškození. Hovoříme o tzv. *uzavřeném formátu* testu (Obr. 3). Pro některé analyty však byly publikovány i tzv. *otevřené formáty*, které obsahují pouze membránu, zónu pro aplikaci vzorku a absorpční podložku.



Obr. 3: Ukázka imunochromatografických testů v a) uzavřeném a b) otevřeném formátu (převzato z <http://foodsafety.neogen.com/en/reveal#allergens>, II/2017)

2.3 Používání protilátek

Vhodně zvolené součásti a správné sestavení testu jsou důležité pro kvalitu testu a jsou hlavním předmětem optimalizace testu, specifita i citlivost testu je však primárně ovlivněna použitými protilátkami.

Protilátky jsou glykoproteiny produkované bílými krvinkami obratlovců jako součást komplexní reakce proti invazivnímu činiteli, tzv. antigenu. Protilátka specificky rozpoznává konkrétní místo na antigenu, tzv. epitop, se kterým interaguje prostřednictvím dvou vazebných míst, tzv. paratopů. Antigen, který je v organismu schopen vyprovokovat produkci protilátek je nazýván imunogen. Existují však antigeny s nízkou molekulovou hmotností a/nebo s jediným epitopem, které sice jsou schopny s protilátkami interagovat, nicméně nevyvolávají jejich produkci. Molekuly s takovými vlastnostmi se nazývají hapteny (Stejskal a kol., 2011).

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 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 izolovaná z imunizovaných zvířat může při použití způsobovat navýšení nálezu vazbou necílových analytů. Nízká specifita ale může být i výhodou, jestliže sledujeme celou skupinu podobných analytů a nevyžadujeme kvantifikaci jednotlivých individuí. Naopak monoklonální protilátky se připravují proti jedinému epitopu na kultuře hybridomů bílých krvinek a rakovinných buněk. Získají se vysoce specifické protilátky. Protilátka proti haptenu se připravuje prostřednictvím konjugátu haptenu s bílkovinným nosičem. Hapten na povrchu bílkovinného nosiče tvoří samostatný epitop indukující tvorbu protilátky. Takto vzniklé protilátky mají potom schopnost vázat hapteny i bez bílkovinného nosiče.

V praxi se používají oba typy, nicméně preferovány jsou protilátky monoklonální kvůli své specifitě a konstantní kvalitě.

Protilátky je možné připravit proti široké škále různých struktur, nicméně při rozhodování o vývoji testu je nutné pečlivě posoudit vlastnosti protilátek. V první řadě je nutné zvážit afinitu* protilátky a tomu odpovídající koncentrační rozsah stanovovaného

* Afinita vyjadřuje energii vazby mezi jedním vazebným místem na protilátce a příslušným epitopem na antigenu.

analytu* (Sajid a kol., 2015), a dále křížovou reaktivitu protilátky se strukturními analogy analytu. Na rozdíl od většiny ostatních imunochemických metod se v případě imunochromatografických testů nejedná o rovnovážný systém (typický např. pro enzymové imunoanalýzy na mikrotitračních destičkách); k interakci antigen – protilátka musí dojít během toku vzorku membránou a tedy velice rychle[†] (Mansfield a kol., 2005), což zvyšuje nároky na kvalitu protilátek. Kvalita protilátky navíc může být ovlivněna imobilizací na membránu či na značku. Byly publikovány případy směřované imobilizace protilátky prostřednictvím Fc fragmentu, zajišťující dostupnost obou paratopů pro imunochemickou interakci (Presnova a kol., 2016).

Protilátky mají v rámci imunochromatografických testů několik funkcí. Protilátky označované jako **primární** jsou používány pro specifické rozpoznání analytu; mohou být konjugovány s detekční částicí a zprostředkovávají tak vizualizaci testu. Protilátky **sekundární** jsou imobilizovány na membráně a slouží ke kontrole funkčnosti testu. V případě komplikovanějších formátů mají sekundární protilátky navázanou značku a tvoří tedy detekční molekulu a **terciární** protilátky slouží ke kontrole funkčnosti testu. Zapojení sekundární protilátky s navázanou značkou do analýzy je v názvu metody indikováno jako „nepřímé uspořádání“. V tomto typu uspořádání je tedy místo primární protilátky značena protilátka sekundární. Díky tomu není spotřebovávána cenná specifická protilátka a navíc je možné připravovaný test daleko lépe optimalizovat – vybrat koncentraci specifické protilátky tak, aby byla metoda co nejcitlivější a nedocházelo k tomu na úkor získaného signálu (týká se kompetitivního uspořádání metody, viz dále).

2.4 Detekční metody

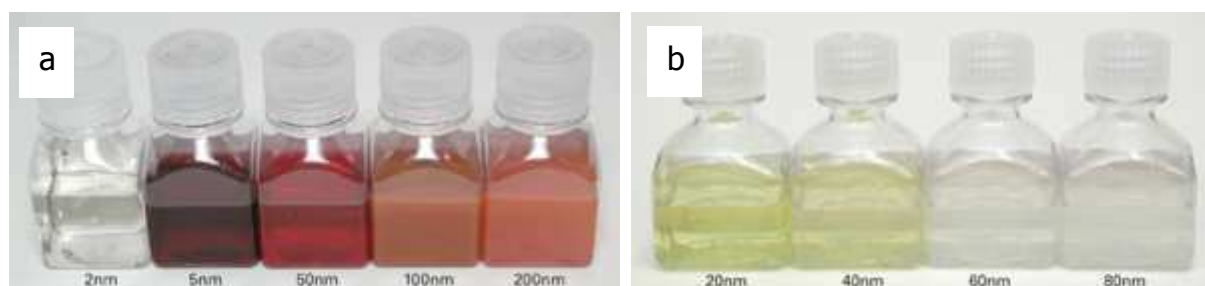
Dalším klíčovým krokem imunochromatografických metod je detekce výsledku testu. K tomuto účelu je využívána celá řada různých typů značek, např. barevné nanočástice, luminiscenční nanočástice (Beloglazova a kol., 2014), magnetické částice (Wang a kol., 2013), enzymy (Samsonova a kol., 2015) a liposomy (Akbarzadeh a kol., 2013). Každá metoda má svoje specifika a i značka musí být přizpůsobena konkrétní analytické metodě. Univerzálně ideální značka tedy neexistuje, nicméně každá značka by měla splňovat následující požadavky. V první řadě by měla být detekovatelná ve velmi nízkých

* Vazebná konstanta protilátek se svými antigeny se pohybuje v rozsahu $10^7 - 10^{10}$, detekovatelné koncentrace látek jsou v řádech $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, v některých případech umožňují protilátky stanovit koncentrace $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

[†] Pokud bereme v úvahu šířku testovací linky 0,5 – 1,0 mm a rychlost toku vzorku $0,16 - 0,66 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ (v závislosti na typu membrány), stráví antigen v testovací zóně 1-6 s. (Technical Note – Millipore, 2013).

koncentracích. Měla by být snadno konjugovatelná s detekční molekulou a poskytovat pokaždé stejně kvalitní konjugát. Neměla by během konjugace měnit své vlastnosti, ani vlastnosti detekční molekuly a vzniklý konjugát by měl být dlouhodobě stabilní. Značka by neměla nespecificky interagovat s jinými látkami než s analytem ani s membránou. Významným bonusem značky je snadná dostupnost a nízká cena. Některé ze značek poskytují odezvu okamžitě (např. barevné částice), zatímco u jiných je k produkci signálu nutný další krok (např. u enzymů). U celé řady testů je výsledek odečítán přímo – vizuálně, v jiných případech je nutné detekční zařízení. Vzhledem k charakteru testů – jejich jednoduchosti a snadné aplikovatelnosti – jsou preferovány značky s okamžitou vizuální detekcí.

Největší pozornost přitahují nanočástice, zejména zlaté (Bahadir a kol., 2016, Obr. 4a), stříbrné (Yen a kol., 2015, Obr. 4b) a uhlíkové (Blažková a kol., 2009), ale používají se i částice křemíku (Huang a kol., 2013), selenu (Wang a kol., 2014), platiny a latex (Bahadir a kol., 2016).



Obr. 4: Ukázka rozdílných optických vlastností nanočástic a) zlata a b) stříbra v závislosti na jejich velikosti (převzato z https://www.tedpella.com/gold_html/goldsols.htm, III/2017)

Nejčastěji používanou značkou u imunochromatografických testů jsou zlaté nanočástice. Jedná se o sférické částice zlata s vysokou afinitou vůči biomolekulám. Na biomolekuly se váží prostřednictvím nekovalentních interakcí, aniž by byla ovlivněna funkce biomolekuly (proteinů potažmo protilátek). K dalším výhodám zlatých částic patří zejména snadná příprava samotných částic a funkčních konjugátů, stabilita částic i připravených konjugátů, barevná škála od červené až po modrou* (Goudarzi a kol., 2015, Obr. 4).

Velmi podobné vlastnosti mají i částice připravené z uhlíku (Posthuma-Trumpie a kol., 2012). Vizuální vlastnosti má uhlík lepší než zlato, vysoký kontrast černých částic na bílé membráně zajišťuje výborné detekční limity (Amerongen a kol., 1993). I cena je příznivější. Nevýhodou může být nižší stabilita uhlíkaté suspenze a bývá tedy nutno přidat stabilizační činidlo. Dále se v suspenzi mohou vyskytovat částice s různou velikostí i nepravidelných tvarů, a proto je při práci s uhlíkem, nutné volit membránu s většími póry. Nicméně rozsah

* Optické vlastnosti jsou závislé na velikosti částice.

velikostí částic může sloužit jako prevence tzv. *hook efektu*^{*}, který výrazně zkresluje výsledky, zejména pak jejich přesnost. Na rozdíl od zlata má uhlík stálou barvu. Přes nesporné výhody není uhlík dosud intenzivně komerčně využíván.

2.5 Uspořádání testu

Pro imunochemické metody je typická variabilita možných formátů, přičemž ani imunochromatografické metody nejsou výjimkou. Rozdíly mohou být ve formátu testů, způsobu značení a množství použitých imunoreagencií.

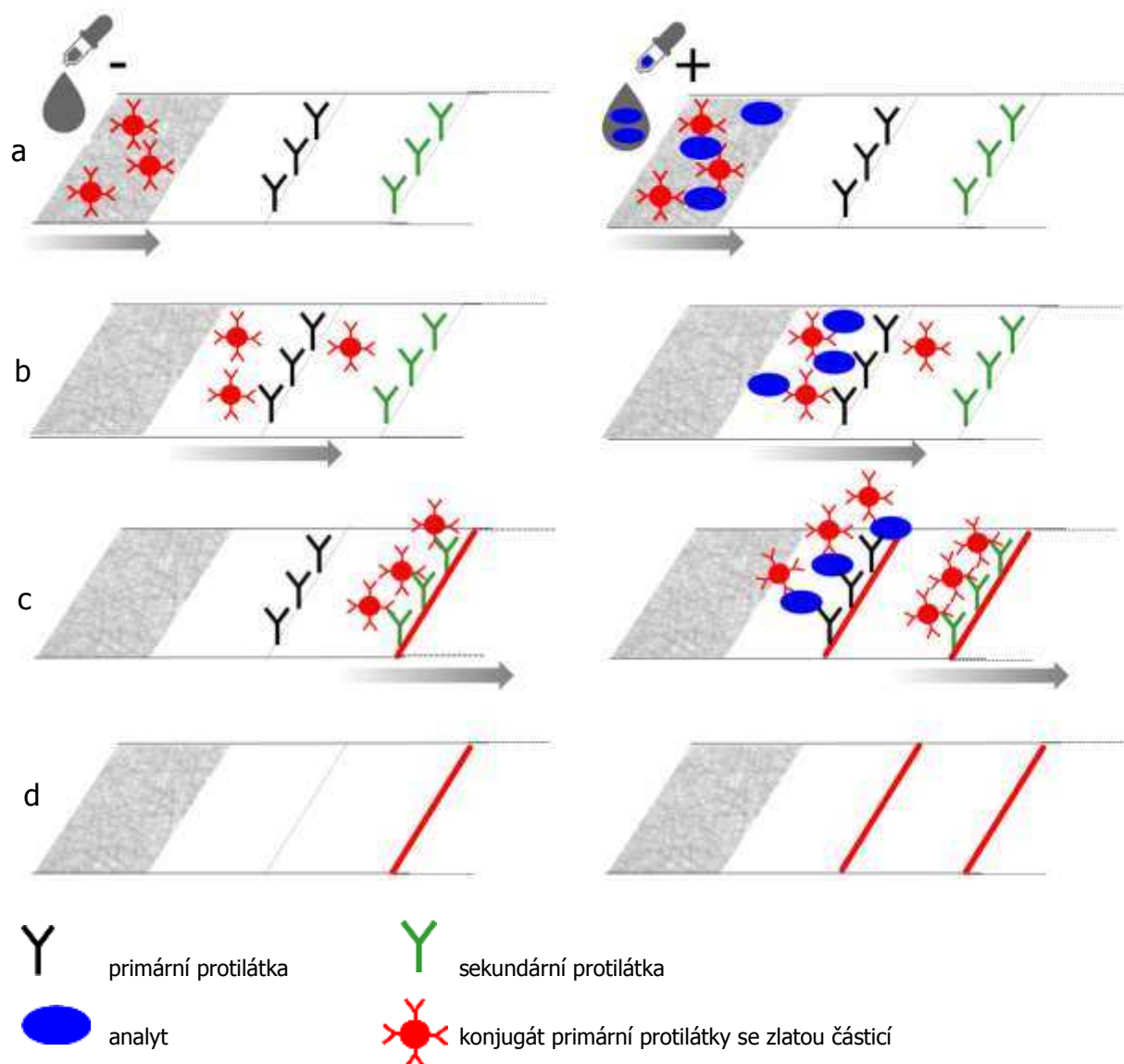
Použitý formát detekce se volí podle typu analytu. Nízkomolekulární látky, které mají jedno vazebné místo (jeden epitop) pro protilátku, se mohou detegovat pouze v tzv. kompetitivním formátu (Blažková a kol., 2010, Guillén a kol., 2011). Vysokomolekulární látky, které mají více než jeden epitop, se detegují v tzv. sendvičovém formátu (Javůrková a kol., 2012). Pro nukleové kyseliny se používá test nazývaný NALFIA (z angl. *Nucleic Acid Lateral Flow ImmunoAssay*) (Blažková a kol., 2011, Seidel a kol., 2016).

2.5.1 Sendvičový formát

Pro analýzu molekul, které obsahují minimálně dva epitopy pro vazbu protilátky, je používán sendvičový formát. První primární protilátka je imobilizována na membráně v testovací zóně, druhá primární protilátka je značená a je nakápnuta na podložku pro konjugát (Obr. 5a). Přidaný vzorek rozpustí a vymyje značenou primární protilátku z podložky. Společně putují membránou a interagují (Obr. 5b). Při přechodu přes testovací zónu je vzniklý imunokomplex zachycen a objevuje se zde linie. Přebytečné imunoreagencie postupují dále membránou a značené primární protilátky jsou využity ke kontrole funkčnosti testu, když jsou v kontrolní zóně zachyceny imobilizovanou sekundární protilátkou (druhově specifická protilátka proti primární značené protilátce, Obr. 5c). Čím více je analytu ve vzorku, tím silnější je odezva (Obr. 5d).

U tohoto typu testu jsou voleny koncentrace imunoreagencií v mírném nadbytku, čímž se zlepšuje detekční limit. Zvýšená koncentrace imunoreagencií však musí být volena opatrně kvůli již zmíněnému *hook efektu*.

^{*} Jedná se o nelineární průběh závislosti signálu na koncentraci analytu ve vysokých koncentracích použitých imunoreagencií.



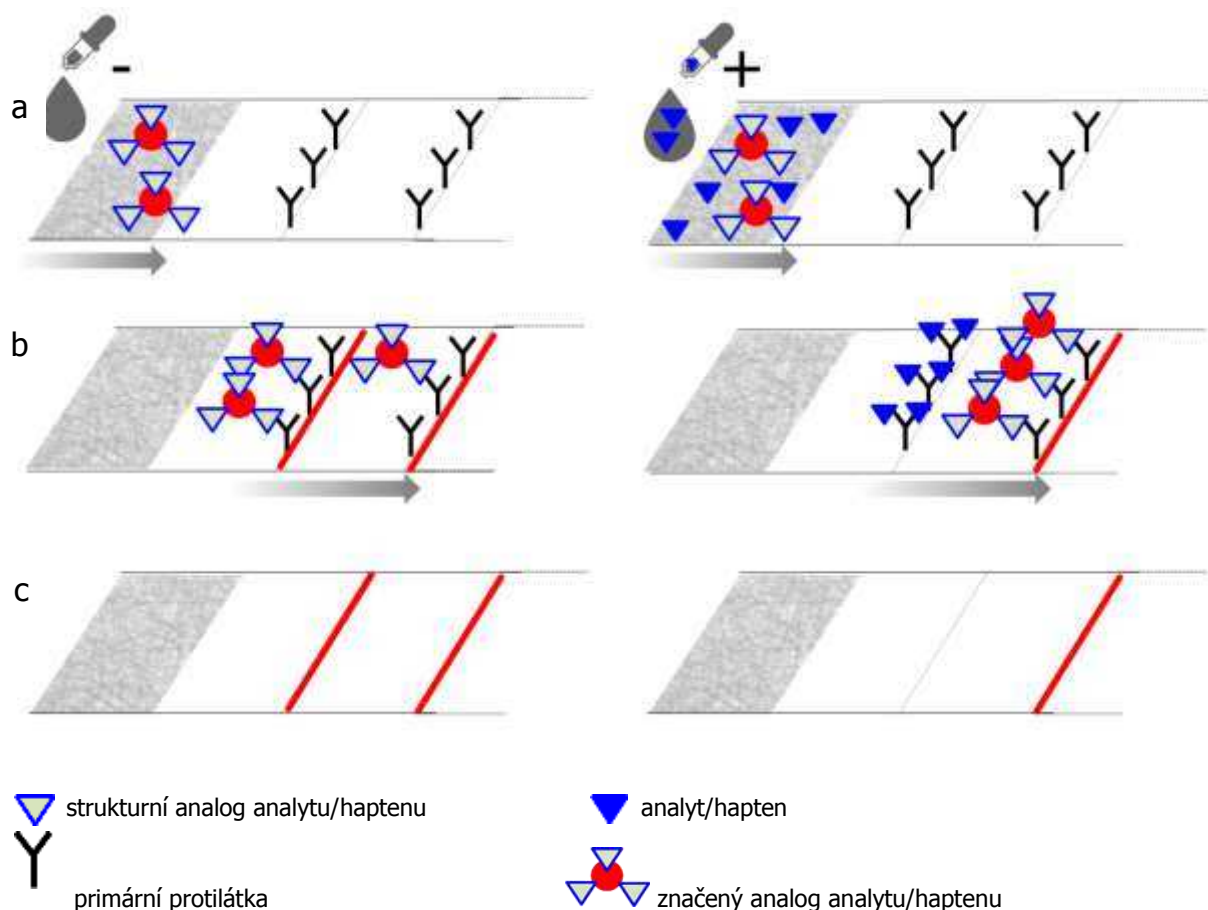
Obr. 5: Schéma sendvičového uspořádání chromatografického testu: a) připravená membrána a nanesení vzorku, b) tok vzorku reakční zónou, c) přechod reakční směsi přes testovací a kontrolní linii, d) vizuální podoba výsledku testu, negativní vzorek (vlevo), pozitivní vzorek (vpravo)

2.5.2 Kompetitivní formát

Kompetitivní formát se využívá zejména pro analýzu haptenu, které se nemohou současně vázat ke dvěma protilámkám, a proto není možné detekovat je prostřednictvím sendvičového formátu. Pro sestavení imunochemické metody určené k detekci haptenu se využívá konjugátů haptenu s bílkovinným nosičem (viz oddíl 2.3). Dále jsou konjugáty používány přímo při sestavování testů, neboť fungují jako soutěžící partneři pro analyzovaný haptenu a je možné je navíc snadno imobilizovat na membránu. Používány jsou dva hlavní typy kompetitivního formátu.

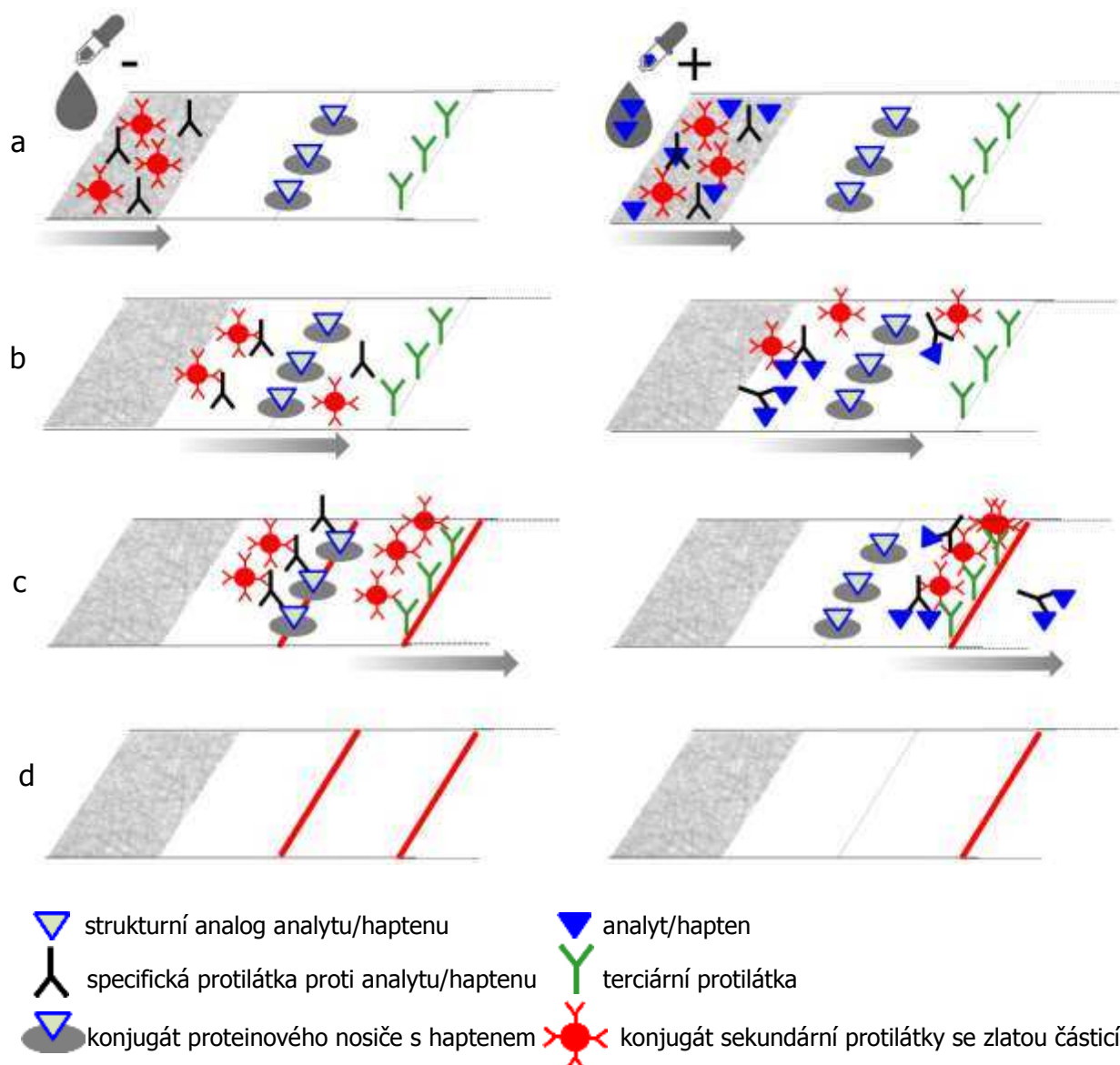
V prvním případě (Obr. 6) je primární protilátka nanášena na testovací linii a sekundární protilátka na kontrolní linii. Vzorek obsahující analyt je aplikován na podložku

pro vzorek, značený analyt na podložku pro konjugát (Obr. 6a). Po průchodu vzorku podložkou pro konjugát spolu oba typy analytů migrují membránou a při toku přes testovací linii soutěží o vazebné místo na imobilizované protilátce, přebytečný analyt je zachycen v kontrolní zóně (Obr. 6b). (Kato a kol., 2016).



Obr. 6: Schéma kompetitivního uspořádání chromatografického testu: a) připravená membrána a nanesení vzorku, b) přechod reakční směsi přes testovací a kontrolní linii, c) vizuální podoba výsledku testu, negativní vzorek (vlevo), pozitivní vzorek (vpravo)

Ve druhém případě (Obr. 7) je na testovací zónu nanesen konjugát hapten-bílkovinný nosič a terciární protilátka na kontrolní zónu. Na podložku pro konjugát je nanesena primární protilátka a značená sekundární protilátka (detekční molekula) (Obr. 7a). Analyt je aplikován na podložku pro vzorek a podélnou migrací se dostává do kontaktu s imunoreagenciemi z podložky pro konjugát. Během toku reakční směsi membránou dochází k interakci analytu s primární protilátkou a označení primární protilátky prostřednictvím sekundární protilátky značené zlatými částicemi (Obr. 7b). Primární protilátky, které nevytvořily imunokomplex s analytem, jsou při průchodu testovací zónou zachyceny vhodným kompetitorem (hapten-bílkovinný nosič), sekundární protilátky značené zlatem jsou zachyceny v kontrolní zóně a ostatní (neiteragující či přebytečné) molekuly přetečou na konec membrány (Obr. 7c).

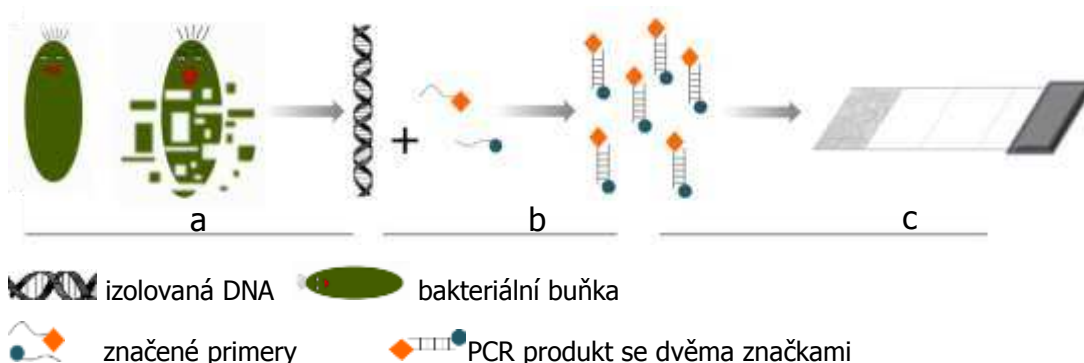


Obr. 7: Schéma nepřímého kompetitivního uspořádání chromatografického testu: a) připravená membrána a nanesení vzorku, b) tok vzorku reakční zónou, c) přechod reakční směsi přes testovací a kontrolní linii, d) vizuální podoba výsledku testu, negativní vzorek (vlevo), pozitivní vzorek (vpravo)

V obou zmíněných případech kompetitivního uspořádání je intenzita odezvy testovací zóny nepřímo úměrná koncentraci analytu (Obr. 6c, Obr. 7d). Volí se co nejnížší koncentrace jednotlivých imunoreagencií za účelem zlepšení detekčního limitu. Nízká koncentrace imunoreagencií však nesmí být na úkor signálu.

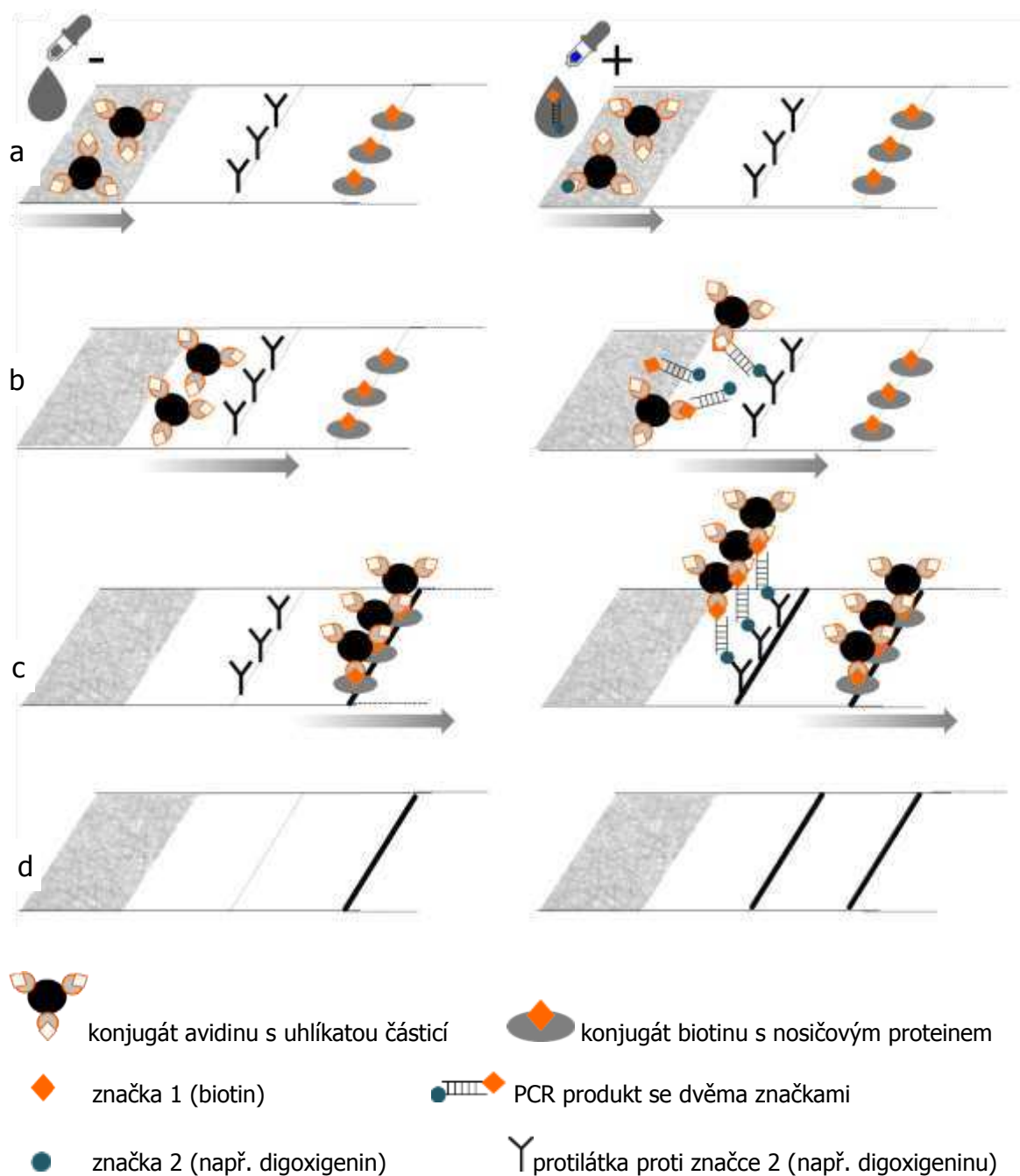
2.5.3 NALFIA – imunochromatografická detekce nukleových kyselin

NALFIA je imunochromatografický test, který se používá k detekci nukleových kyselin. Využívá se například pro stanovení bakteriální kontaminace. Nejprve je nutné izolovat DNA (Obr. 8a) ze vzorku a amplifikovat vybranou část DNA pomocí PCR (Obr. 8b). Během tohoto procesu se zároveň naváží dvě značky na každý ampikon prostřednictvím značených primerů. Nejčastěji se používají digoxigenin nebo fluorescein, nicméně pokaždé je jednou ze značek biotin, který se využívá pro biospecifickou interakci s avidinem. Takto připravená DNA obsahující dvě značky je aplikována na imunochromatografický test (Obr. 8c).



Obr. 8: Příprava vzorku pro imunochromatografický test nukleových kyselin: a) izolace DNA, b) amplifikace cílového úseku DNA a jeho označení, c) aplikace PCR produktu na test

Připravený imunochromatografický test obsahuje v podložce pro konjugát avidin s navázanou částicí (Obr. 9a). Na testovací zóně je imobilizovaná protilátka proti značce 2 použité u PCR produktu (Obr. 9a), kontrolní zóna obsahuje imobilizovanou značku 1. Po aplikaci značeného PCR produktu na membránu dojde ke vzniku komplexu značeného PCR produktu a avidinu vázaného na částice (Obr. 9b). Komplex je zadržen v testovací zóně, přebytek detekčních molekul je zachycen v kontrolní zóně (Obr. 9c). Jedná se o variantu sendvičového uspořádání a pozitivní vzorek se projeví vznikem dvou linií (Obr. 9d) (viz např. Blažková a kol., 2009, Blažková a kol., 2011, Seidel a kol., 2016).

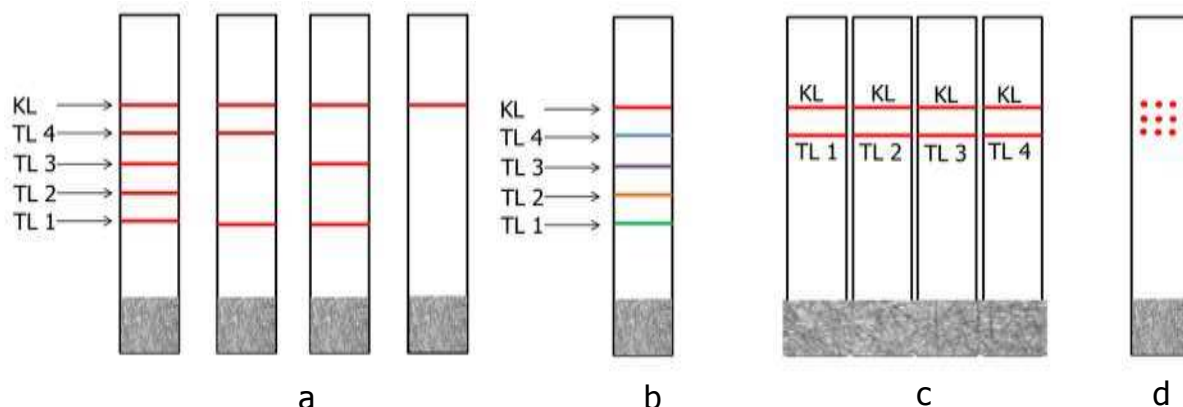


Obr. 9: Schéma chromatografického testu pro detekci nukleových kyselin: a) připravená membrána a nanesení vzorku, b) tok vzorku reakční zónou, c) přechod reakční směsi přes testovací a kontrolní linii, d) vizuální podoba výsledku testu, negativní vzorek (vlevo), pozitivní vzorek (vpravo).

2.5.4 Multianalytová detekce (multiplex)

Někdy je výhodné analyzovat několik analytů současně. Za tímto účelem jsou sestavovány tzv. detekční multiplexy (Sajid a kol., 2015, Yen a kol., 2015). Jeden testovací proužek obsahuje tolik testovacích linií, kolik analytů je detekováno (Obr. 10a). Důležitým předpokladem pro úspěšnost testu je vysoká specifita protilátek. Testy se zpravidla používají pro detekci 2-3 analytů (Blažková a kol., 2009, Ediage a kol., 2012), ale objevily se i soupravy s 5 testovacími liniemi (detekce toxinů, Lattanzio a kol., 2012). Zajímavým trikem

je využití různě barevných značek (např. u ROTA-ADENO Virus Combo Test Device, Obr. 10b). Na jednom proužku je testováno také několik analytů, ale pro každý je použita jiná značka, což pomáhá přehlednosti výsledku analýzy. Imunochromatografický test je prostorově limitován, a proto je velice obtížné sestavit úspěšný test s více než pěti liniemi na jednom proužku membrány. Alternativním řešením je použití spojených proužků (Obr. 10c) nebo bodové uspořádání testovacích zón (Obr. 10d, Dzantiev a kol., 2014).



Obr. 10: Schematické znázornění imunochromatografického testu v multiplexu. Různé typy provedení pro testování 4 analytů: a) 4 testovací linky na jedné membráně, b) 4 testovací linky na jedné membráně, pro každý analyt použita jiná značka, c) každý analyt je testován na jiné membráně, ale aplikuje se jeden vzorek, d) multiplex, TL – testovací linie, KL – kontrolní linie..

2.5.5 Microarray

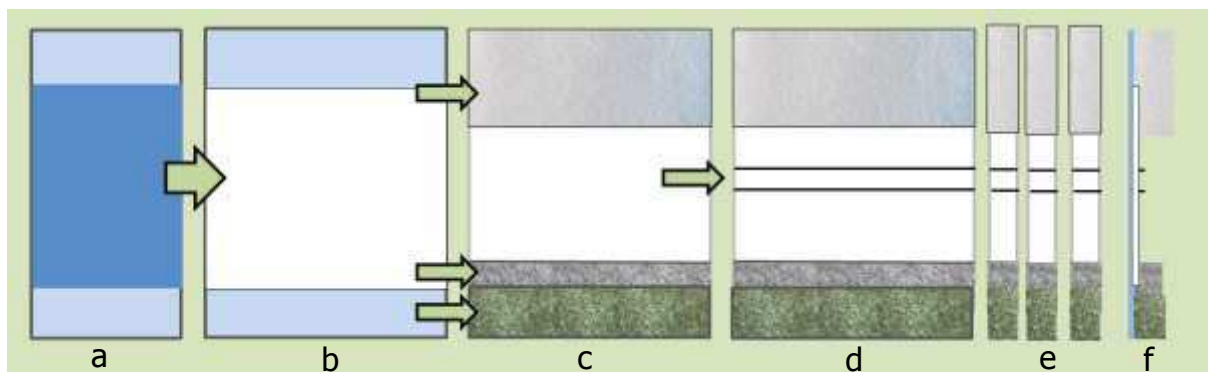
Microarray je vývojovým stupněm multiplexů. Podstatou testu je proužek s bodově uspořádanými testovacími zónami (Li a Macdonald, 2016, Obr. 10d). Imunoreagencie určené k imobilizaci jsou na membránu naneseny pomocí dávkovací hlavice s jehličkami a testovací zóny jsou uspořádány v bodech místo v liniích.

Formát se osvědčil například pro detekci nukleových kyselin (Amerongen a kol., 2012), alergenů (Chinnasamy a kol., 2013) a antibiotik (Wang a kol., 2017). Do budoucna má tento formát velký potenciál.

2.6 Sestavení testu

Při vývoji kvalitního imunochromatografického testu je nezbytné disponovat dobrými imunoreagenciemi (protilátkami, strukturně podobnými analogy antigenu, konjugáty haptenu s bílkovinným nosičem) pro detekci cílového analytu. Zásadní pro úspěšnost připravovaného testu je také volba vhodného formátu. Konstruktor testu musí dále vybrat vhodné součásti testu – podložky a membrány. Následuje série testů, při kterých jsou hodnoceny jednotlivé součásti testu, jsou voleny vhodné koncentrace a kombinace jednotlivých imunoreagencií, složení reakčních a skladovacích pufrů, je vybírán vhodný nástřik na membránu a také

vzdálenost testovací linie od začátku membrány. Všechny parametry jsou posuzovány ve vzájemných souvislostech a optimalizovány.



Obr. 11: Sestavení imunochromatografického testu: a) adhezivní podložka, b) nalepení membrány na adhezivní podložku, c) umístění podložek na membránu a adhezivní podložku, d) aplikace imunoreagencií na membránu, e) nařezané proužky - testy (pohled shora), f) nařezaný proužek (pohled z boku)

Při sestavování testu je potřeba vybrané komponenty testu vhodně uspořádat a přiložit na sebe (Obr. 11). Jednotlivé podložky a membrána se vzájemně musí překrývat (Obr. 11c), aby mohla reakční směs plynule protékat celým testem. Vše je spojeno silně adhezivní plastovou fólií (vyráběnou převážně z polystyrenu, Obr. 11a); tyto fólie zároveň slouží jako ochrana velmi křehkých testovacích membrán (Obr. 11b). Podložky pro vzorek a konjugát se namáčí v příslušném pufru s následným sušením.

Tab. 3: Přehled dávkovacích přístrojů pro výrobu imunochromatografických testů

	1	2	3 ^b	4
šířka linky	není určeno	0,1-0,5 mm	0,25-0,5 mm	není určeno
kvantifikovatelnost ^a	ne	ano	ano	ano
kontakt s membránou	ano	ne	ne	ne
dávkování	špička proud	ink jet ^c kapka	stříkačka aerosol	stříkačka aerosol
pohon	krokový motor	solenoid	hydraulická pumpa	stlačený plyn
výrobci	Front Line (BioDot) Zeta (Zeta Corporation)	BioJet Quanti (BioDot)	AirJet Qianti (BioDot) Twain Harte (Kinematics Automation)	Linomat (Camag)

^a kvantifikovatelnost objemu na délku linky

^b tento typ dávkovače je možné použít i na přípravu podložek

^c funguje na principu inkoustové tiskárny

Pro kvalitní a přitom kvantitativní přídavek imunoreagencií na membránu (Obr. 11d) bylo nutné vyvinout velmi přesné přístroje s výbornou opakovatelností. Nejčastěji používané typy (viz Tab. 3) pro nanášení na membránu jsou pneumaticky poháněné fixírky/stříkačky (1), pneumaticky ovládané solenoidy (2) a objemová čerpadla s kontaktními nebo téměř kontaktními hroty/stříkačkami (3). Jejich vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 3, v současnosti jsou nejvíce využívány objemové systémy přivádějící tekutiny přes trysku – stříkačku. K aplikaci se dají využít i dávkovače používané například pro přípravu tenkovrstvé chromatografie (4).

K maximální adsorpci protilátek a ostatních proteinů na nitrocelulózovou membránu by měly být použity pufry s nízkou iontovou silou, povrchově aktivních látek a sacharidů. Naopak na podložku pro konjugát a pro vzorek se aplikují pufry různého složení, které zajišťují kvantitativní vyplavení imunoreagencií, snižují viskozitu vzorku a usnadňují interakci mezi antigenem a protilátkou.

Připravené membrány spolu s podložkami jsou následně nasekány (Obr. 11e) na jednotlivé proužky a umístěny do plastové krabičky, přičemž se nesmí porušit okraje membrány. Při vývoji testů mohou být použity ostré nůžky, nicméně pro komerční produkci testovacích proužků je nutné použít specializovaný přístroj, např. CM5000 Guillotine Cutter od firmy BioDot (Obr. 12a, Obr. 12b), ZQ4000 od firmy Shanghai Kinbio Tech. Co. Ltd (viz Obr. 12c).



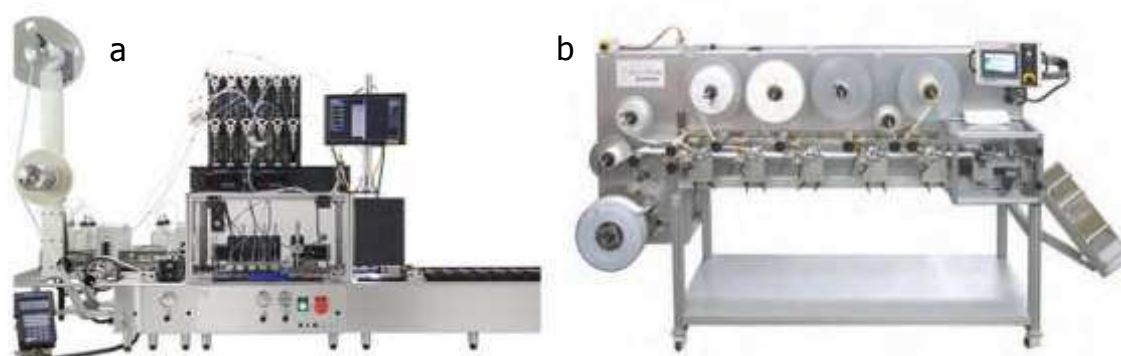
Obr. 12: Ukázky sekaček proužků: a) CM5000 Guillotine Cutter od firmy BioDot, b) automatická sekačka SRR5000 od firmy BioDot, c) ZQ4000 od firmy Shanghai Kinbio Tech.Co.Ltd.

Šířka podložky pro vzorek i detekční molekulu a membrána jsou stejně široké, absorpční podložka je buď stejně široká, nebo širší. Šířka podložek a membrány je z ekonomických důvodů volena co nejmenší (nízká spotřeba materiálů a chemikálií), nicméně je nutné vzít v úvahu následující okolnosti. V první řadě je příliš malou šířkou membrány zhoršeno odečtení linek. Okraje membrány v šířce asi 0,5 mm zpravidla mírně ovlivňuje tok kapaliny, což se projeví jinou kvalitou linky*. Problémem může být i zmenšení kontrastní

* V případě, že je proužek široký 3 mm, tvoří okraje (0,5 mm) 33 % odečítaného plochy výsledku, v případě, že je proužek široký 6 mm, tvoří plocha 16 %.

plochy, což zhoršuje odečítání zejména slabě viditelné linie. Druhým limitujícím faktorem je plocha jednotlivých podložek, prostřednictvím které přiléhají k adhezivní podložce, neboť v případě příliš úzkých proužků je ohrožena soudržnost testu.

V souvislosti s komercializací imunochromatografických testů a s jejich rostoucí produkcí jsou vyvíjeny automatické výrobní linky, které jsou schopny sestavit celý test od nástřiku imunoreagencií, jejich sušení, podlepení membrány až po složení celého testu (Obr. 13).



Obr. 13: Ukázky průmyslové výroby imunochromatografických testů: a) RR120 (BioDot), b) Matrix 7100 (Kinematic Automation). Převzato z www.biodot.com/portfolio/rr120-web-handling-platform/ a www.kinematic.com/pdf/StandardProducts/7100/Matrix%207100%20E.pdf

2.7 Využití metody

Imunochromatografické testy jsou jednoduché, rychlé, levné a umožňují detekci téměř kdekoli v terénu. Jejich nesporné výhody je katapultovaly z výzkumných laboratoří přímo do komerční sféry a jsou dnes komerčně produkovány pro detekci rozmanitých analytů.

Nejdříve došlo k jejich masovému rozšíření v klinické diagnostice. Používají se pro stanovení markerů nádorových a srdečních chorob, metabolických poruch, infekčních agens, krevních skupin a drog. Patří sem i nejlépe známý test pro určení raného stadia těhotenství detekcí choriového gonadotropinu v moči. Velký význam mají rychlé, jednorázové, dobře skladovatelné a jednoduše hodnotitelné medicínské testy v zemích třetího světa, kde lékařské ordinace mnohdy nejsou vybaveny ani nejnutnějším vybavením (např. lednicí).

V posledních letech se intenzivně rozvíjí studium bezpečnosti potravin a kontroly jejich kvality, kde mohou imunochromatografické testy konkurovat ostatním imunochemickým formátům a být vhodným doplňkem tradičních analytických metod. Velkou výhodou je jejich použitelnost kdekoli (POC), což umožňuje kontrolovat vzorky v průběhu celého zpracovatelského řetězce tzv. „od farmy až na stůl“. Podle zpráv RASFF (Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva, z angl. *Rapid Alert System for Food and Feed*)

patří k nejrizikovějším činitelům mykotoxiny, patogenní mikroorganismy a pesticidy, na něž bylo zaměřeno nejvíce pozornosti, následují soupravy pro detekci antibiotik, toxinů a alergenů. Nejvíce sledovanými potravinami jsou produkty z obilí a fazolí, následují masné a mléčné výrobky a produkty ze zeleniny a ovoce. Nedostatečně je zatím pokryto testování ryb a mořských plodů.

V neposlední řadě nacházejí imunochromatografické testy uplatnění v detekci kontaminantů životního prostředí, i když zejména v této oblasti není potřeba testů zdaleka nasycena.

Imunochromatografické testy jsou vyvíjeny pro zjednodušení a zefektivnění práce bezpečnostních složek. Uplatňují se ve forenzních vědách (Old a kol., 2009, Schweers a kol., 2008), při kontrole přechovávání a zneužití zakázaných látek. Pro ochranu veřejné bezpečnosti byl vyvinut multidetekční imunochromatografický systém IMASS od firmy BBI Detection (Integrated Multiplex Assay and Sampling System, Obr. 14) pro odhalení přítomnosti biologické hrozby* a výbušnin†.



Obr. 14: a) IMASS pro odhalení přítomnosti biologické hrozby, b) souprava pro detekci narkotik (vpravo). Převzato z <http://www.bbidetection.com/products/>, III/2017

* Test detekuje *Bacillus anthracis*, ricin, botulotoxin, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Brucella spp.*, *Burkholderia mallei*, Staphylococcal Enterotoxin B.

† 2,4,6-trinitrotoluen, 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyklohexan, pentaerythritol tetranitrát, amonné ionty, nitrát, sacharóza.

2.8 Nevýhody imunochromatografických testů

Jednoduchost imunochromatografických testů je jejich obrovským plusem. Sestavení kvalitního testu však v sobě skrývá mnohá úskalí.

Imunochromatografické testy jsou primárně určeny pro kvalitativní analýzu. Pokud je požadováno kvantitativní hodnocení, je nutné zapojit měřící zařízení (Obr. 15), což prodlužuje, komplikuje i prodražuje analýzu a celkově to působí proti filozofii rychlých testů. Nicméně komerční producenti se v posledních letech na vývoj čtecích zařízení zaměřují (Petryayeva a Algar, 2015). Výsledky vizuálně odečítaných testů je možné převést do číselných hodnot a následně data standardně zpracovat i prostřednictvím skenování a vyhodnocovacího softwaru (např. TotalLab, Bionumerics) (Blažková a kol., 2009).



Obr. 15: Ukázky čteček imunochromatografických testů. a) Qiagen (ESE Quant), b) Scannex, c) iDetect, d) DCN Diagnostics, and e) Shanghai KinbioTech (DT1030) (převzato z Petryayeva a Russ Algar, 2015).

U jednoduchých testů se očekává absence složité přípravy vzorku před analýzou. Nicméně někdy není možné se úpravě vzorku úplně vyhnout. K některým nutným úpravám vzorku postačí modifikace podložky pro vzorek (speciální materiály pro krevní vzorky, koncentrování vzorku, blokování interferujících složek, oddíl 2.2). Analyzovaný vzorek musí být v kapalném stavu. Velice viskózní vzorky či kapalné vzorky s komplikovanou maticí (např. potraviny) musí být před testem naředěny (Blažková a kol., 2010), analyty z pevných vzorků musí být extrahovány.

Na rozdíl od jamky v mikrotitrační destičce při klasických ELISA není možné ošetřit membránu různými činidly a zabránit tím nespecifickým interakcím interferujících látek, aniž by se porušila stabilita a funkčnost membrány. Dalším omezením je malý objem aplikovaného vzorku (cca 100 μ l), větší objemy zpomalují testy, zvětšují finální podobu testu a zhoršují kvalitu linek. Uvedené okolnosti výrazně zvyšují nároky na kvalitu imunoreagencií.

Největším problémem imunochromatografických testů je relativně nižší citlivost. Například v porovnání s ELISA se jedná o zvýšení detekčního limitu zhruba o jeden řád (Blažková a kol., 2009, Holubová a kol., 2010, Blažková a kol., 2010, Hua a kol., 2012). Bylo publikováno několik různých více či méně úspěšných způsobů vedoucích k zesílení signálu, např. zařazení enzymové reakce (Parolo a kol., 2016), elektrochemické (Lai a kol., 2012), chemiluminiscenční nebo fluorescenční koncovky, měření povrchové plazmové resonance

zlatých částic (Huang a kol., 2005), Ramanova spektroskopie (Timmermans a kol., 2016, SERS), zvýraznění odezvy zlatých částic pomocí stříbra (Anfossi a kol., 2013), atd. Ve většině případů se jedná o velmi zajímavé a inovativní přístupy, nicméně zesílení se uskutečňuje na úkor jednoduchosti, délky či ceny testu.

Imunochromatografické testy jsou koncipovány tak, aby je mohl použít i neodborný uživatel. Jeho neodborná manipulace může mít vliv na provedení a spolehlivost testu.

3 Přehled řešené problematiky

V následujícím textu jsou představeny vybrané detekční systémy, které byly vyvinuty v naší laboratoři. Řešená problematika se týká dvou rozdílných oblastí. V prvním případě se jedná o vývoj metod pro detekci patogenních mikroorganismů *Listeria monocytogenes* a rodu *Cronobacter* v potravinových vzorcích. Dále je popsán vývoj imunochromatografických testů pro rychlé stanovení pesticidů v potravinách a v environmentálních vzorcích. Pro vybrané pesticidy byly připraveny ve spolupráci s firmou Vidia, spol. s.r.o. funkční prototypy pro testování v terénu.

3.1 Detekce patogenních bakterií v potravinách

Kvalita potravin z hlediska mikrobiologické bezpečnosti je jedním z důležitých diskuzních témat současnosti. Ve světě je každoročně hlášena celá řada případů onemocnění způsobených konzumací potravin kontaminovaných patogenními mikroorganismy. Mezi nejčastější původce alimentárních onemocnění patří bakterie z rodů *Salmonella* a *Campylobacter*. V naší laboratoři se věnujeme bakteriím rodu *Listeria* a *Cronobacter*. Nejsou to významné patogeny z hlediska incidence, nicméně oba způsobují velmi vážná onemocnění u specifických skupin obyvatel.

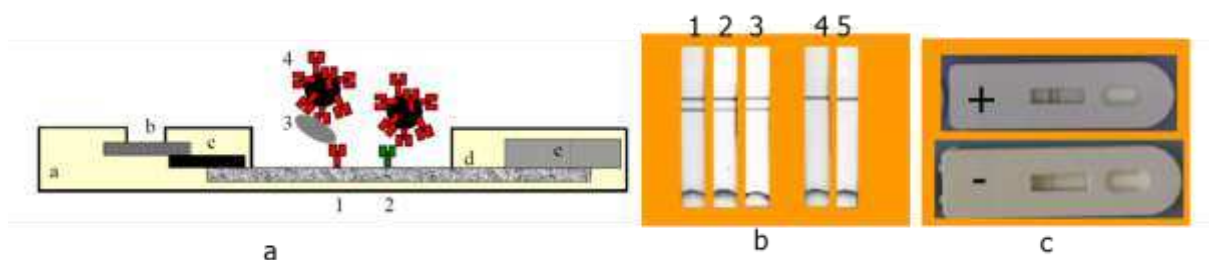
3.1.1 Detekce bakterií *Listeria monocytogenes* a rodu *Listeria* v potravinových vzorcích

Listeria monocytogenes je přísně sledovaným patogenem kvůli těžkému průběhu onemocnění, které vyvolává. Listeriáza se řadí k bakteriálním infekcím s nejvyšším procentem mortality. Z rodu *Listeria* je pro člověka patogenní pouze již zmíněná *Listeria monocytogenes*, avšak přítomnost ostatních *Listeria* spp. může upozornit na sníženou kvalitu potravin a chyby ve výrobním procesu. Pro detekci *Listeria monocytogenes* v potravinách je předepsaný postup podle ČSN EN ISO 11290 založený na klasických mikrobiologických principech. Izolace s následnou identifikací bakterie je sice spolehlivá, ale trvá několik dní. Vzhledem k charakteru potravin, které jsou s *Listeria monocytogenes* spojovány, je vytvářen značný tlak na vývoj nových rychlejších metod. Kromě moderních mikrobiologických metod využívajících chromogenní substráty jsou pro detekci bakterií nejvíce rozvíjeny metody imunochemické a molekulárně biologické. Imunochemické techniky jsou rychlé a poměrně jednoduché, zatímco výhodou molekulárně biologických postupů je jejich vyšší specifita (příloha 1).

Limity bakterií rodu *Listeria* v dětské výživě jsou specifikovány v regulačním opatření Komise ES č. 1441/2007 vydaném v prosinci 2007, upravující nařízení č. 2073/2005

o mikrobiologických kritériích potravin. Potraviny, ve kterých by měla být sledována přítomnost *Listeria monocytogenes*, patří do tří různých kategorií. V první řadě se jedná o potraviny určené k přímé spotřebě pro kojence a pro zvláštní léčebné účely; vyhovující je potravina tehdy, pokud všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost této bakterie. Druhou skupinou jsou potraviny určené k přímé spotřebě, jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely, jež podporují růst *L. monocytogenes*; před tím než taková potravina opustí bezprostřední kontrolu výrobce, nesmí být žádná *L. monocytogenes* přítomna; po uvedení na trh výrobek nesmí překročit limit 100 KTJ na g potraviny po celou dobu údržnosti. Poslední skupina potravin je určena k přímé spotřebě a nepodporuje růst listerií; v nich nesmí být překročen limit 100 KTJ na g potraviny.

Pro detekci *Listeria monocytogenes* bylo publikováno několik imunochemických metod využívajících protilátky připravené proti vybraným virulentním proteinům. V naší laboratoři byly v předchozím období vyvinuty dva testy s využitím polyklonálních protilátek připravených proti internalinu B, jenž je významným proteinem podílejícím se na šíření bakterie v těle hostitele. V prvním případě se jednalo o enzymovou imunoanalýzu na mikrotitrační destičce (příloha 2), ve druhém případě na dipsticku* (příloha 3). Stejně chemikálie byly použity i pro sestavení imunochromatografického testu pro detekci *Listeria monocytogenes* (odstavec 2.5.1). Primární protilátky proti internalinu B byly imobilizovány na membránu (testovací zóna) a na koloidní uhlík (detekční molekula), na membráně byla dále imobilizována sekundární protilátka (prasečí protilátka proti králičímu imunoglobulinu, SwAR, kontrolní zóna). Na membránu byl aplikován 2x ředěný vzorek bakteriální kultury spolu s detekční molekulou. V případě pozitivního vzorku se zobrazila testovací i kontrolní linie, v případě negativního vzorku pouze kontrolní linie (Obr. 16). Po 24 hodinové kultivaci bylo možné detekovat méně než 10 KTJ.



Obr. 16: Imunochromatografický test pro detekci *Listeria monocytogenes*: a) schema testu, b) otevřený formát testu (1- *L. monocytogenes* NCTC 13273, 2 - *L. monocytogenes* NCTC 4886, 3 - *L. monocytogenes* NCTC 4885, 4 - *L. ivanovii* PHLS, 5 - *Bacillus cereus*), c) uzavřený formát testu (+ pozitivní vzorek, - negativní vzorek).

* dipstik – plastová tyčinka nahrazující jamku mikrotitrační destičky

Pro paralelní detekci rodu *Listeria* a *Listeria monocytogenes* byl v roce 2009 publikován imunochromatografický test (příloha 4) pro detekci jejich nukleových kyselin (odstavec 2.5.3). Ze vzorku bakterií je izolována DNA. Její specifické úseky jsou namnoženy pomocí PCR. V tomto případě se jedná o tzv. duplex PCR, kdy vznikají dva druhy amplikonů umožňujících odlišení *L. monocytogenes* od ostatních *Listeria* spp. (reakce se účastní dva páry primerů). Během PCR se navazují specifické značky na jednotlivé PCR produkty pomocí značených primerů. Pár pro detekci rodu *Listeria* obsahoval značky fluorescein/biotin, pár pro detekci *Listeria monocytogenes* digoxigenin/biotin. Získané PCR produkty se aplikují na nitrocelulózovou membránu, na které byly imobilizovány protilátky proti fluoresceinu a digoxigeninu. K vizualizaci testu se používá neutravidin s částicemi koloidního uhlíku. Kontrolní linku tvořila protilátka s navázaným biotinem. V případě, že byl analyzován vzorek obsahující *Listeria monocytogenes*, na testu se objeví tři linie, u ostatních zástupců z rodu dvě linie a u negativních vzorků jedna linka. Srovnání vyvinutých metod je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4: Srovnání vyvinutých metod pro detekci listerií

		ELISA	DIPSTIK	ICT^a	NALFIA
výhody použití		analýza velkého počtu vzorků	snadnost	snadnost	paralelní detekce Lm ^b + gL ^c
princip detekce		imunochemický	imunochemický	imunochemický	molekulárně biologický, imunochemický
vizualizace		enzymová reakce	enzymová reakce	uhlíkaté částice	uhlíkaté částice
doba kultivace		48 h	48 h	48 h	24 h
doba analýzy		320 min	265 min	15-20 min	305 min
specifita		98%	98%	92 %, nebyly stanoveny 2 Lm	100%
- křížové reakce		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
detekční limit	gL	10 ⁵ KTJ·ml ⁻¹	10 ⁶ KTJ·ml ⁻¹	10 ⁵ KTJ·ml ⁻¹	10 ⁵ KTJ·ml ⁻¹
	Lm	10 ⁶ KTJ·ml ⁻¹	10 ⁷ KTJ·ml ⁻¹	10 ⁷ KTJ·ml ⁻¹	10 ⁵ KTJ·ml ⁻¹
náročné kroky metody		pipetování, promývání	pipetování	-	izolace DNA, PCR
potřebné vybavení		ELISA reader, promývačka	-	-	termocyklér
problématické kroky vývoje		příprava protilátek	příprava protilátek	příprava protilátek	-
		značení protilátek	značení protilátek	značení protilátek	-
publikace		příloha 2	příloha 3		příloha 4
užitný vzor					příloha 5

^a ICT – imunochromatografický test, ^b Lm – *Listeria monocytogenes*, ^c gL – rod *Listeria*

Značené amplikony byly použity i pro vývoj zkušební verze mikroarray (odstavec 2.5.5) pro detekci různých DNA – *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, genus *Listeria*, geny pro tetracyklinovou, streptomycinovou a β -laktamovou rezistenci (příloha 6).

Všechny vyvinuté metody (kromě posledně zmíněné) byly použity na testování série reálných vzorků. Celkem byly testovány 3 různé skupiny reálných vzorků: vzorky potravin dostupné u obchodních řetězců s potravinami, vzorky z biofarmy a vzorky testované v rámci kruhových testů. Do první skupiny byly zahrnuty vzorky kojenecké výživy, naklíčených semen, mražené zeleniny, lahůdkových salátů a mléčné výrobky (mléko, jogurt, olomoucké syrečky, romadůr a zmrzlina). Dále bylo testováno pizzy 7 druhů pizzy dodané producentem a jednotlivé přísady. V rámci Národního programu výzkumu II č. 2B06048 (Mikrobiologická rizika v mlékárenských výrobcích – detekce a preventivní opatření) byly odebrány vzorky v blíže nespecifikované biofarmě. Jednotlivé vzorky byly mikrobiologicky zpracovány ve spolupráci se Zkušební laboratoří Ústavu biochemie a mikrobiologie na VŠCHT v Praze (podle ČSN EN ISO 11290-1). Jednalo se o vzorky syrového mléka, vody na oplach vemen, krmné směsi, sena, výkalů a stěrů ze strukové návlečky, struk samotných a podlah. V letech 2005, 2006 a 2007 jsme se zapojili do kruhového testu mezilaboratorního testování způsobilosti laboratoří (MTZL), série VIII, kolo 14, 15 a 16, pořádané Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí. Celkem bylo testováno 8 různých vzorků. Jednalo se o dva vzorky rozemletých těstovin, 3 vzorky sušené mléčné kojenecké výživy a 3 vzorky instantního čokoládového nápoje. Jednotlivé vzorky byly opět mikrobiologicky zpracovány ve spolupráci se Zkušební laboratoří Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze. *Listeria monocytogenes* byla odhalena v 5 vzorcích mražené pizzy, ve 2 přísadách do pizzy (brokolice, žampiony), v mražené brokolici a v sýru romadůr. V některých vzorcích z biofarmy byla stanovena přítomnost bakterií rodu *Listeria*, nicméně *L. monocytogenes* přítomna nebyla. V rámci kruhového testu byly správně určeny všechny analyzované vzorky (Blažková, 2006).

3.1.2 Detekce bakterií *Cronobacter*

Bakterie rodu *Cronobacter* jsou gram-negativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Rod byl klasifikován až v roce 2008. Zástupci tohoto rodu patří mezi patogenní mikroorganismy způsobující závažná onemocnění novorozenců s vysokou úmrtností. Hlavním zdrojem infekce je kojenecká výživa. *Cronobacter* (ještě pod původním taxonomickým označením *Enterobacter sakazakii*) byl mezi rizikové mikroorganismy dětské výživy zahrnut v roce 2004. V současnosti upravuje limity bakterií rodu *Cronobacter* v dětské výživě regulační opatření Komise ES č. 1441/2007 vydané v prosinci 2007, které vyžaduje nepřítomnost bakterií rodu *Cronobacter* v 10 g vzorku sušené počáteční kojenecké výživy a sušených dietních potravin pro zvláštní léčebné účely pro kojence do šesti měsíců věku. Jako referenční analytická metoda se používá klasická kultivační mikrobiologická metoda ISO/TS 22964 (2006).

Pro imunochemickou detekci buněk bakterií rodu *Cronobacter* byly nejprve připraveny polyklonální protilátky; imunizováno bylo tepelně ošetřenými buňkami vybraného zástupce rodu *Cronobacter* (*C. sakazakii* ATCC 29544). Připravené protilátky byly testovány prostřednictvím tradiční enzymové imunoanalýzy na mikrotitračních destičkách, následoval vývoj imunochromatografické detekce (příloha 7). Bylo vybráno přímé nekompetitivní uspořádání metody (odstavec 2.5.1). Metoda však detekovala pouze některé zástupce rodu *Cronobacter*.

Následoval vývoj imunochromatografického testu pro detekci nukleových kyselin rodu *Cronobacter* (odstavec 2.5.3). Pro vývoj imunochromatografického testu byly vybrány primery zaměřené na *16S rRNA*, které byly pro amplifikaci značeny digoxigeninem a biotinem. Během polymerázové řetězové reakce došlo v případě přítomnosti DNA z bakterie rodu *Cronobacter* ke vzniku amplikonu s digoxigeninem na jedné straně a biotinem na druhé straně. Připravený amplikon byl aplikován na nitrocelulóзовou membránu s imobilizovanou protilátkou proti digoxigeninu na testovací zóně a biotinu vázaného přes protilátku v kontrolní zóně. Detekční molekulu tvořily uhlíkaté částice s navázaným neutravidinem. V případě pozitivního vzorku došlo k vybarvení testovací i kontrolní linie, v případě negativního vzorku se zbarvila pouze kontrolní linie (příloha 8 – obr. 1). Metoda umožňuje detekci méně než 10 KTJ rodu *Cronobacter* (příloha 8). Vyvinutá metoda byla aplikována na sérii vzorků počáteční kojenecké výživy, které byly současně analyzovány oficiální ISO metodou a hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Všechny testované vzorky byly správně určeny (příloha 9). Srovnání vyvinutých metod je uvedeno v Tab. 5.

Tab. 5: Srovnání vyvinutých metod pro detekci rodu *Cronobacter* a jejich srovnání s jinými metodami

	ELISA	ICT^a	NALFIA	ISO 22964	MALDI-TOF MS
výhody použití	analýza velkého počtu vzorků	jednoduchost	není nutná čistá kultura	standardizovaná metoda	analýza velkého počtu vzorků
princip detekce	imunochemický	imunochemický	molekulárně biologický, imunochemický	morfologie, fenotyp	přítomnost specifických proteinů
vizualizace	enzymová reakce	uhlíkaté částice	uhlíkaté částice	uhlíkaté částice	uhlíkaté částice
doba kultivace	48 h	48 h	20 h	116 h	44 h
doba analýzy	300 min	15-20 min	120 min	-	120 min
detekční limit	< 10 KTJ·ml ⁻¹	< 10 KTJ·ml ⁻¹	< 10 KTJ·ml ⁻¹	< 10 KTJ·ml ⁻¹	< 10 KTJ·ml ⁻¹
náročné kroky metody	pipetování, promývání	-	izolace DNA, PCR	kultivace, hodnocení výsledku	příprava vzorku
potřebné vybavení	ELISA reader, promývačka	-	termocyklér	-	hmotnostní spektrometr
problématické kroky vývoje	příprava protilátek	příprava protilátek	-	biochemická diverzita rodu	kvalita a zpracování spekter
	značení protilátek	značení protilátek		značení protilátek	-
cena za 100 testů (Kč)	1000	1000	6750	35000	11000
publikace	příloha 7	příloha 7	příloha 8	příloha 9	příloha 9
			příloha 9		
užitečný vzor					příloha 5

^a ICT – imunochromatografický test

3.2 Detekce pesticidů v potravinách a životním prostředí

Pesticidy jsou chemické sloučeniny používané pro preventivní zničení, odpuzování nebo zmírňování účinků škodlivých živočichů, plevelů a parazitujících hub, které ohrožují zemědělské, zahradní a lesní rostliny, zásoby potravin a zemědělských produktů, průmyslové materiály během produkce, skladování, transportu, distribuce a rovněž zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv. Jejich použití přináší výhodu ve formě vysoce kvalitní sklizně, nicméně aplikace způsobuje jejich přetrvání v prostředí a na zemědělských produktech, což představuje riziko pro lidské zdraví.

Vzhledem k vážným ekologickým problémům, které způsobily především organochlorové pesticidy, začal chemický průmysl vyvíjet nové typy pesticidů. Díky své nízké toxicitě pro savce, snadné degradovatelnosti a zachovanému širokému spektru účinku získaly na významu karbamátové pesticidy, např. karbaryl, karbofuran či methiokarb (Stejskal a kol., 2011). Používají se především pro omezování hmyzích škůdců v zemědělství a zahradnictví. Přesto ani jejich používání není zcela bezpečné. Vstupem karbamátových pesticidů do organismu dojde k inhibici acetylcholinesterasy, která zajišťuje konečnou fázi přenosu signálu mezi synaptickými buňkami – uvolnění mediátoru acetylcholinu z receptoru.

Thiabendazol je zástupce benzimidazolových pesticidů. Tento fungicid se používá zejména při ochraně různých druhů plodin (např. citrusy, avokáda, jablka, mrkev, brambory, hrách, sója, pšenice atd.) před plísněmi, skvrnitostí a hnilobě. Thiabendazol je v prostředí stálý, je odolný hydrolýze, v půdě nepodléhá rozkladu za aerobních ani za anaerobních podmínek. Vykazuje nízkou akutní toxicitu při orálním a dermálním podání, může způsobovat závratě, nevolnost, zvracení, průjem, horečku, návaly horka, zimnici, vyrážku a bolesti hlavy. Je toxický pro sladkovodní ryby a mořské bezobratlé (Fishel, 2014).

Toxicita a perzistence zmiňovaných pesticidů vyžaduje kontrolu jejich výskytu v životním prostředí i v potravinách. Kvůli ochraně spotřebitelů jsou legislativou Evropské unie stanoveny maximální limity reziduí (MRL – maximální reziduální limity) pro ovoce a zeleninu (nařízení č. EC 149/2008). Významným nástrojem pro detekci jsou multireziduální metody (Dzuman a kol., 2015). Analyzovány jsou převážně přečištěné extrakty prostřednictvím plynové či kapalinové chromatografie s vhodným detektorem (Hajšlová a kol., 1998). Pro detekci karbamátových pesticidů byly vyvinuty metody kapalinové chromatografie a její varianty vysoce účinné kapalinové chromatografie nejčastěji s využitím hmotnostních detektorů (Mičková a kol., 2003). Thiabendazol se stanovuje v extraktech vzorků prostřednictvím plynové a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (Zheng a kol., 2015). Detekční limity pro tyto metody se pro potravinové vzorky pohybují v rozmezí 5 – 50 ng·mL⁻¹.

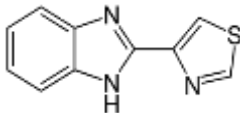
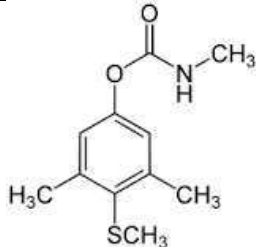
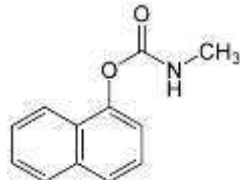
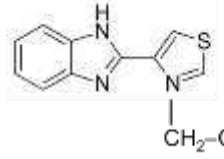
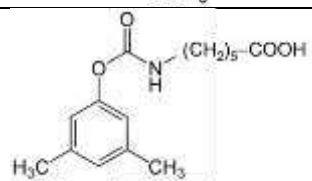
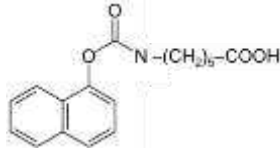
Uvedené tradiční metody jsou velice přesné a citlivé, avšak ne všechny laboratoře disponují nákladným zařízením pro jejich provedení. Navíc někdy je nutné analyzovat vzorek mimo laboratoř. Zde nacházejí své uplatnění imunochromatografické testy.

V naší laboratoři byly vyvíjeny metody pro thiabendazol (příloha 10), methiokarb (příloha 11) a karbaryl (příloha 12). Všechny uvedené pesticidy jsou hapteny, a proto byl pro jejich detekci zvolen nepřímý kompetitivní formát metody (odstavec 2.5.2). Imunoreagencie byly získány od spolupracujícího pracoviště Polytechnické univerzity ve Valencii (Universidad Politécnica de Valencia, Spain). Jednalo se o myší monoklonální protilátky a konjugáty haptenu s ovalbuminem a BSA. Detekční molekula byla tvořena sekundární protilátkou (SwAM, prasečí protilátka připravená proti myším imunoglobulinům) s navázanými uhlíkatými částicemi. Na testovací linii byl imobilizován konjugát haptenu s ovalbuminem a na kontrolní linii terciární protilátka (RASw, králičí protilátka připravená proti prasečím imunoglobulinům). Vzorek byl aplikován spolu s primární protilátkou a detekční molekulou. V případě pozitivního vzorku interagovala primární protilátka s analytem. Vzniklý imunokomplex přešel přes testovací linii bez zadržení. Výsledkem testu byla pouze jedna vybarvená linie – kontrolní, na které interagovala terciární protilátka se sekundární protilátkou značenou částicemi uhlíku. V případě negativního vzorku neměla primární protilátka s čím interagovat a její vazebná místa tedy zůstala volná pro interakci s konjugátem haptenu s ovalbuminem imobilizovaným na testovací linii. Výsledek se projevil vybarvením dvou linií. Podrobnější charakteristiky připravených souprav jsou uvedeny v Tab. 6. Testy byly vyvíjeny pro detekci zmíněných pesticidů v džusech a bylo tedy nutné testovat vliv matrice džusů na průběh a výsledek metod. Vzorky džusů bylo nutné ředit 10krát nebo 100krát a získané detekční limity se pohybovaly v rozmezí 10 – 50 ng·mL⁻¹. Metody jsou schopné úspěšné detekce thiabendazolu, karbarylů a methiokarbu v koncentracích povolených platnou legislativou.

Pro detekci thiabendazolu v džusech byla publikována i varianta metody s využitím zlatých nanočástic (příloha 13) a sestaven funkční prototyp (příloha 14). Souprava byla připravena v uzavřeném formátu, tzn. že vše je uloženo v plastové krabičce a uživatel pouze přidá ředěný vzorek.

V naší laboratoři byly na stejném principu sestaveny další funkční prototypy; pro detekci karbofuranu (příloha 15) a atrazinu (příloha 16 a příloha 17) ve vodních vzorcích z životního prostředí.

Tab. 6: Vyvinuté imunochromatografické testy pro vybrané pesticidy

	thiabendazol	methiokarb	karbaryl
systematický název	2-(thiazol-4-yl) benzimidazol	methylthio-3,5-xylyl-N-methyl karbamát	1-naftylmethyl karbamát
struktura analytu			
struktura haptenu			
imobilizační konjugát [ng/test]	thiabendazol-OVA ^a 12,5	methiokarb-OVA 100	carbaryl-OVA 100
uspořádání	nepřímé kompetitivní	nepřímé kompetitivní	nepřímé kompetitivní
primární protilátka [ng/test]	3	6,25	12,5
sekundární protilátka	SwAM ^b	SwAM	SwAM
terciární protilátka	RASw ^c	RASw	RASw
vizualizace	uhlíkaté částice zlaté částice	uhlíkaté částice	uhlíkaté částice
doba analýzy	10 min	10 min	10 min
specifita	100%	100%	100%
detekční limit 1^d [ng·mL⁻¹]	10 (0,25)	10 (0,5)	50 (5)
detekční limit 2^e [ng·mL⁻¹]	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,03	1,58 ± 0,22
lineární pracovní rozsah [ng·mL⁻¹]	0,11 – 4,13	0,31 – 3,38	2,5 – 11,6
IC₅₀ ± SD^f [ng·mL⁻¹]	0,60 ± 0,08	1,01 ± 0,13	5,12 ± 0,40
analyzované vzorky	ovocné džusy	povrchová voda	ovocné džusy
ředění vzorku	100x	-	10x
publikace	příloha 10 příloha 13	příloha 11	příloha 12
prototyp	příloha 14		

^a OVA – ovalbumin, ^b SwAM – IgG frakce z prasečího séra proti myším imunoglobulinům (z angl. *Swine AntiMouse IgG*), ^c RASw – IgG frakce z králičího séra proti prasečím imunoglobulinům (z angl. *Rabbit AntiSwine IgG*), ^d detekční limit 1 – vizuální detekční limit (v závorce uvedena číslo pro koncentrace, při kterých byla jasně odlišena intenzita testovací linky od negativní kontroly), ^e detekční limit 2 – detekční limit metody počítaný z kalibrační křivky, ^f SD – směrodatná odchylka.

4 Závěr

V první části předkládané práce jsem shrnula problematiku imunochromatografických testů, zejména proces jejich vývoje a produkce, rozdílné přístupy při jejich řešení, výhody i nevýhody a oblasti možného využití. Ve druhé části jsem se zaměřila na konkrétní aplikaci imunochromatografické metody pro detekci analytů z oblasti kontroly bezpečnosti potravin a životního prostředí.

Naše laboratoř se zabývá vývojem imunochemických testů již 30 let a já mohla při svém výzkumu čerpat z bohatých zkušeností svých kolegů. Podařilo se mi zavést metodiku přípravy imunochromatografických testů a rozšířit tak naše portfolio rychlých imunochemických metod. Uvádím zde konkrétní příklady detekčních souprav, které se nám podařilo úspěšně vyvinout. Zejména bych chtěla vyzdvihnout testy určené k detekci bakterií *Listeria monocytogenes* (příloha 4, 5) a bakterií rodu *Cronobacter* (příloha 7, 8, 9). Metodika detekce nukleových kyselin patogenních mikroorganismů byla zapsána na Úřadu průmyslového vlastnictví jako užitný vzor CZ 22776 U1 (příloha 5). Dále byly publikovány naše testy pro detekci pesticidů v ovocných džusech a dětských výživách (příloha 10, 12) a v životním prostředí (příloha 11). Soupravy určené pro rychlou detekci thiabendazolu, karbofuranu a atrazinu byly zapsány jako funkční prototypy (příloha 14, příloha 15, 16, 17).

A jaké jsou hlavní cíle pro blízkou budoucnost imunochromatografických testů? Hlavní výzvy, které jsou předkládány tvůrcům imunochromatografických testů, jsou spojeny s mimolaboratorní aplikací. V současnosti je dostupná celá řada testů pro domácí testování, testování zneužití drog, přítomnost patogenních bakterií v surovinách, forenzní aplikace a situace všeobecného ohrožení; další velký potenciál však v sobě skrývají ordinace lékařů a první pomoci. Významnou oblastí současného i budoucího vývoje jsou materiály používané pro přípravu testů, ať už se jedná o jednotlivé podložky, membránu či detekční molekuly a částice. Cílem je získat materiály, které umožní úpravu vzorku a zlepší citlivost a opakovatelnost jednotlivých metod. V neposlední řadě bude nepochybně vyvíjen tlak na kvantitativní hodnocení testů a s tím spojený vývoj levné a citlivé čtečky testovacích proužků, aniž by byla narušena základní myšlenka imunochromatografických testů – jednoduchost.

5 Seznam zkratek

ATCC	sbírka tkáňových a buněčných kultur (z angl. <i>American Type Culture Collection</i>)
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
ES	Evropské společenství
gL	rod <i>Listeria</i>
ICT	označení pro imunochromatografický test (z angl. <i>Im unochromatographic test</i>)
KTJ	kolonii tvořící jednotka
LFA	označení pro imunochromatografický test (z angl. <i>Lateral Flow Assay</i>)
LFD	označení pro imunochromatografický test (z angl. <i>Lateral Flow Device</i>)
LFIA	označení pro imunochromatografický test (z angl. <i>Lateral Flow Immunoassay</i>)
LFICS	označení pro imunochromatografický test (z angl. <i>Lateral Flow Immunochromatographic Strip</i>)
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
MALDI-TOF	z angl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
MS	z angl. Mass Spectrometry
NALFIA	z angl. Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay
OVA	ovalbumin
POC	z angl. <i>point of care</i>
RASFF	Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (z angl. <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>)
RASw	IgG frakce z králíčího séra proti prasečím imunoglobulinům (z angl. <i>Rabbit AntiSwine IgG</i>)
SwAM	IgG frakce z prasečího séra připravená proti myším imunoglobulinům (z angl. <i>Swine AntiMouse IgG</i>)
SwAR	IgG frakce z prasečího séra připravená proti králíčímu imunoglobulinu (z angl. <i>Swine AntiRabbit IgG</i>)

6 Reference

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. & Nejati-Koshki, K.** Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8, 102 (2013).
- Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » "Trends in Immunolabelled and Related Techniques", book edited by Eltayb Abuelzein, ISBN 978-953-51-0570-1, Published: April 27, 2012 under CC BY 3.0 license. Chapter 19: Carbon Nanoparticles as Detection Label for Diagnostic Antibody Microarrays. **By van Amerongen A., Besselink G.A.J., Blažková M., Posthuma-Trumpie G.A., Koets M. and Beelen-Thomissen B.** DOI: 10.5772/34797.
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G. & Giraudi, G.** Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Anal Bioanal Chem* 405, 467-480 (2013).
- Bahadır, E. B. & Sezgentürk, M. K.** Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC* 82, 286-306 (2016).
- Beloglazova, N. V., Speranskaya, E. S., Wu, A., Wang, Z., Sanders, M., Gofman, V. V., Zhang, D., Goryacheva, I. Y. & De Saeger, S.** Novel multiplex fluorescent immunoassays based on quantum dot nanolabels for mycotoxins determination. *Biosens Bioelectron* 62, 59-65 (2014).
- Blazkova, M., Javurkova, B., Fukal, L. & Rauch, P.** Immunochromatographic strip test for detection of genus Cronobacter. *Biosens Bioelectron* 26, 2828-2834 (2011).
- Blazkova, M., Rauch, P. & Fukal, L.** Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole. *Biosens Bioelectron* 25, 2122-2128 (2010).
- Blažková, M., Mičková-Holubová, B., Rauch, P. & Fukal, L.** Immunochromatographic colloidal carbon-based assay for detection of methiocarb in surface water. *Biosens. Bioelectron.* 25, 753-758 (2009).
- Blažková, M.** Dizertační práce, VŠCHT v Praze (2006).
- Dzantiev, B. B., Byzova, N. A., Urusov, A. E. & Zherdev, A. V.** Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC* 55, 81-93 (2014).
- Dzuman, Z., Zachariasova, M., Veprikova, Z., Godula, M. & Hajslova, J.** Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Anal Chim Acta* 863, 29-40 (2015).
- Ediage, E. N., Di Mavungu, J. D., Goryacheva, I. Y., Van Peteghem, C. & De Saeger, S.** Multiplex flow-through immunoassay formats for screening of mycotoxins in a variety of food matrices. *Anal Bioanal Chem* 403, 265-278 (2012).
- Fishel, F.M.** document PI-72, UF/IFAS Extension (2014).
- Goudarzi, S., Ahmadi, A., Farhadi, M., Kamrava, S. K., Saghafi, S. & Omidfar, K.** Development of a new immunochromatographic assay using gold nanoparticles for screening of IgA deficiency. *Iranian J Allergy Asthma Immunol* 8 (2015).
- Göselová, S., Holubová, B., Blažková, M., Fukal, L.** Rychlá detekce thiabendazolu v laterálním toku na membráně s nanočásticemi zlata. *Chem Listy* 107: 875-879 (2013).
- Guillén, I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E., Puchades, R., Maquieira, A. & Morais, S.** Detection of sulphathiazole in honey samples using a lateral flow immunoassay. *Food Chem* 129, 624-629 (2011).

- Hajšlová, J., Kocourek, V., Poustka J., Cuhra, P.** Příprava vzorku pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách. *Chem Listy* 92, 777-783 (1998).
- Henderson, K. & Stewart, J.** Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. *J Immunol Methods* 270, 77-84 (2002).
- Holubová-Mičková, B., Blažková, M., Fukal, L. & Rauch, P.** Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices. *Eur Food Res Technol* 231, 467-473 (2010).
- Hua, X., Yang, J., Wang, L., Fang, Q., Zhang, G. & Liu, F.** Development of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay and an Immunochromatographic Assay for Detection of Organophosphorus Pesticides in Different Agricultural Products. *PloS one* 7, e53099 (2012).
- Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J. M., Frederix, F., Francis, L., Muyldermans, S., Campitelli, A. & Van Hoof, C.** Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens Bioelectron* 21, 483-490 (2005).
- Huang, X., Aguilar, Z. P., Li, H., Lai, W., Wei, H., Xu, H. & Xiong, Y.** Fluorescent Ru(phen)₃(2+)-doped silica nanoparticles-based ICTS sensor for quantitative detection of enrofloxacin residues in chicken meat. *Anal Chem* 85, 5120-5128 (2013).
- Chinnasamy, T., Segerink, L. I., Nystrand, M., Gantelius, J. & Svahn, H. A.** A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics. *Analyst* 139, 2348-2354 (2014).
- Javůrková, B., Blažková, M., Fukal, L. & Rauch, P.** Immunochemical detections of genus *Cronobacter*. *Chem Listy* 105, 193-198 (2011).
- Javůrková, B., Blažková, M., Fukal, L. & Rauch, P.** Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk. *Eur Food Res Technol* 234, 1099-1104 (2012).
- Karamonova, L., Junkova, P., Mihalova, D., Javurkova, B., Fukal, L., Rauch, P. & Blazkova, M.** The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of biogroups of *Cronobacter sakazakii*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 409-418 (2013).
- Karyakin, A. A., Presnova, G. V., Rubtsova, M. Y. & Egorov, A. M.** Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups. *Anal Chem* 72, 3805-3811 (2000).
- Kato, Y., Araki, Y., Juri, M., Ishisaka, A., Nitta, Y., Niwa, T., Kitamoto, N. & Takimoto, Y.** Competitive immunochromatographic assay for leptosperin as a plausible authentication marker of manuka honey. *Food Chem* 194, 362-365 (2016).
- Lai, W., Tang, D., Que, X., Zhuang, J., Fu, L. & Chen, G.** Enzyme-catalyzed silver deposition on irregular-shaped gold nanoparticles for electrochemical immunoassay of alpha-fetoprotein. *Anal Chim Acta* 755, 62-68 (2012).
- Lattanzio, V. M., Nivarlet, N., Lippolis, V., Della Gatta, S., Huet, A. C., Delahaut, P., Granier, B. & Visconti, A.** Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Anal Chim Acta* 718, 99-108 (2012).
- Li, J. & Macdonald, J.** Multiplex lateral flow detection and binary encoding enables a molecular colorimetric 7-segment display. *Lab Chip* 16, 242-245 (2016).
- Mansfield, M. A.** in *Drugs of Abuse: Body Fluid Testing* (eds Raphael C. Wong & Harley Y. Tse) 71-85 (Humana Press, 2005).
- Mickova, B., Zrostlikova, J., Hajšlova, J., Rauch, P., Moreno, M. a. J., Abad, A. & Montoya, A.** Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-

performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of N-methylcarbamate insecticides in baby food. *Anal Chim Acta* 495, 123-132 (2003).

Niu, Y., Matos, A. I., Abrantes, L. M., Viana, A. S. & Jin, G. Antibody oriented immobilization on gold using the reaction between carbon disulfide and amine groups and its application in immunosensing. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 28, 17718-17725 (2012).

Old, J. B., Schweers, B. A., Boonlayangoor, P. W. & Reich, K. A. Developmental validation of RSID-saliva: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of saliva. *J Forensic Sci* 54, 866-873 (2009).

Parolo, C., de la Escosura-Muñiz, A. & Merkoçi, A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosens. Bioelectron.* 40, 412-416 (2013).

Petryayeva, E. & Algar, W. R. Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *RSC Advances* 5, 22256-22282 (2015).

Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J. & van Amerongen, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393, 569-582 (2009).

Posthuma-Trumpie, G. A., Wichers, J. H., Koets, M., Berendsen, L. B. & van Amerongen, A. Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays. *Anal Bioanal Chem* 402, 593-600 (2012).

Presnova, G. V., Presnov, D. E., Grigorenko, V. G., Egorov, A. M. & Rubtsova, M. Y. Oriented immobilization of antibodies and their fragments on modified silicon for the production of nanosensors. *Moscow University Chemistry Bulletin* 71, 110-115 (2016).

Sajid, M., Kawde, A.-N. & Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* 19, 689-705 (2015).

Samsonova, J. V., Safronova, V. A. & Osipov, A. P. Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk. *Talanta* 132, 685-689 (2015).

Seidel, C., Peters, S., Eschbach, E., Fessler, A. T., Oberheitmann, B. & Schwarz, S. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Vet microbiology* 200, 101-106 (2017).

Schweers, B. A., Old, J., Boonlayangoor, P. W. & Reich, K. A. Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification-Blood). *Forensic Sci Int Genet* 2, 243-247 (2008).

Stejskal, V., Hajšlová, J. & Kocourek, V. Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů. *VŠCHT VVF: PROJ/2005/11/deklas* (2011).

Timmermans, F. J., Lenferink, A. T. M., van Wolferen, H. A. G. M. & Otto, C. Correlative SEM SERS for quantitative analysis of dimer nanoparticles. *Analyst* 141, 6455-6462 (2016).

van Amerongen, A., Wichers, J. H., Berendsen, L. B., Timmermans, A. J., Keizer, G. D., van Doorn, A. W., Bantjes, A. & van Gelder, W. M. Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods: quantitative computer image analysis of results. *Journal of biotechnology* 30, 185-195 (1993).

Vlach, J., Javurkova, B., Karamonova, L., Blazkova, M. & Fukal, L. Novel PCR-RFLP system based on *rpoB* gene for differentiation of *Cronobacter* species. *Food microbiology* 62, 1-8 (2017).

- Wang, C., Li, X., Peng, T., Wang, Z., Wen, K. & Jiang, H.** Latex bead and colloidal gold applied in a multiplex immunochromatographic assay for high-throughput detection of three classes of antibiotic residues in milk. *Food Control* 77, 1-7 (2017).
- Wang, D. B., Tian, B., Zhang, Z. P., Deng, J. Y., Cui, Z. Q., Yang, R. F., Wang, X. Y., Wei, H. P. & Zhang, X. E.** Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detection system. *Biosens Bioelectron* 42, 661-667 (2013).
- Wang, Z., Zhi, D., Zhao, Y., Zhang, H., Wang, X., Ru, Y. & Li, H.** Lateral flow test strip based on colloidal selenium immunoassay for rapid detection of melamine in milk, milk powder, and animal feed. *International journal of nanomedicine* 9, 1699-1707 (2014).
- Yen, C.-W., de Puig, H., Tam, J., Gómez-Márquez, J., Bosch, I., Hamad-Schifferli, K. & Gehrke, L.** Multicolored Silver Nanoparticles for Multiplexed Disease Diagnostics: Distinguishing Dengue, Yellow Fever, and Ebola Viruses. *Lab on a chip* 15, 1638-1641 (2015).
- Zheng, X., Ding, L., Chen, Z., Guo, J., Zhang, R. & Wu, W.** [Rapid determination of thiabendazole and carbendazim in concentrated fruit juices by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry]. *Se pu = Chinese journal of chromatography* 33, 652-656 (2015).

Technická literatura a webové stránky

Nařízení komise (ES) č 149/2008 upravující nařízení č. 396/2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu.

[citováno III/2017]

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0149&from=CS>

Nařízení komise (ES) č. 1441/2007, upravující nařízení č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích potravin.

[citováno III/2017]

[http://eur-lex.europa.eu/legal-](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&qid=1490875654157&from=EN)

[content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&qid=1490875654157&from=EN](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&qid=1490875654157&from=EN)

ČSN EN ISO 11290-1:1999. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 1: Metoda průkazu.

ISO/TS 22964: 2006. Mléko a mléčné výrobky - Průkaz *Enterobacter sakazakii*.

Bangs Laboratories, Inc., Lateral Flow Tests, TechNote 303, 1–6, 2013.

Millipore Corporation, Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for Product Development. Lit. No. TB500EN00. Bedford, MA, 2002.

Millipore Corporation, Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for product development, Bedford, MA, 2001.

https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en_US/Freestyle/DIV-Divisional/Events/pdfs/lateral-flow-presentations/selecting-a-membrane-and-pad-materials.pdf [citováno II/2017].

http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/products/AlternativeProductStructure_23129/ [citováno II/2017].

<https://www.slideshare.net/bishorvi/lateral-flow-assay-in-animal-disease-diagnosis>, [citováno II/2017].

<http://foodsafety.neogen.com/en/reveal#allergens>, [citováno I/2017].

www.biodot.com/portfolio/rr120-web-handling-platform/, [citováno I/2017].

www.kinematic.com/pdf/StandardProducts/7100/Matrix%207100%20E.pdf, [I/2017].

<http://foodsafety.neogen.com/en/reveal#allergens>, [II/2017].

7 Seznam příloh a přílohy

Tato práce se opírá o původní vědecké i referátové články v impaktovaných časopisech nebo odborných knihách. Tyto práce jsou přiloženy v následujícím pořadí:

Příloha 1:

Blažková, M., Karamonová, L., Fukal, L., Rauch, P. *Listeria monocytogenes* - Dangerous pathogen and its detection in foods. *Chem. Listy* 99(7): 467-473 (2005).

Příloha 2:

Karamonová, L., Blažková, M., Fukal, L., Rauch, P., Greifová, M., Horáková, K., Tomáška, M., Roubal, P., Brett, G. M., Wyatt, G. M. Development of an ELISA specific for *Listeria monocytogenes* using a polyclonal antibody raised against a cell extract containing internalin B. *Food Agr. Immunol.* 15(3-4): 167-182 (2003).

Příloha 3:

Blažková, M., Karamonová, L., Greifová, M., Fukal, L., Hoza, I., Rauch, P., Wyatt, G. Development of a rapid, simple paddle-style dipstick dye immunoassay specific for *Listeria monocytogenes*. *Eur. Food Res. Technol.* 223(6): 821-827 (2006).

Příloha 4:

Blažková, M., Koets, M., Rauch, P., van Amerongen, A. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in food. *Eur. Food Res. Technol.* 229(6): 867-874 (2009).

Příloha 5:

Blažková, M., Javůrková, B., Fukal, L., Rauch, P. Diagnostická souprava na detekci patogenních mikroorganismů ve vzorcích biologického původu. Užité vzor CZ 22776 U1 (10.10.2011).

Příloha 6:

Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » "Trends in Immunolabelled and Related Techniques", book edited by Eltayb Abuelzein, ISBN 978-953-51-0570-1, Published: April 27, 2012 under CC BY 3.0 license. Chapter 19: Carbon Nanoparticles as Detection Label for Diagnostic Antibody Microarrays. By van **Amerongen A., Besselink G.A.J., Blažková M., Posthuma-Trumpie G.A., Koets M. and Beelen-Thomissen B.** DOI: 10.5772/34797.

Příloha 7:

Javůrková, B., Blažková, M., Fukal, L., Rauch, P. Immunochemical detections of genus *Cronobacter*. Chem. Listy 105(3): 193-198 (2011).

Příloha 8:

Blažková, M., Javůrková, B., Fukal, L., Rauch, P. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. Biosens. Bioelectron. 26(6): 2828-2834 (2011).

Příloha 9:

Javůrková, B., Blažková, M., Fukal, L., Rauch, P. Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk. Eur. Food Res. Technol. 234(6): 1099-1104 (2012).

Příloha 10:

Blažková, M., Rauch, P., Fukal, L. Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole. Biosens. Bioelectron. 25(9): 2122-2128 (2010).

Příloha 11:

Blažková, M., Mičková-Holubová, B., Rauch, P., Fukal, L. Immunochromatographic colloidal carbon-based assay for detection of methiocarb in surface water. Biosens. Bioelectron. 25(4): 753-758 (2009).

Příloha 12:

Holubová-Mičková, B., Blažková, M., Fukal, L., Rauch, P. Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices. *Eur. Food Res. Technol.* 231(3): 467-473 (2010).

Příloha 13:

Göselová, S., Holubová, B., Blažková, M., Fukal, L.: Rychlá detekce thiabendazolu v laterálním toku na membráně s nanočásticemi zlata. *Chem. Listy* 107: 875-879 (2013).

Příloha 14:

Haňková, B., Blažková, M., Rauch, P., Fukal, L., Forejtová, A., Řeháková, K., Černohorská, H. Rychlý imunoanalytický test pro detekci thiabendazolu. Prototyp, 2011, lokalizace VIDIA spol. s r.o. (IČ 16556267) - (Rapid-VIDITEST thiabendazol), RIV/60461373:22330/11:43892791

Příloha 15:

Blažková M., Haňková B., Rauch P., Fukal L., Lábaj J., Forejtová A., Černohorská H. Rychlý imunoanalytický test pro detekci karbofuranu. Prototyp, 2011, lokalizace VIDIA spol. s r.o. (IČ 16556267) - (Rapid-VIDITEST karbofuran), RIV/60461373:22330/11:43892694

Příloha 16:

Haňková B., Blažková M., Rauch P., Fukal L., Řeháková K., Forejtová A., Černohorská H. Rychlý imunoanalytický test pro detekci atrazinu. Prototyp, 2011, lokalizace VIDIA spol. s r.o. (IČ 16556267) - (Rapid-VIDITEST atrazin), RIV/60461373:22330/11:43892794

Příloha 17:

Forejtová A., Poláková M., Černohorská H., Řeháková K., Rauch P., Fukal L., Blažková M. LFIA souprava pro stanovení atrazinu ve vodních vzorcích. Funkční vzorek, 2012, lokalizace VIDIA spol. s r.o. (IČ 16556267) - (LFIA-VIDITEST Atrazin), RIV/16556267:____/12:#0000143.

***Listeria monocytogenes* – NEBEZPEČNÝ PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH**

**MARTINA BLAŽKOVÁ, LUDMILA KARAMONOVÁ,
LADISLAV FUKAL a PAVEL RAUCH**

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 26 Praha 6
Ladislav.Fukal@vscht.cz

Došlo 4.4.05, přijato 27.5.05.

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes*, virulentní protein,
imunoanalýza, potraviny

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika *Listeria monocytogenes*
3. Listerióza
4. Virulentní proteiny *Listeria monocytogenes*
5. Detekce *Listeria monocytogenes* v potravinách
 - 5.1. Klasické kultivační metody
 - 5.2. Moderní kultivační metody
 - 5.3. Molekulárně-genetické postupy
 - 5.4. Imunoanalýza
 - 5.5. Komerční soupravy
6. Závěr

1. Úvod

Listeria monocytogenes je obávaným patogenním mikroorganismem vyskytujícím se v potravinách. Nejčastěji kontaminuje mléčárenské a masné výrobky. Onemocnění vyvolaná touto bakterií, tzv. listeriózy, jsou velmi závažná a zasahují specifické skupiny populace: staré lidi, děti, těhotné ženy a osoby s oslabenou imunitou. Způsobují záněty mozkových blan, septikémie a potraty. *Listeria monocytogenes* je jako původce alimentárních onemocnění (souvisejících s příjmem potravy) známa teprve od roku 1980. Odhaduje se, že je příčinou přibližně 0,5–1 % všech hromadných alimentárních onemocnění. Mezi těmito nemocemi má však zcela nesporné prvenství v procentu mortality, které dosahuje až 33 % z celkového počtu onemocnění. Alimentární listerióze podlehnou více pacientů než salmonelóze. Zájem o listerie a zejména o jejich rychlou detekci v posledních letech velmi vzrostl. Příčinou jsou epidemie, které se objevují od osmdesátých let stále častěji.

2. Charakteristika *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* zahrnuje v současné době 6 různých druhů¹ – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* a *L. grayi*. *L. monocytogenes* je podmíněným patogenem lidí i zvířat, *L. ivanovii* vyvolává onemocnění zejména u ovcí a skotu² a jen velmi výjimečně u lidí^{3,4}. Ostatní druhy jsou považovány za nepatogenní⁵.

Listerie jsou grampozitivní bakterie, které jsou úzce příbuzné s rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*¹. Buňky mají tvar krátkých až kokoidních tyčinek o velikosti 0,4–1,5 µm. Listerie nejsou acidorezistentní a nevytvářejí pouzdra ani spory. Jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní^{6,7}.

Bakterie rodu *Listeria* produkují enzym katalasu, netvoří oxidasu ani ureasu, hydrolyzují eskulin a hippurát sodný, ale močovinu, kasein či želatinu nehydrolyzují⁸. Listerie jsou aktivně sacharolytické mikroorganismy a pro jejich růst je esenciální D-glukosa. Na základě schopnosti fermentovat různé sacharidy (D-xylosa, L-rhamnosa, α-methyl-D-mannosid a D-mannitol, D-arabitol, methyl-D-glukosid, ribosa, glukosa-1-fosfát, D-tagatosa) jsou rozlišovány jednotlivé druhy listerií. Další významnou vlastností některých listerií, jež přispívá k potvrzení druhu, je jejich hemolytická aktivita. *L. monocytogenes* tvoří, podobně jako *L. seeligeri*, diskrétní zónu hemolýzy. Výraznou zónu tvoří pouze *L. ivanovii*, zbylé druhy listerií hemolytickou aktivitu nemají.

Kultivačně nejsou listerie náročné a jsou značně rezistentní ke změnám vnějšího prostředí. Rostou dobře na běžných kultivačních půdách (živný agar, krevní agar)⁹ a v širokém teplotním rozmezí (1 až 45 °C). Optimální teplota růstu se pohybuje okolo 37 °C (cit.¹⁰). Teplota velmi ovlivňuje patogenní vlastnosti bakterie. Většina kmenů se pomnožuje v rozmezí pH 5,6–9,6, přičemž optimální pH pro růst je 7,0 až 7,5 (cit.¹¹). Listerie se dobře množí i při vysokých koncentracích soli (10% NaCl)⁹, jsou schopné přežít i v 25% NaCl, 20 dní v suchém prostředí a 6 dní v destilované vodě¹¹.

Buněčná stěna a cytoplazmatická membrána *Listeria monocytogenes* obsahují, kromě různých látek lipidového charakteru, řadu proteinů, které jí umožňují proniknout do buněk hostitelského organismu, přežít v nich a dále se šířit. Takové proteiny, které jsou pro přežití a rozšiřování bakterie v hostitelském organismu nepostradatelné, označujeme jako virulentní.

3. Listeriíza

Všechny druhy listerií, včetně *L. monocytogenes*, jsou v přírodě hojně rozšířeny. Mohou se vyskytovat ve vodě,

v půdě, na rostlinách, ale také ve střevním traktu volně žijících zvířat. V souvislosti s používáním nekvalitních krmiv, obsahujících velké množství listerií, lze pozorovat výskyt *L. monocytogenes* i u hospodářských zvířat. Onemocnění bývají zpravidla bezpříznaková, a tedy neléčená. To v konečném důsledku může vést až ke kontaminaci masa při porážce zvířete. Primárně kontaminované může být rovněž mléko a syrová zelenina (hnojená fekáliemi infikovaných zvířat). Potravinářské suroviny obsahující listerie mohou mít za následek znečištění prostředí potravinářských závodů v průběhu zpracovatelského procesu, což může způsobit sekundární kontaminaci potravin.

Hlavním způsobem přenosu na člověka je konzumace kontaminovaných potravin. Mezi potraviny s nejvyšším rizikem patří maso a tepelně neopracované masné výrobky, syrové mléko a mléčné výrobky (měkké a plísňové sýry), zelenina. K další kontaminaci a pomnožení listerií může dojít v průběhu přípravy pokrmů a uchovávání hotových jídel při pokojové teplotě¹⁰. Velmi nebezpečná je neonatální infekce, kde je zdrojem nákazy mateřský organismus (listerie pronikají placentou a infikují plodovou vodu). V nemocnicích hrozí nozokomiální infekce, při hospitalizaci nemocných pacientů je třeba dbát na protiepidemická opatření. Je zaznamenáno několik případů profesionálního onemocnění u veterinářů, ošetřovatelů a řezníků, kteří byli v přímém styku s nakaženými zvířaty^{9,12}.

4. Virulentní proteiny *Listeria monocytogenes*

Listerióza má většinou velmi progresivní a těžký průběh. Hlavní příčinou jsou účinné mechanismy, kterými *Listeria monocytogenes* infikuje savčího hostitele. Je schopna pronikat přes různé tělní bariéry (intestinální, hematoencefalitickou, placentární) a rychle se rozšiřuje po celém těle. K tomuto způsobu života je dobře vybavena celou řadou virulentních proteinů. Celý proces lze rozdělit do několika fází, z nichž některé jsou již známé, ale některé ještě čekají na své objasnění.

Infekce hostitelské buňky je zahájena internalizací bakterie. Pro vstup listerií do nefagocytujících hostitelských buněk je nezbytná přítomnost speciálních proteinů, které jsou schopné fagocytosu indukovat. Jde především o povrchové proteiny tzv. internaliny – internalin A (InlA, 800 aminokyselin, 88 kDa) a internalin B (InlB, 630 aminokyselin, 65 kDa). Dalším významným proteinem podílejícím se na internalizaci bakterie je p60 (484 aminokyselin, 60 kDa), který je dominantním extracelulárním proteinem listerií a je často využíván k diagnostice *Listeria monocytogenes*.

Poté, co je bakterie pohlcena, musí rychle uniknout z fagocytické vakuoly (fagosomu), která ji obklopuje, aby se mohla dále množit. Na uvolnění z vakuoly se podílí virulentní protein zvaný listeriolysin O (LLO, 529 aminokyselin, 58 kDa), který je schopen tvořit v membráně fagosomu póry. Celého děje se v některých typech hostitel-

ských buněk účastní ještě fosfolipasa C specifická pro fosfatidylinositol (PI-PLC, 317 aminokyselin, 35 kDa, EC 4.6.1.13). Po úniku z fagosomu se bakterie v hostitelské buňce množí. Aby mohly bakterie po pomnožení z buňky uniknout, musí se přemístit k její cytoplazmatické membráně. Jejich pohyb je zprostředkován proteinem ActA (actin assembly protein, 639 aminokyselin, 97 kDa). Tento protein polymerizuje buněčný aktin a vytváří za bakterií jakýsi chvost. Tím, jak se tato struktura prodlužuje, je bakterie přemísťována až k membráně. Výsledně se vytvoří výčnělek, který interaguje se sousední buňkou a je jí následně pohlcen. V nové hostitelské buňce je tedy bakterie obalena fagosomem se dvěma membránami, k jehož rozrušení bakterie používá své dva další virulentní proteiny – lecitinasu (PlcB, 264 aminokyselin, 29 kDa) a metaloproteasu (Mpl, 510 aminokyselin, 57 kDa). Po uvolnění do cytosolu se bakterie začíná množit a výše popsané děje se opakují.

5. Metody detekce *Listeria monocytogenes* v potravinách

Stále nejčastějším způsobem stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách je použití klasických kultivačních metod. Na jejich základě je založena i metoda popsaná v ČSN EN ISO 11290-1:1999 (cit.¹³). Jelikož jde však o metody značně časově náročné (5–8 dnů) a včasná diagnostika je vzhledem k progresivnímu průběhu onemocnění listeriózou velmi důležitá, je v posledních letech vyvíjen značný tlak na vývoj nových, rychlých metod. Tyto metody je možno rozdělit podle principu stanovení na moderní kultivační techniky, metody molekulárně-genetické a techniky imunochemické.

5.1. Klasické kultivační metody

ČSN ISO 11290-1:1999

Prvním krokem je primární pomnožení listerií v selektivním médiu Fraser se sníženou koncentrací antibiotik. Toto pomnožení částečně inhibuje růst doprovodné mikroflóry a současně umožňuje oživení poškozených buněk listerií. Potom následuje selektivní sekundární pomnožení buněk v médiu Fraser s plnou koncentrací antibiotik. Výsledně pomnožená kultura je vždy naočkována na dvě selektivně-diagnostická agarová média (Oxford a PALCAM). Po inkubaci při teplotě 30, 35 nebo 37 °C se po 24 h (popř. 48 h) zjišťuje přítomnost kolonií *Listeria monocytogenes*. Každá z vybraných kolonií se očkuje na povrch neselektivního tuhého média TSYEA. Následuje kultivace 18–24 h při 35 nebo 37 °C. Potvrzení identity se provádí vhodnými morfologickými, fyziologickými a biochemickými testy (hemolýza, fermentace sacharidů). Celková doba stanovení se pohybuje mezi 5–8 dny a vzhledem k vyhledávání suspektních kolonií po sekundárním pomnožení vyžaduje zkušené pracovníky.

5.2. Moderní kultivační metody

Následující testy využívají k potvrzení příslušnosti k jednotlivým druhům listerií jejich biochemické vlastnosti. Jsou většinou založeny na průkazu charakteristického enzymu způsobujícího přeměnu substrátu, která je přímo či nepřímo doprovázena změnou zabarvení média. Substráty jsou buď obsaženy v sérii tekutých kultivačních médií (API Listeria test) nebo jsou součástí speciálních tuhých půd (Rapid L. mono test, ALOATM a COMPASS L. mono agar).

API Listeria test¹⁴

Tento test firmy bioMérieux rozlišuje všechny druhy listerií běžnými biochemickými testy. Součástí komerčně dodávané sady je 10 mikrozkušavek. Každá obsahuje dehydratovaný chromogenní substrát pro testování enzymových reakcí nebo fermentace sacharidů, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy listerií.

Jednotlivé testy sledují buď přítomnost enzymů (arylamidasy, mannosidasy, glukosidasy), nebo fermentaci následujících sacharidů: D-arabitolu, D-xylosy, rhamnosy, α -methyl-D-glukosidu, ribosy, glukosa-1-fosfátu, D-tagatasy.

Očkuje se čistá bakteriální kultura, jež se nechá 18 až 24 h kultivovat při 37 °C. Vyhodnocení se provádí vizuálně, porovnáním barev v jednotlivých mikrozkušavkách s interpretační tabulkou, která je k testu přiložena. Listerie se nakonec identifikují s pomocí „seznamu profilů“, nebo s identifikačním softwarem.

RAPID L. mono test

Princip detekce na médiu Rapid L. mono (Sanofi Diagnostics Pasteur) je založen na specifickém průkazu aktivity enzymu fosfolipasy (projevující se modrým zbarvením kolonií) a na schopnosti využívat xylosu, což se pozná tak, že se okolo bakteriálních kolonií vytvoří patrná žlutá zóna. Složení selektivního média inhibuje růst většiny interferující mikroflóry (G^+ , G^- bakterie, kvasinky i plísně). *L. monocytogenes* vykazuje fosfolipasovou aktivitu a není schopná využívat xylosu, její kolonie mají proto čistě modrou barvu bez doprovodné „halo“ zóny. Díky fosfolipasové aktivitě a schopnosti využívat xylosu tvoří buňky *L. ivanovii* modrozelené kolonie se žlutou „halo“ zónou. Kolonie jiných druhů rodu *Listeria* mají barvu bílou; *L. seeligeri* a *L. welshimeri* s „halo“ zónou, *L. innocua* a *L. grayi* „halo“ zónu netvoří.

ALOA a COMPASS L. mono Agar

ALOA (AES Laboratoire) a COMPASS L. mono Agar (Solabia) jsou diagnostická chromogenní média pro izolaci *Listeria* spp. a identifikaci *Listeria monocytogenes*. Jsou založeny na průkazu β -glukosidasy, obsažené v buňkách všech druhů rodu *Listeria* a způsobující modré až modrozelené zabarvení kolonií. *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* navíc tvoří působením fosfolipasy C specifické pro fosfatidylinositol (PI-PLC) kolem kolonií žlutou „halo“ zónu. Součástí obou agarů je i inhibiční sys-

tém, který znemožňuje v prvních 24 hodinách inkubace růst jiných bakterií (např. *Bacillus*) a specificky i *L. ivanovii*. Po 24 h kultivaci při 37 °C jsou typické kolonie (modré se žlutou „halo“ zónou) určeny jako *Listeria monocytogenes*. Při jejich absenci kultivace při 37 °C pokračuje dalších 12–24 h, kdy tvoří typické kolonie také *L. ivanovii*. Při objevení těchto kolonií je pro rozlišení obou druhů nutno použít L. Monodisk test (AES Laboratoire, Francie). V něm se *L. ivanovii*, na rozdíl od *L. monocytogenes*, projeví žlutým zabarvením.

5.3. Molekulárně-genetické metody

Molekulárně-genetické metody umožňují určit mikroorganismus na základě jeho genetické informace. K tomu jsou využívány různé molekulárně-genetické techniky, z nichž nejvýznamnější jsou hybridizace a polymerasová řetězová reakce (PCR). Tyto metody jsou založeny na specifické komplementaci (hybridizaci) mezi hledaným úsekem jednovláknové nukleové kyseliny z lyzovaných buněk bakterie a sondou. Sondou rozumíme synteticky připravenou krátkou sekvenci nukleotidů komplementární k hledanému úseku. Tyto metody využívají pro specifickou detekci *L. monocytogenes* charakteristické sekvence jejího genomu. Nález takové sekvence ve zkoumaném materiálu indikuje přítomnost *L. monocytogenes*.

Molekulárně-genetické metody jsou vysoce citlivé v případě použití čistých bakteriálních kultur, ale při stanovení ve složitých matricích (např. v některých potravinách) se citlivost výrazně snižuje. Proto je často nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat. Lze při tom využít jak metody fyzikálně-chemické (např. filtrace, extrakce), tak metody bioafinitní (např. imunochemické).

Hybridizace

Jak již bylo uvedeno, základem metody je hybridizace mezi hledaným úsekem jednovláknové nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) a sondou. Sonda, komplementární k hledanému úseku, bývá značena např. chemiluminiscenční značkou, jež umožní finální detekci. Po hybridizaci je přidáno selekční činidlo, které slouží k rozlišení hybridizované a volné sondy, případně může být nenavázaná sonda separována¹⁵.

Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction – PCR) je enzymová metoda umožňující namnožení definovaného úseku DNA *in vitro*. Vlastní PCR předchází izolace bakterie ze zkoumaného vzorku (matrice může snižovat citlivost stanovení), její pomnožení v tekutém médiu a lýza. Lýzované buňky (popř. DNA izolovaná z těchto buněk) jsou pak analyzovány PCR. Prvním krokem metody je oddělení vlákna dvoušroubovice DNA teplotní denaturací (při teplotě přesahující 90 °C). Následuje hybridizace primeru (krátká sekvence nukleotidů) ke komplementárnímu úseku DNA (45–65 °C) a extenze připojeného primeru termostabilní DNA polymera-

sou (většinou při 72 °C), kdy probíhá syntéza druhého řetězce DNA (cit.¹⁶).

Produkty PCR bývají nejčastěji detegovány elektroforézou v agarosovém gelu v horizontálním uspořádání v přítomnosti ethidiumbromidu. Po rozdělení je elektroforeogram vyvolán UV světlem. Lze také použít radioaktivně nebo fluorescenčně značené primery a po elektroforetickém dělení lze výsledek PCR detegovat autoradiograficky, nebo měřením fluorescence. Další možností je použití hybridizačních sond, značených na konci 5' křenovou peroxidasou.

Amplifikace specifických úseků RNA

Tato metoda (angl. nucleic acid sequence-based amplification – NASBA) využívá k amplifikaci specifický úsek bakteriální RNA. Tento úsek RNA je v prvním kroku přepsán do komplementární DNA (cDNA) reverzní transkriptasou. Ribonukleasa H z *Escherichia coli* (RNAasa H) uvolní cDNA z hybridu DNA-RNA. Po syntéze komplementárního řetězce je cDNA DNA-dependentní RNA-polymerasou přepsána zpět do molekul RNA. Několikanásobným opakováním těchto kroků dochází k namnožení cílového úseku. Jako sondy jsou využívány krátké oligonukleotidové sekvence komplementární ke specifickým sekvencím bakteriální RNA. Používají se dva typy primerů – první obsahuje „záchytnou“ sekvenci komplementární k RNA a sekvenci promotoru pro polymerasu RNA, druhý pak obsahuje pouze „záchytnou“ sekvenci. Detekce se provádí např. elektroforézou v agarosovém gelu¹⁷.

Ligasová řetězová reakce (LCR)

Tato metoda je založena na podobném principu jako PCR. Hlavní rozdíl spočívá ve využití dvou párů primerů (PCR využívá dvou primerů). Primery, které tvoří pár, jsou komplementární ke dvěma sousedním oblastem stejného vlákna DNA. Dvojice primerů nepřekrývá celý hledaný úsek DNA, na jejich styku je ponechána mezera, která je termostabilní polymerasou DNA doplněna. Po tomto kroku následuje spojení obou úseků termostabilní ligasou. Mnohonásobným opakováním tohoto postupu se množství hledaného úseku DNA ve vzorku zvětšuje¹⁸.

5.4. Imunochemické techniky

Mezi největší přednosti imunochemických stanovení patří rychlost, jednoduchost provedení, možnost stanovení velkého počtu vzorků současně a především možnost detekce ve složitých matricích. Rozšíření těchto technik podporuje také nenáročnost na laboratorní vybavení a relativně nízká cena. Základem všech imunochemických metod je interakce protilátek s antigenem. Při těchto metodách jsou používány *in vitro* polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní protilátky vytvořené proti antigenním strukturám, které jsou charakteristické pouze pro bakterie rodu *Listeria*¹⁹. Před vlastní imunodetekcí je nutné bakterie namnožit ve vzorcích potravin běžnými kultivačními metodami.

Enzymová imunoanalýza

Při této metodě (angl. Enzyme linked immunosorbent assay – ELISA) je jeden z imunoreaktantů vázán na tuhou fázi a druhý je značený enzymem. Detekce je prováděna prostřednictvím enzymové reakce.

V současné době je pro detekci bakterií nejčastěji využíván přímý nekompetitivní (tzv. sendvičový) postup²⁰. Ten se skládá z několika po sobě jdoucích kroků:

V prvním kroku jsou na tuhou fázi (nejčastěji stěnu jamky v mikrotitrační destičce) imobilizovány protilátky. Poté je přidán vzorek obsahující bakterie. Buňky *Listeria monocytogenes* interagují s protilátkou. Po odstranění nevázaných složek následuje aplikace protilátky značené enzymem. K detekci je využita enzymová reakce, kdy je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt.

Imunochromatografická technika na membráně

Tato metoda (angl. lateral flow immunoassay) je velmi oblíbená pro svoji rychlost a technickou jednoduchost provedení²⁰.

Nejčastěji je opět využíváno sendvičové uspořádání. První typ protilátky je imobilizován na povrch membrány, druhá protilátka je konjugována s barevnými latexovými částicemi a je nanášena spolu se vzorkem na počátek membrány. Tato směs se pohybuje membránou působením kapilárních sil. Pokud je ve vzorku přítomen antigen, specificky interaguje s označenou protilátkou. Vzniklý imuno-komplex se následně naváže na imobilizovanou protilátku, což se projeví vznikem barevné linky v testovací oblasti.

Imunosenzor

V posledních letech se objevují snahy o využití imunochemických biosenzorů (imunosenzorů). Jde o rozmanitá bioelektronická zařízení umožňující sledovat přímo či nepřímo interakce mezi specifickými protilátkami a antigenem. Jeden z imunoreaktantů je imobilizován na povrchu vhodného nosiče a následně jsou monitorovány změny jeho elektrických, optických či piezoelektrických vlastností v závislosti na průběhu imunochemického děje. Přestože již několik imunosenzorů našlo v praxi uplatnění při stanovení různých látek, vzhledem k problémům při vývoji a použití imunosenzorů pro detekci bakterií jsou tyto techniky stále spíše otázkou budoucnosti²¹.

5.5. Komerční testy pro detekci listerií v potravinách

Na základě výše uvedených rychlých metod detekce byly sestaveny komerční soupravy pro stanovení listerií v potravinách. Soupravy dostupné v současné době na trhu jsou uvedeny v tab. I. Jsou rozděleny podle principu stanovení na molekulárně-genetické a imunochemické. U každého testu je uvedeno, zda slouží k průkazu celého rodu *Listeria*, nebo zda lze specificky odlišit *Listeria monocytogenes* od ostatních, nepatogenních druhů listerií.

Dalším důležitým parametrem při výběru metody je její celková časová náročnost. Mezinárodně uznávaným

Tabulka I

Přehled komerčně dostupných diagnostických souprav k detekci *Listeria monocytogenes*

Test	Princip stanovení	Doba detekce ^a	Specifita	Výrobce
molekulárně-genetický				
<i>AccuProbe Listeria monocytogenes</i>	hybridizace a chemiluminiscenční detekce	37 h	<i>L. monocytogenes</i>	GeneProbe, Inc
<i>BAX for L. monocytogenes</i>	PCR	45 h	<i>L. monocytogenes</i>	Qualicon, Inc.
<i>Gene-Trak Listeria Assay</i> ^b	hybridizace a spektrofotometrická detekce	42–50 h	<i>Listeria</i>	Neogen Corp.
<i>Gene-Trak Listeria monocytogenes Assay</i> ^b	hybridizace a spektrofotometrická detekce	48 h	<i>L. monocytogenes</i>	Neogen Corp.
<i>Probelia PCR System</i>	PCR a spektrofotometrická detekce	28 h	<i>L. monocytogenes</i>	Sanofi Diagnostics Pasteur
imunochemický				
<i>Assurance Listeria EIA</i> ^b	nepřímá sendvičová ELISA	50 h	<i>Listeria</i>	BioControl Systems, Inc.
<i>EIA-Foss for Listeria</i> ^b	imunomagnetická separace a přímá sendvičová ELISA	50 h	<i>Listeria</i>	Foss North America, Inc.
<i>Listeria Rapid Test</i> ^b	imunochromatografická detekce	43 h	<i>Listeria</i>	OXOID, Inc.
<i>Listeria-Tek</i> ^b	přímá sendvičová ELISA	50 h	<i>Listeria</i>	Organon Teknika Corp.
<i>ListerTest</i> ^b	imunomagnetická separace a přímá sendvičová ELISA	24 h	<i>Listeria</i>	Vicam
<i>Pathalert Listeria monocytogenes</i>	nepřímá sendvičová ELISA	42–52 h	<i>Listeria</i>	Diagnostica, Merck
<i>Reveal for Listeria</i>	imunochromatografická detekce	43 h	<i>Listeria</i>	Neogen Corp.
<i>Singlepath Listeria</i>	imunochromatografická detekce	37–49 h	<i>Listeria</i>	Merck
<i>Transia Plate Listeria</i>	přímá sendvičová ELISA	46 h	<i>Listeria</i>	Diffchamb
<i>Transia Plate Listeria monocytogenes</i>	přímá sendvičová ELISA	46 h	<i>L. monocytogenes</i>	Diffchamb
<i>TECRA Listeria Visual Immuno Assay</i> ^b	přímá sendvičová ELISA	48–50 h	<i>Listeria</i>	Tecra Diagnostic
<i>TECRA Unique Listeria</i>	dipstick	32 h	<i>Listeria</i>	Tecra Diagnostic
<i>Vidas LIS</i>	přímá sendvičová ELISA	50–54 h	<i>Listeria</i>	BioMérieux Vitek
<i>Vidas LMO</i> ^b	přímá sendvičová ELISA	50–54 h	<i>L. monocytogenes</i>	BioMérieux Vitek
<i>Visual immunoprecipitate (VIP) for Listeria</i> ^b	imunochromatografická detekce	48 h		BioControl Systems, Inc.
ostatní				
<i>Dynabeads anti-Listeria</i>	imunomagnetická separace a kultivace a standardní ověření	24 h	<i>Listeria</i>	Dynal Biotech ASA

^a Doba detekce zahrnuje i pomnožení mikroorganismů před vlastní detekcí, ^b metody schválené AOAC (Asociace analytických chemiků)

standardem pro patogeny (začleněným i v ČSN ISO 10560:1996 – Mléko a mléčné výrobky) je průkaz jediné buňky *Listeria monocytogenes* ve 25 g (popř. 25 ml) vzorku potravin. Jelikož je velmi obtížné zachytit jedinou buň-

ku v tak velkém objemu vzorku, předchází obvykle každému stanovení selektivní pomnožení buněk na úroveň, která umožní jednodušší detekci. Tento postup je zahrnut ve většině uváděných souprav.

Zde se přednostně soustředíme na metody, u kterých bylo uvedeno, že jsou ověřeny organizací Association of Analytical Chemists (AOAC).

Souprav ke specifické detekci *L. monocytogenes* bylo až dosud vyvinuto šest. Čtyři jsou založeny na molekulárně-genetickém principu. *AccuProbe Listeria monocytogenes* (GeneProbe) a *Gene-Track Listeria monocytogenes Assay* (Neogene) využívají hybridizace s chemiluminiscenční či spektrofotometrickou koncovou detekcí. *BAX assay* (Qualicon) a *Probelia PCR System* (Sanofi Diagnostics Pasteur) jsou metody založené na PCR. Další dvě soupravy využívají imunochemické detekce. *VIDAS LMO* využívající protilátky je součástí poloautomatizovaných imunochemických stanovení série *VITEK* firmy BioMérieux. Testovaný vzorek je nejprve pomnožen v tekutém médiu a vzorek tohoto média je poté aplikován na reagenční proužek s imobilizovanou protilátkou. Analýza je automatizována pomocí přístroje *VITEK* s fluorescenční koncovou detekcí. Druhou je souprava *Transia Plate Listeria monocytogenes* (Diffchamb), která je založená na přímé metodě sendvičové ELISA s protilátkami proti specifickému peptidovému sekvencím extracelulárního proteinu p60. Protilátky tedy neinteragují přímo s buňkou, ale s proteinem přítomným v roztoku.

Soupravy, které umožňují detegovat celý rod *Listeria* jsou mnohem početnější. Dvě z nich, *Gene-Track Listeria Assay* (Neogene) a *Probelia PCR system* (Sanofi Diagnostics Pasteur) jsou založeny na molekulárně-genetických metodách. Ostatní soupravy využívají imunochemický princip. *VIDAS* pro celý rod *Listeria* (*VIDAS LIS*) je rovněž dostupný pro přístroj *VITEK*, založený na stejném principu jako výše uvedený specifický test na *L. monocytogenes*. Ten však získal od AOAC osvědčení PTM (performance tested method, číslo licence 981202). Jiný automatizovaný imunodiagnostický systém, *EIAFoss* od Foss Electric, má modul pro detekci *Listeria monocytogenes* a je od AOAC certifikovaný pro maso a mléko pod označením PTM 980801. Ostatní, neautomatizované testy lze rozdělit mezi ELISA testy (s vizuální nebo přístrojovou koncovkou) a ostatní formáty, jako jsou magnetické částice a tyčinky ze syntetických polymerů (dipsticks). *Tecra Listeria Visual Immunoassay* (Tecra Diagnostics) je upravena jako ELISA v mikrotitračních destičkách (rozdělených na jednotlivé řádky), založená na polyklonálních protilátkách s vizuální nebo spektrofotometrickou detekcí. Tato souprava získala od AOAC osvědčení OM (official method) pro detekci rodu *Listeria* v potravinách s číslem licence 995.02. *Assurance EIA* (BioControl) je podobná metoda, která je AOAC certifikovaná jako OM 995.02. *Listeria-Tek* (Organon-Teknika) je založena na ELISA v mikrotitračních destičkách s monoklonálními protilátkami, opět s fotometrickou detekcí. Má licenci AOAC (OM 994.03) pro použití při analýze mléčných, mořských a masných produktů. Komerčně dostupné jsou i další testy, než je ELISA. Např. v testu *Unique* (Tecra) se používají plastické tyčinky ze syntetických polymerů s imobilizovanými protilátkami, které jsou schopny zachytit antigen z média obsahujícího namnožené buňky listerií.

Barevné linky na povrchu těchto tyčinek znamenají průkaz listerií v analyzovaném vzorku. Příkladem imunochromatografického testu jsou *Listeria Rapid Test* od firmy Oxoid a *Visual Immunoprecipitate Assay* (BioControl). Oba mají AOAC licenci: Oxoid PTM 960701 a BioControl OM 997.03.

Na závěr je nutno zmínit *ListerTest* (Vicam) a *Dynabeads anti-Listeria* (Dynal Biotech ASA) pracující na odlišném principu: protilátky imobilizované na magnetických částicích zachytí buňky listerií z upraveného potravinového vzorku (princip imunomagnetické separace – IMS). Magnetické částice se zachycenými buňkami jsou poté přeneseny na povrch pevné půdy. Při použití *ListerTest* následuje po inkubaci imunochemická detekce. U *Dynabeads anti-Listeria* jsou po inkubaci vyhledávány kolonie charakteristické pro listerie, které jsou ověřovány standardními biochemickými a serologickými metodami. Tyto testy jsou dobrou ukázkou flexibility využití protilátek v rychlých mikrobiologických testech.

6. Závěr

Mikroorganismy jsou stálým a trvalým nebezpečím ohrožujícím zdraví obyvatelstva a patří dle každoročních zpráv WHO k nejrizikovějším faktorům i ve srovnání s takovými civilizačními chorobami jako je rakovina a AIDS. Zavedení systému kritických kontrolních bodů (angl. hazardous analysis critical control points – HACCP) systému do potravinářských technologií (v ČR pro výrobu povinné od 1.1.2000) vyvolalo tlak na urychlený vývoj metod pro rychlé a specifické stanovení sledovaných parametrů. V oblasti mikrobiologie se pozornost soustředila na potravní patogeny, jejichž stanovení klasickými kultivačními normovanými metodami trvá běžně 5–8 dní (dle náročnosti vyšetření). Z moderních metod, které mohou výrazně snížit dobu stanovení, jsou perspektivní imunochemické a molekulárně-genetické metody, které mají vysokou specifitu. Jejich využívání bylo ověřeno v řadě laboratoří a v současné době jsou ve fázi konečné přípravy návrhy norem založených na těchto stanoveních. Pro snadné a pohodlné používání těchto metod přímo ve výrobních závodech se firmy zabývající mikrobiální detekcí soustředily na přípravu komerčních souprav na principu molekulárně-genetického nebo imunochemického a dále na výrobu selektivních specifických chromogenních medií. Vývoj mikrobiologické diagnostiky jde jednoznačně touto cestou.

Práce vznikla s podporou GA ČR (číslo grantu 525/03/0350) a grantem MŠMT (MSM 6046137305).

LITERATURA

1. Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: Clin. Microbiol. Rev. 14, 584 (2001).

2. Alexander A. V., Walker R. L., Johnson B. J., Charlton B. R., Woods L. W.: J. Am. Vet. Med. Assoc. 200, 711 (1992).
3. Cummins A. J., Fielding A. K., McLauchlin J.: J. Infect. 28, 89 (1994).
4. Chand P., Sadana J. R.: Vet. Rec. 145, 83 (1999).
5. Rocourt J., Grimont P. A. D.: Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 866 (1983).
6. Collins M. D., Wallbanks S., Lane D. J., Shah J., Nietupski R., Smida J., Dorsch M., Stackebrandt E.: Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 240 (1991).
7. Prats N., Briones V., Blanco M. M., Altimira J., Ramos J. A., Domínguez L., Marco A.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 5 (1992).
8. Zahradnický J.: Mikrobiologie a epidemiologie. Avicenum, Brno 1987.
9. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J.: Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha 1996.
10. Tomancová I.: Problematika *Listeria monocytogenes* v potravinách. LAST – Vydavatelství potravinářské literatury, Brno 1991.
11. Waites W. M., Arbuthnott J. P.: Lancet 336, 722 (1990).
12. Šrámová H., Beneš Č., Karpíšková R.: Zpráva SZÚ, Praha 2000.
13. ČSN ISO 11290-1: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu, leden 1999.
14. bioMérieux: Návod k API *Listeria*. Francie 1998.
15. Okwumbua O., Swaminathan B., Edmonds P., Wenger J., Hogan J., Alden M.: Res. Microbiol. 143, 183 (1992).
16. Ruml T.: Laboratoř z genového inženýrství. VŠCHT Praha, Praha 1997.
17. Uyttendaele M., Schuckink R., Gemen van B., Debevere J.: Int. J. Food Microbiol. 54, 2933 (1988).
18. Wiedmann M., Barany F., Batt C. A.: Appl. Environ. Microbiol. 59, 2743 (1993).
19. Karamonová L., Blažková M., Fukal L., Rauch P., Greifová M., Horáková K., Tomáška M., Roubal P., Brett G. M., Wyatt G. M.: Food Agric. Immunol. 15, 167 (2003).
20. Mičková B., Rauch P., Fukal L.: Chem. Listy 98, 970 (2004).
21. Koubová V., Brynda E., Karasová L., Škvor J., Homola J., Dostálek J., Tobiška P., Rošický J.: Sensors and Actuators B 74, 100 (2001).

M. Blažková, L. Karamonová, L. Fukal, and P. Rauch (Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague): ***Listeria monocytogenes* – Dangerous Pathogen and Its Detection in Foods**

The aim of the review is to characterize *Listeria monocytogenes* as one of the most dangerous microbial contaminants in foods. A survey of methods for its detection is given. Molecular genetic methods and immunoassay techniques are recognized as promising methods for *Listeria monocytogenes* screening in food samples. A list of commercially available kits is presented.

Impaktový faktor Chemických listů opět narostl !

Na ISI Web of Knowledge (<http://isi17.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=JCR&Func=Frame>) byly aktualizovány hodnoty impaktových faktorů za rok 2004. Je potěšitelné, že Chemické listy opět potvrdily každoroční vzrůstající trend, který nastartovaly v roce 1998 (IF₁₉₉₈ = 0,108). Současná hodnota činí:

$$\text{IF}_{2004} = 0,348.$$

Zvýšení proti roku 2003 je sice nepatrné (IF₂₀₀₃ = 0,345) a naše možnosti se zřejmě blíží k limitě, ale stále si udržujeme první místo mezi impaktovanými časopisy vydávanými v České republice v národním jazyce.

redakce

Development of an ELISA Specific for *Listeria Monocytogenes* Using a Polyclonal Antibody Raised Against a Cell Extract Containing Internalin B

L. KARAMONOVÁ,¹ M. BLAŽKOVÁ,¹ L. FUKAL,¹ P. RAUCH,¹
M. GREIFOVÁ,² K. HORÁKOVÁ,³ M. TOMÁŠKA,⁴ P. ROUBAL,⁵
G. M. BRETT⁶ AND G. M. WYATT⁶

¹Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, Prague 166 28, Czech Republic; ²Department of Food Science and Technology, Slovak Technical University, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia; ³Department of Biochemistry and Microbiology, Slovak Technical University, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia; ⁴TL Examinála, Dairy Research Institute, Dlha 95, 010 01 Zilina, Slovakia; ⁵Milcom, Dairy Research Institute, Ke Dvoru 12a, 160 00 Prague 6, Czech Republic; ⁶Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK

(Original manuscript received 15 September 2003; revised manuscript accepted 25 January 2004)

We have developed a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that is specific to the foodborne pathogenic micro-organism Listeria monocytogenes. It is based on an antibody raised against an L. monocytogenes cell preparation optimized for extraction of internalin B. Only in a sandwich ELISA format was the protein A-purified antibody specific to L. monocytogenes. In a competitive ELISA format, the antibody recognizes other Listeria species. The sandwich ELISA shows no recognition of L. innocua, L. ivanovii, L. welshimeri, L. seeligeri, or L. grayii. It has a minimum detectable level for L. monocytogenes of log₁₀ 6.37 cfu ml⁻¹ in pure culture, is reproducible, and is unaffected by the presence of high numbers (approximately log₁₀ 8.0 cfu ml⁻¹) of the other Listeria species. Possible reasons for the format-dependent specificity are discussed. When the ELISA was applied to milk samples inoculated with L. monocytogenes reference material (5 cfu ml⁻¹), there was a strong response to the enrichment cultures. The new assay may prove useful in detection of L. monocytogenes in enrichment cultures of food samples.

Keywords: ELISA, *Listeria monocytogenes*, internalin B

Correspondence to: Gary M. Wyatt, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK. Tel: +44 (0)1603 255000. Fax: +44 (0)1603 255288. E-mail: gary.wyatt@bbsrc.ac.uk

INTRODUCTION

The genus *Listeria* contains only one species, *L. monocytogenes*, which is a confirmed pathogen of man, causing the syndrome generally known as listeriosis (for a review, see Farber & Peterkin, 2000). The other *Listeria* species can be regarded as non-pathogenic, except in occasional, rare circumstances. However, there is a very close relationship between *L. monocytogenes* and the non-pathogenic *L. innocua* (McLauchlin & Jones, 1998; Glaser *et al.*, 2001), and the other *Listeria* species were only separated from the grouping originally named *L. monocytogenes* as a result of similar studies. Further, members of the genus are very similar phenotypically (McLauchlin & Jones, 1998) and can only be distinguished by biochemical profiling; even then, strain variation is seen. Thus, rapid diagnostic tests to discriminate the pathogenic *L. monocytogenes* from non-pathogenic *Listeria* are of great interest.

L. monocytogenes is known to be foodborne and is found in dairy products, meat (including poultry and fish) and, to a lesser extent, vegetables; refrigerated ready-to-eat meals are a special concern because the organism can grow at low temperatures. It is a normal resident of the intestinal tract in humans and animals, and is endogenous to the farm environment (Farber & Peterkin, 2000). Control measures principally revolve around quality assurance and hazard analysis critical control point (HACCP) methods. Central to control of *L. monocytogenes* in a HACCP system is extensive environmental and in-line sampling (Farber & Peterkin, 2000). Here, rapid diagnostic tests as a replacement for, or as an adjunct to, the lengthy traditional culture methods could have a major impact in *L. monocytogenes* control by simplifying test procedures and thus allowing increased frequency of sampling. To be useful, of course, such tests must be specific for *L. monocytogenes* and should not react with non-pathogenic *Listeria* species.

L. monocytogenes has a complex pathogenicity mechanism, with several virulence factors that allow infection to spread by direct cell-to-cell transmission. Entry to host cells is mediated by an internalin protein (InlB; Braun & Cossart, 2000) which is found only in *L. monocytogenes*. Thus, this protein offers a potential target for *L. monocytogenes*-specific diagnostic methods. In this paper, we describe an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that uses polyclonal antibodies raised to a *L. monocytogenes* cell preparation optimised for extraction of internalin B protein. This sandwich ELISA is specific to *L. monocytogenes*.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria

Strains used in the experiments are shown in Table 1.

Cell Extract

The method used was that of Muller *et al.* (1998), which is optimized for the extraction of internalin B. A *L. monocytogenes* clone engineered to over-produce internalin B (EGD pERL3 50-1, kindly donated by Dr T. Chakraborty, Giessen, Germany; Lingnau *et al.*, 1995) was cultivated in 2 L Brain-Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) containing erythromycin ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) overnight at 37°C , with shaking. The culture was centrifuged and the supernatant discarded. The pellet was washed with phosphate-buffered saline (PBS; 0.14 M NaCl, 0.0015 M KH_2PO_4 , 0.008 M Na_2HPO_4 , 0.0027 M KCl; pH 7.4) and re-suspended in 50 ml Tris-HCl buffer (1 M, pH 7.5). After incubating for 1 h on ice, the sample was centrifuged and the supernatant (cell extract) filter-sterilized, dialysed at $+2^\circ\text{C}$ against 3 changes of aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ solution (25 mM) and lyophilized.

TABLE 1. Strains of bacteria used

Species/strain number	Serotype	Origin
<i>L. monocytogenes</i>		
86/12	4a	NCTC 5214
88/1	not tested	cheese at IFR
88/13	not tested	milk at IFR
88/49	1/2a	NCTC 4886
89/9	4b	NCTC 10527
89/3	not tested	ready meal at IFR
88/51	1/2c	NCTC 5348
87/17	not tested	chicken at IFR
<i>L. innocua</i>		
86/26	6a	NCTC 11288
87/58	not tested	cheese at IFR
88/25	not tested	salad at IFR
88/54	6b	NCTC 11289
<i>L. grayi</i> ssp. <i>grayi</i>		
88/44		NCTC 10815
<i>L. ivanovii</i>		
88/39	not tested	donated by PHLS
88/40	not tested	donated by PHLS
<i>L. seeligeri</i>		
89/17	1/2b	ATCC 35967
89/21	not tested	industrial sample at IFR
<i>L. welshimeri</i>		
88/43	6a	NCTC 11857
<i>Enterococcus faecium</i>		CCM 2308
<i>Enterobacter aerogenes</i>		CCM 2531
<i>Bacillus cereus</i> 99/G	not tested	milk at STU
<i>Lactobacillus plantarum</i> 92/H	not tested	cabbage at STU

Notes: NCTC, UK National Collection of Type Cultures; ATCC, American Type Culture Collection; CCM, Czech Collection of Micro-organisms, Brno, Czech Republic; IFR, Institute of Food Research, Norwich, UK; PHLS, UK Public Health Laboratory Service; STU, Slovak Technical University, Bratislava, Slovakia.

Gel Electrophoresis of Cell Extract

One-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out on the extracts, using a 3% stacking gel and a 12% separating gel. The running buffer was: glycine 0.192 M, Tris 0.025 M, pH 8.3, SDS 1 g L⁻¹, and the separating conditions were 250 V at 30 mA.

Production of Antibodies

Male and female white New Zealand rabbits (weighing 2.5 kg) were immunized with the cell extract according to the scheme in Table 2. Animals were kept singly in experimental cages 53 × 40 × 35 cm and fed a standard pellet diet, KKK/L (Ondra, Kralovany, Czech Republic), 120–150 g per day and tap water *ad libitum*; room temperature was 20–24°C, relative humidity 30–80%, and automatic ventilation 8–12 exchanges of air per hour. Blood was

TABLE 2. Immunization scheme

Immunization	Day	Dose (mg cell extract)	Adjuvant	Applied
1	0	0.11	CFA	Im
2	28	0.11	IFA	Im
3	56	0.11	IFA	Im
4	84	0.11	IFA	Im
5	112	0.125	IFA	Sc
6	140	0.11	IFA	Im
	156		collection of blood	

Notes: Im, intramuscular, applied to legs; CFA, complete Freund's adjuvant; Sc, subcutaneous, applied to back; IFA, incomplete Freund's adjuvant.

centrifuged (1000 g, 10 min, laboratory temperature), the serum separated and aminocaproic acid (0.3 g L^{-1}) and sodium azide (1 g L^{-1}) were added. Sera were stored at 5°C .

Purification of Antibodies

IgG was purified from the serum with an affinity column of protein A immobilized on a glass carrier (Prosep A; Bioprocessing Ltd., Durham, UK), using binding buffer (0.01 M phosphate buffer, containing NaCl 8 g L^{-1} , pH 7.4), elution buffer (0.1 M citrate buffer, pH 5.8) and trapping buffer (1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4). All solutions and antisera were sterilized by membrane filtration. IgG fractions were lyophilized.

Labelling

The purified IgG was labelled with horseradish peroxidase using the Linx HRP Rapid Protein Conjugation Kit (Invitrogen BV, Groningen, The Netherlands).

Titration of Purified IgG

Listeria strains were grown in trypticase soy broth (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) for 18 h at 37°C . Microplates (MaxiSorp; Nunc, Denmark) were coated (200 μl per well) for 2 h at 37°C with washed *Listeria* cells ($\sim 10^7$ cells ml^{-1} in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6). Coated microplates were washed 5 times (250 μl per well) with PBS containing Tween 20 (0.5 ml L^{-1}), pH 7.4 (PBST). Aliquots (200 μl) of a ten-fold dilution series of lyophilised IgG, dissolved in PBST containing 50 g L^{-1} dried non-fat milk (PBSTM), were added to the wells and incubated for 2 h at 37°C . After further washing, goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate (Sigma A6154; diluted 1:1000 v/v in PBSTM) was added (200 μl per well) and plates incubated for 1 h at 37°C . After final washing, the assay was developed with tetramethyl benzidine (TMB)-based substrate (200 μl per well; Vetoquinol, Bicester, UK), stopped with 2 M H_2SO_4 (50 μl per well), and absorbance measured at 450 nm.

Indirect Competitive ELISA

Microplates (COSTAR 9018; Corning, USA) were coated (as above) with *L. monocytogenes* 88/49 cells (10^7 cells ml^{-1} ; 200 μl per well). For the assay, standards or samples were first added to the plate (50 μl per well). A solution of the purified IgG ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in PBST+10 g L^{-1} bovine serum albumin; PBSTBSA) was then added (50 μl per well), and plates incubated for 1.5 h at 37°C . Standards were *L. monocytogenes* cells diluted in PBSTBSA using ten-fold dilution steps from 10^8 cells ml^{-1} to 10^4 cells ml^{-1} ; blanks (PBSTBSA only) were also added.

After washing 4 times with PBST as above, swine goat anti-rabbit peroxidase conjugate (SwAR-Px, SEVAC, Czech Republic; diluted 1:4000 in PBST) was added (100 μ l per well), and plates incubated for 1 h at 37°C. After again washing, TMB substrate (prepared by dissolving 1 mg TMB dissolved in 1 ml of dimethyl sulphoxide, 9 ml 0.05M citrate-phosphate buffer pH 5.0 and 2 μ l 30% v/v H₂O₂) was added (100 μ l per well). Plates were incubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was stopped and absorbance measured as described above.

Direct Sandwich ELISA

Microplates (MaxiSorp; Nunc, Denmark) were coated (100 μ l per well) with purified IgG (10 μ g ml⁻¹ in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) for 2 h at 37°C. Plates were washed 4 times with PBST. *Listeria* strains (18 h cultures in Fraser broth; Merck, Darmstadt, Germany; 37°C) were diluted in PBSTM; other species (18 h cultures, 37°C, in Fraser broth) were diluted in a similar way. Diluted cultures were added to the plate (100 μ l per well) and plates incubated for 2 h at 37°C before washing 5 times with PBST (250 μ l per well). The peroxidase-labelled IgG conjugate (diluted 1:250 in PBSTM) was then added (100 μ l per well) and plates incubated for 1 h at 37°C. Plates were washed again and substrate added as above. After incubation for 10 minutes at 37°C, the reaction was stopped and absorbance was measured as above.

ELISA Specificity and Sensitivity

The sensitivity (minimum detectable level of *L. monocytogenes*) and specificity (recognition of *L. monocytogenes* only) of the sandwich ELISA with pure cultures, and in the presence of other *Listeria* species, were determined. First, from a stock suspension of *L. monocytogenes* 88/49 (grown as before), a dilution series was made in PBSTM, and assayed five times as above (triplicate wells per dilution point) on one microplate. Second, five separate dilution series were made from the same stock solution, and assayed in the same way.

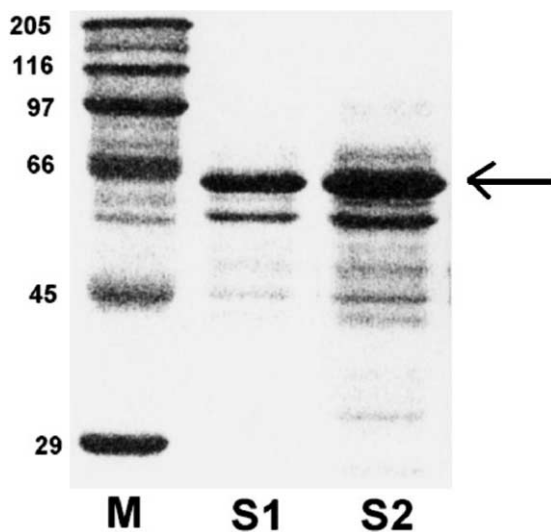


FIG. 1. SDS-PAGE of cell extract from *L. monocytogenes* clone EGD pERL3 50-1 (S1 = 5 μ l extract; S2 = 10 μ l extract; M = molecular weight markers, with sizes shown in kDa). Arrow indicates position of putative internalin B. This extract was used for immunization.

The assay limit of detection (c) was calculated from the following equation (Karpinski, 1990):

$$c = 10^{(((\ln((D - U/(U - C))))/(-2)) - \alpha)/\beta)}$$

where:

C = level of the bottom asymptote

D = level of the top asymptote

α = curve characteristic of the position of linear non-asymptote part from the view of antigen concentration coordinates

β = curve characteristic of the slope of the linear non-asymptote part

U = blank + (3 $\times$ SD) [the blank is the average value of absorbance for solution with zero concentration of antigen, calculated from 6 values, and SD is the standard deviation of these values]

The signal coefficients of variation (CV) for each cell concentration for both sets of data were calculated from the following equation -

$$CV (\%) = 100 \times (SD/\text{mean})$$

Third, from the stock suspension of *L. monocytogenes* 88/49, parallel dilution series were made using PBSTM suspensions of other *Listeria* species (at a fixed concentration of about $\log_{10}$ 8.0 cfu ml⁻¹) as the diluents. The dilution series was then assayed as above (duplicate wells per dilution point).

Response of the ELISA to Heated Cells

L. monocytogenes strains were cultured in Fraser broth (18 h at 37°C), and aliquots heat-treated (76°C, 7 min) before testing in the sandwich ELISA.

Application of the Sandwich ELISA

For an initial evaluation of the sandwich ELISA, reference capsules (*L. monocytogenes* 5 ALM 92; RIVM, SVM, Bilthoven, The Netherlands) were used to inoculate milk samples, and listeriae cultivated by an extended version of the Fraser broth two-step enrichment method (ISO, 1996). Five separate aliquots (25 ml) of sterile milk (UHT commercially-produced milk, sterilized at 110°C, 10 min, before use) were each inoculated with one gelatin reference capsule, containing approximately 5 cfu *L. monocytogenes* LM 5 (In't Veld *et al.*, 1995). After dissolution of the capsules, the milk aliquots were transferred to half-Fraser broth (225 ml) and incubated for 24 h at 37°C. Aliquots (1 ml and 0.1 ml) of these cultures were transferred to full Fraser broth (9 ml and 9.9 ml, respectively) and incubated for a further 18 h at 37°C. Samples were withdrawn from the half-Fraser enrichment cultures for testing in the ELISA after 42 h incubation, and from the full Fraser transfer cultures after 18 h incubation (i.e. 42 h after initiation of the procedure). Viable counts were also performed on the full Fraser cultures at the same time by plating a dilution series to Oxford agar (Merck, Darmstadt, Germany).

RESULTS

Cell Extract

Extraction from 2 L of *L. monocytogenes* culture by the method of Muller *et al.* (1998) yielded about 15 mg lyophilized product, containing about 52% protein. SDS-PAGE of this extract showed (Figure 1) a major band close to the expected molecular weight (65 kDa) of internalin B. The pattern obtained was almost identical to that in the original publication

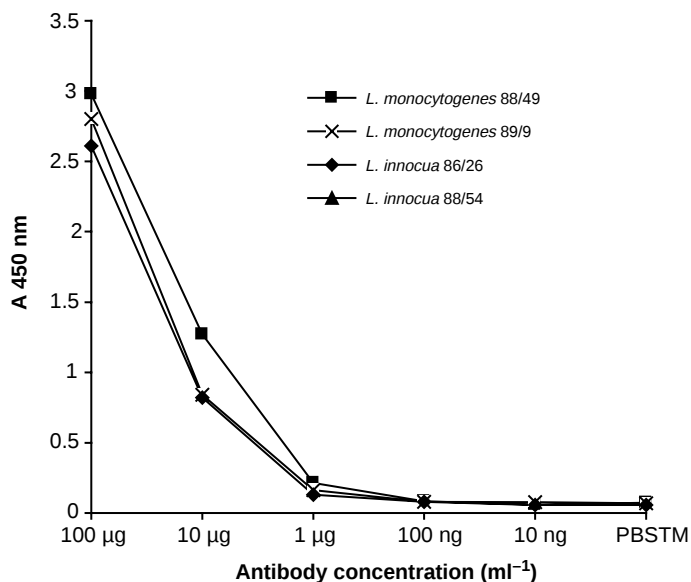


FIG. 2. ELISA titre of protein A-purified IgG on immobilized cells of *Listeria*.

(Figure 1, track 5; Muller *et al.*, 1998). In that study, N-terminal sequencing showed the 65 KDa band to be internalin B. Additional minor bands are also visible, which may be degradation products of this protein (Lingnau *et al.*, 1995).

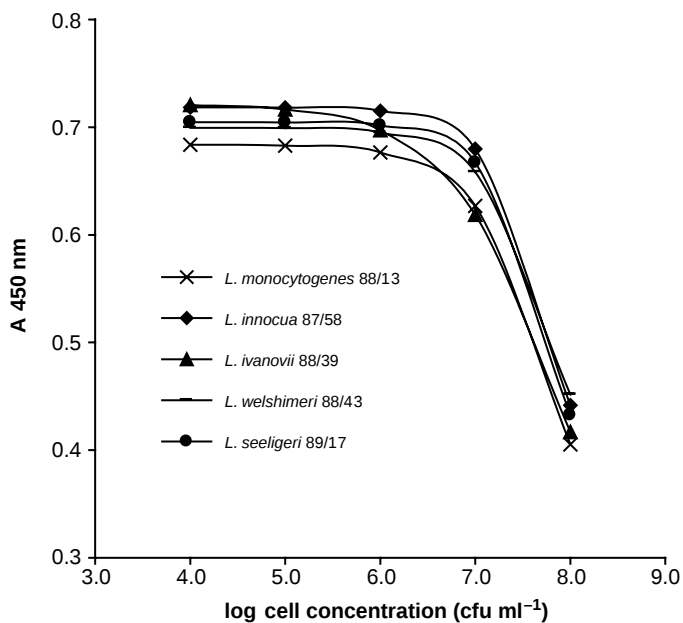


FIG. 3. Indirect competitive ELISA for *Listeria*.

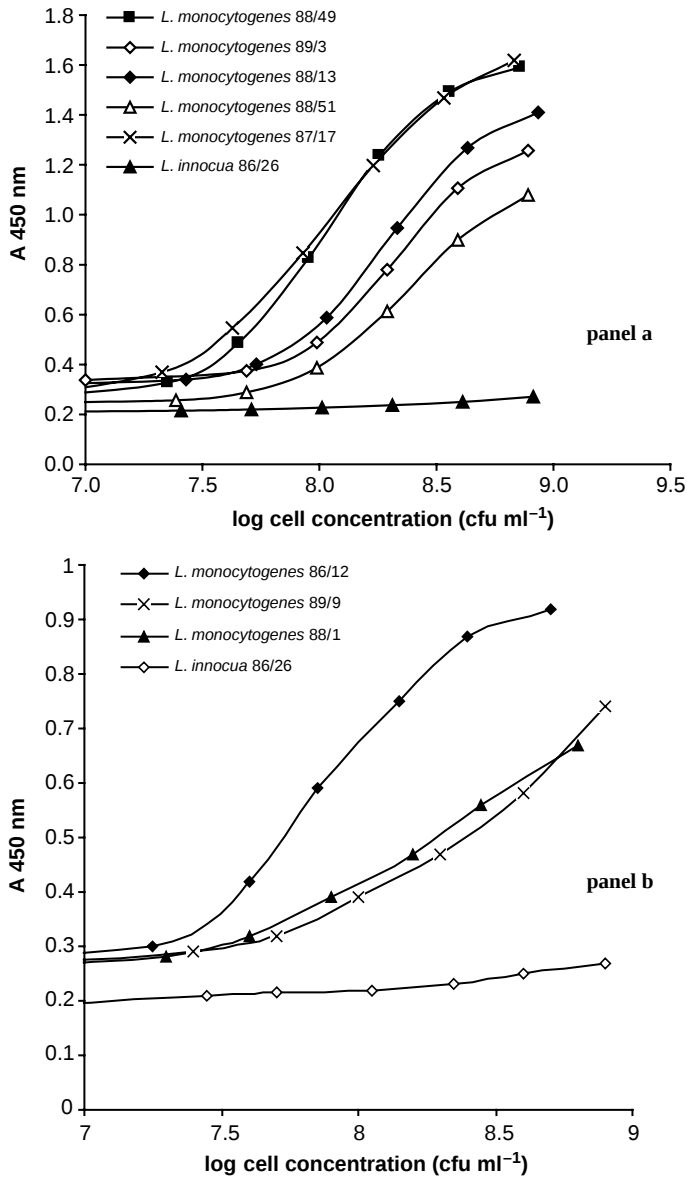


FIG. 4. Direct sandwich ELISA for *Listeria*: response of *L. monocytogenes* strains.

ELISA Development

When titrated against immobilized cells of *L. monocytogenes* and, as a control, *L. innocua* (Figure 2), the protein A-purified IgG recognized both species. Similarly, in the indirect competitive ELISA format, *L. monocytogenes* and other species of *Listeria* were recognized almost equally (Figure 3).

However, the direct sandwich ELISA format proved to be specific for *L. monocytogenes*. All *L. monocytogenes* strains tested interacted (with some strain-to-strain variation) with the antibody in this format (Figure 4a, b). The assay was reproducible (Figure 5a, b), with CVs

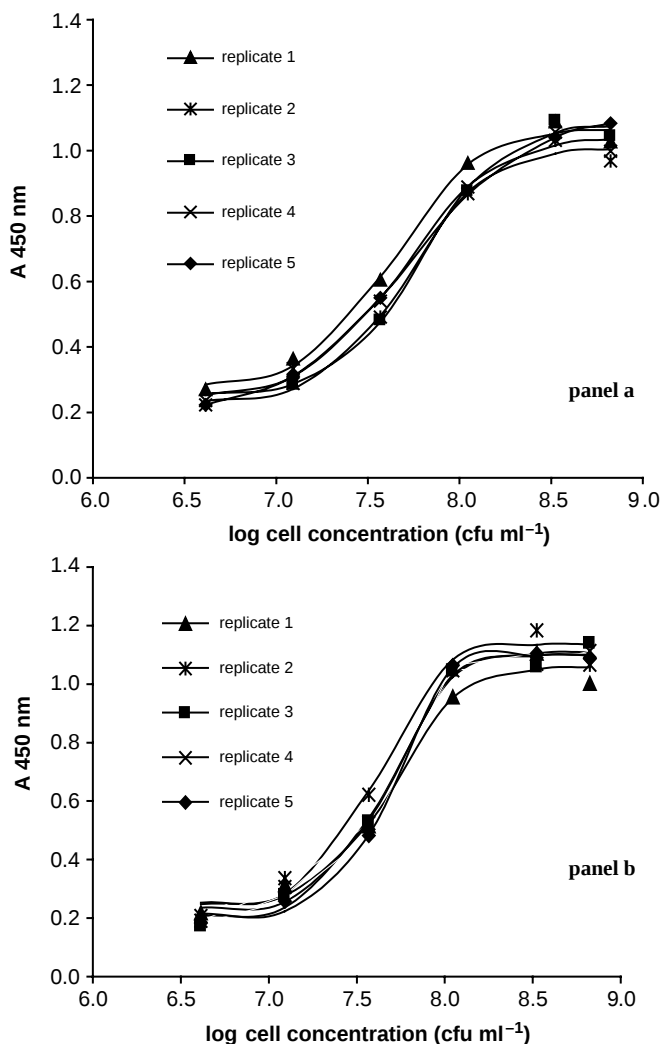


FIG. 5. Reproducibility of the standard curve for the direct sandwich ELISA: (a) five replicates of one dilution series of *L. monocytogenes* 88/49 (means of triplicate values; see Table 3 for coefficients of variation). (b) five independent dilution series of *L. monocytogenes* 88/49 (means of triplicate values; see Table 3 for coefficients of variation).

only marginally exceeding 10% at the lowest cell concentrations (Table 3). The sensitivity (minimum detectable level) of the assay for *L. monocytogenes* was found to be $\log_{10}$ 6.37 cfu ml⁻¹ (Figure 6a) when tested in pure culture. No difference was seen in the shape of the curve when *L. monocytogenes* was assayed in the presence of high numbers of five other *Listeria* species (*innocua*, *seeligeri*, *grayi*, *ivanovii*, *welshimeri*; Figure 6b). These other *Listeria* species, including *L. innocua*, showed no reactivity in the assay, even at high cell concentrations (Figure 7), nor did other organisms likely to be present in food samples (Figure 8).

To simplify further the work of a routine laboratory, it would be helpful if it were possible to use heat-treated samples. Two *L. monocytogenes* strains were cultured in Fraser broth (18 h at 37°C) as the selected enrichment medium, and samples heat-treated (76°C, 7 min)

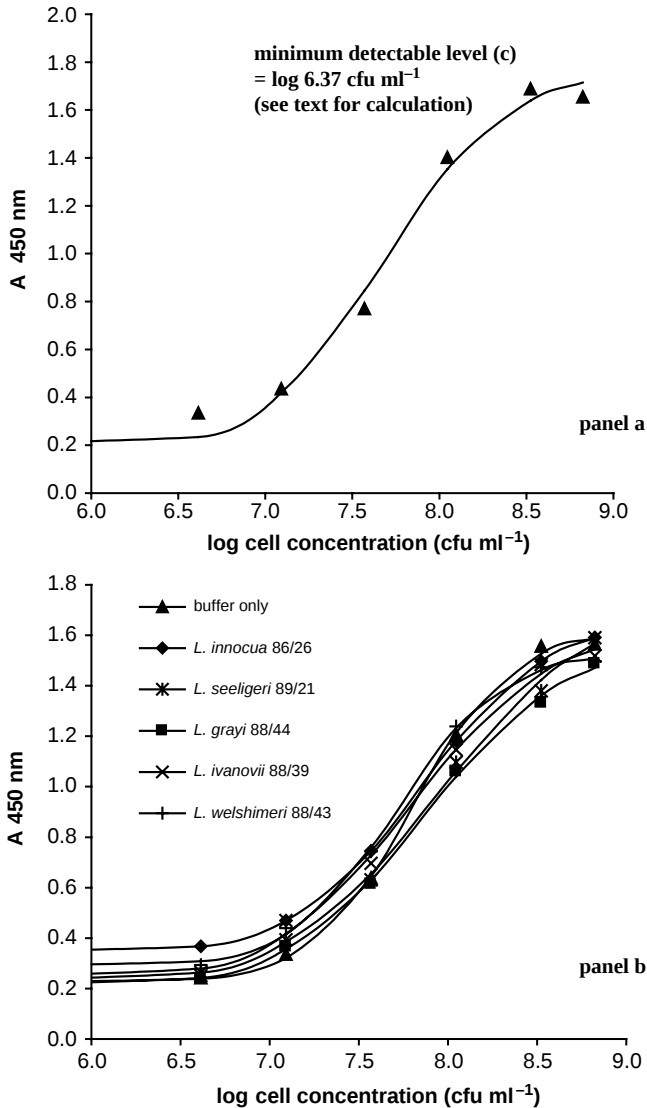


FIG. 6. Sensitivity of the direct sandwich ELISA: (a) *L. monocytogenes* 88/49 in pure culture, diluted in buffer (means of duplicate values). (b) *L. monocytogenes* 88/49, diluted in suspensions of other *Listeria* species held at a fixed concentration of approx. $\log_{10} 8.0$ (means of duplicate values).

before testing in the sandwich ELISA. Figure 9 shows that cells heat-treated in these conditions are not recognized in the *L. monocytogenes*-specific ELISA, and thus it is necessary to work with unheated samples.

Application of the Assay to Milk Samples

When the sandwich ELISA was applied to milk samples inoculated with *L. monocytogenes* reference material, there was a strong response to the half-Fraser enrichment cultures (Figure 10). When aliquots of the enrichment cultures were transferred to full Fraser broth,

TABLE 3. Signal coefficient of variation for the sandwich ELISA: standard curves for *L. monocytogenes* 88/49 in buffer

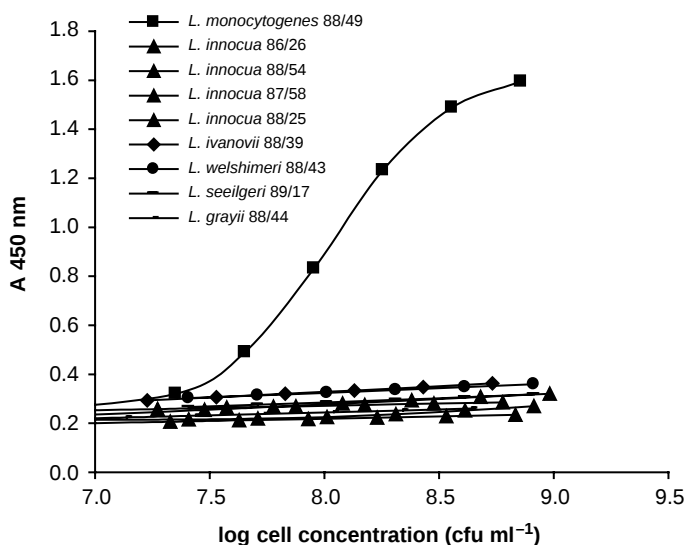
Log ₁₀ cell concentration (cfu ml ⁻¹)	Coefficient of variation (%) ¹	
	Five replicates of one dilution series	Five independent dilution series
8.82	4.29	4.86
8.52	2.59	4.46
8.05	4.74	4.76
7.57	9.32	9.77
7.09	10.52	10.36
6.61	9.37	9.34

only one of ten cultures (derived from five replicate inoculations) was not subsequently detectable by the ELISA (Figure 10); the viable count in this culture (sample G5; Table 4) was below the expected detection limit of the assay.

DISCUSSION

We report here the development of a *L. monocytogenes*-specific microplate ELISA. The assay clearly distinguishes the pathogenic *L. monocytogenes* species from the closely-related non-pathogenic species *L. innocua*, and from the other *Listeria* species. It was developed by using an antibody raised to a cell extract prepared with a method (Muller *et al.*, 1998) designed to extract internalin B, a protein associated with the virulence of *L. monocytogenes*.

Other workers have raised antibodies to *Listeria* but, in general, these have been either genus- or non-*L. monocytogenes*-specific (Farber & Speirs, 1987; Loiseau *et al.*, 1995; Butman *et al.*, 1998; Wieckowska-Szakiel *et al.*, 2002; Bhilegaonkar *et al.*, 2003), specific to a sub-group of *L. monocytogenes* (Kathariou *et al.*, 1994; Nannapaneni *et al.*, 1998a,b;

FIG. 7. Direct sandwich ELISA for *Listeria*: response of other *Listeria* species.

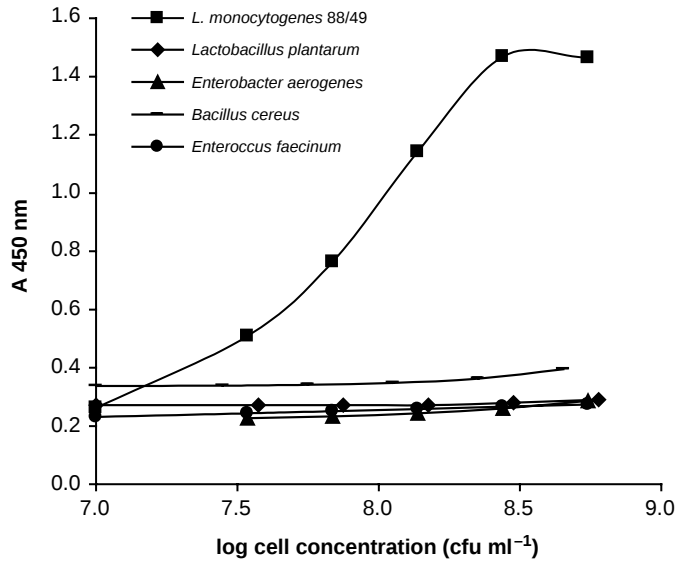


FIG. 8. Cross reactivity of the *L. monocytogenes*-specific sandwich ELISA against non-listeria species.

Erdenlig *et al.*, 1999), or recognize soluble but not cell-associated antigens (Bubert *et al.*, 1994).

A number of antibodies to *Listeria* have been incorporated in commercially-available test kits, but these have either been designed to detect the genus *Listeria* as a whole, or have proved not to be specific to, or detect all strains of, *L. monocytogenes* when validation trials

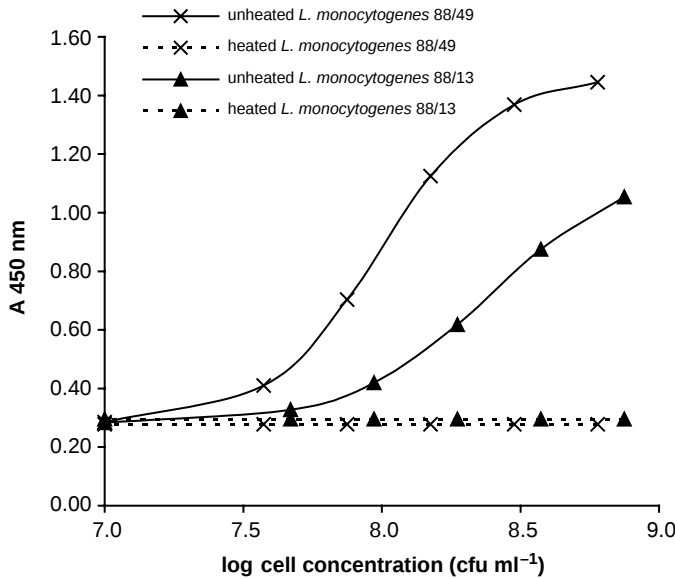


FIG. 9. Effect of heat-treatment on reactivity of *L. monocytogenes* in the sandwich ELISA.

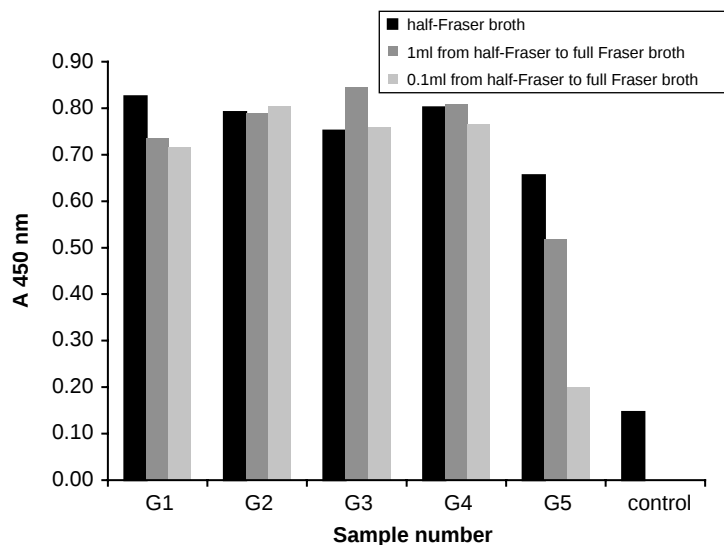


FIG. 10. Sandwich ELISA response to growth of *L. monocytogenes* from milk inoculated with reference capsules (half-Fraser enrichment culture; full Fraser transfer cultures).

have been carried out (e.g. Knight *et al.*, 1996; Kerdahi & Istafanos, 1997; Cantoni *et al.*, 1998; Vaz-Velho *et al.*, 2000; Capita *et al.*, 2001).

With our new antibody, a competitive ELISA format did not demonstrate specificity for *L. monocytogenes* (Figure 3), but the sandwich assay format was quite different, exhibiting a marked specificity for this species, with no recognition of other *Listeria* species or the other genera tested (Figures 4, 6–8). The reason for the difference in specificity between the two formats is not clear, but may be connected to changes in antigen presentation when the *Listeria* cells are immobilized (in the competitive format) compared to free cells (in the sandwich format). Alternatively, the different antibody binding kinetics in the two formats may influence specificity. We also found previously, in the case of haptens, that the specificity of an ELISA can be affected markedly by the format, especially by the nature of the

TABLE 4. Viable counts (Oxford agar) of *L. monocytogenes* in Fraser broth 18 h after transfer from enrichment culture of reference capsules in milk

Sample number	cfu ml ⁻¹
G1 (1 ml transfer)	7.25×10^8
G1 (0.1 ml transfer)	6.75×10^8
G2 (1 ml transfer)	8.5×10^8
G2 (0.1 ml transfer)	1.01×10^9
G3 (1 ml transfer)	9.42×10^8
G3 (0.1 ml transfer)	6.94×10^8
G4 (1 ml transfer)	8.2×10^8
G4 (0.1 ml transfer)	7.06×10^8
G5 (1 ml transfer)	5.81×10^8
G5 (0.1 ml transfer)	5.0×10^4

solid-phase (Spinks *et al.*, 2002). We have not, however, previously noticed this phenomenon with large analytes, such as bacterial cells.

The minimum detectable level of the sandwich ELISA for *L. monocytogenes* was about $\log_{10} 6.37 \text{ cfu ml}^{-1}$ (Figure 6a). Although it is clear that better sensitivity would be useful, it is not currently envisaged that this assay (nor any similar rapid method) would be used directly on food samples. It is likely that the common requirement to detect one cell in 25 g of food will always need an enrichment culture before the end-point detection test is applied. However, if the assay sensitivity could be improved, this might allow a reduction in incubation time for the enrichment. Remarkably, the specificity and sensitivity of the sandwich ELISA was maintained when tested in the presence of high numbers of the other *Listeria* species, including the closely related *L. innocua* (Figure 6b).

Strain-to-strain variation in the extent of binding of *L. monocytogenes* in the sandwich ELISA was noted, presumably due to variation in expression of the surface protein(s) recognized by the antibody. Investigation of the media and culture conditions necessary to reduce this variation, and produce a more even ELISA response, is underway.

If the new antibody is binding to internalin B, then it is a little surprising that the sandwich assay does not seem to recognise *L. ivanovii*, which possesses the related virulence-associated internalins, i-InlE and i-InlF (Engelbrecht *et al.*, 1998). Although homology between internalin B and the i-internalins of *L. ivanovii* is not high, nevertheless there are areas of overlap to which a polyclonal antibody raised to an extract containing internalin B from *L. monocytogenes* might be expected to bind. However, the band of approximately 65 kDa found in *L. monocytogenes* (Figure 1), which is presumed to be internalin B, did not appear in the *L. ivanovii* strains tested here (data not shown). It seems that internalin B production may be variable in *L. ivanovii*, or that our strains have become attenuated. A definitive study of the binding of our new antibody to proteins found in *Listeria* species will be published elsewhere.

As an initial validation of the new assay with food samples, it was applied to the separate stages of (an extended version of) the ISO two-step Fraser broth enrichment method. The half-Fraser broth primary enrichment cultures of milk samples (artificially-inoculated at about 0.2 cfu ml^{-1} using reference capsules) were examined directly in the ELISA and all showed good responses after 42 h incubation (Figure 10). It is possible, therefore, that half-Fraser broth may be useful as a sole cultural stage in this detection procedure. Although in some preliminary experiments with *L. monocytogenes* 88/49 (data not shown) we had found that the first significant ELISA signal occurred in half-Fraser broth after 24 h, it was decided to continue incubation until 42 h to ensure that more weakly-responsive *L. monocytogenes* strains would be detectable; the strength of the ELISA response for the half-Fraser broths may, after further investigation, enable this incubation time to be reduced.

Use of the secondary (full Fraser broth) stage in the two-step enrichment system was, in fact, of no advantage with these milk samples, and one of the ten full-Fraser cultures (which were transferred from the half-Fraser broths at two different dilution ratios after 24 h incubation) was actually negative by the ELISA (Figure 10), despite its 'parent' half-Fraser culture being positive. Therefore, in the situation described here, primary enrichment of the milk samples was sufficient alone to provide an ELISA-positive sample; of course, with samples containing a background flora, the secondary enrichment stage may be still be necessary.

Our ELISA may prove useful as a rapid diagnostic for *L. monocytogenes* in food. The next stage is to validate it with other relevant food samples. Currently, we are developing a dipstick version of the microplate sandwich ELISA, and this will be reported separately.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Union (INCO-COPERNICUS project PL 979012) and the Grant Agency of the Czech Republic (number 525/03/0350).

REFERENCES

- BHILEGAONKAR, K. N., BACHHIL, V. N., KUMAR, A. & AGARWAL, R. K. (2003) Rapid identification of *Listeria monocytogenes* by cell surface protein based indirect ELISA. *Indian Journal of Animal Sciences*, **73**, 3–8.
- BRAUN, L. & COSSART, P. (2000) Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes and Infection*, **2**, 803–811.
- BUBERT, A., SCHUBERT, P., KOEHLER, S., FRANK, R. & GOEBEL, W. (1994) Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3120–3127.
- BUTMAN, B. T., PLANK, M. C., DURHAM, R. J. & MATTINGLY, J. A. (1998) Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1564–1569.
- CANTONI, C., GIUSSANI, A. & COCOLIN, L. (1998) Identification of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. with a new ELISA sandwich. *Industria Alimentari*, **37**, 176–177.
- CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., MORENO, B. & GARCIA-FERNANDEZ, M. C. (2001) Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, **65**, 75–82.
- ENGELBRECHT, F., DOMINGUEZ-BERNAL, G., HESS, J., DICKNEITE, C., GREIFFENBERG, L., LAMPIDIS, R., RAFFELSBAUER, D., DANIELS, J. J. D., KREFT, J., KAUFMANN, S. H. E., VAZQUEZ-BOLAND, J.-A. & GOEBEL, W. (1998) A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Molecular Microbiology*, **30**, 405–417.
- ERDENLIG, S., AINSWORTH, A. J. & AUSTIN, F. W. (1999) Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2827–2832.
- FARBER, J. M. & PETERKIN, P. I. (2000) *Listeria monocytogenes*, in *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Volume II (LUND, B. M., BAIRD-PARKER, T. C. & GOULD, G. W., Eds), Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, pp. 1178–1232.
- FARBER, J. M. & SPEIRS, J. I. (1987) Monoclonal antibodies directed against the flagellar antigens of *Listeria* spp. and their potential in EIA-based methods. *Journal of Food Protection*, **50**, 479–484.
- GLASER, P. and 55 others (2001) Comparative genomics of *Listeria* species, *Science*, **294** (5543), 849–852.
- IN'T VELD, P. H., NOTERMANS, S. H. W. & VAN DE BERG, M. (1995) Potential use of microbiological reference materials for the evaluation of reference methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors: a collaborative study. *Food Microbiology*, **12**, 125–132.
- ISO (1996) *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method*. ISO 11290-1:1996 Geneva, Switzerland, International Organisation for Standardisation.
- KARPINSKI, K. F. (1990) Optimality assessment in the enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Biometrics*, **46**, 381–390.
- KATHARIOU, S., MIZUMOTO, C., ALLEN, R. D., FOK, A. K. & BENEDICT, A. A. (1994) Monoclonal antibodies with a high degree of specificity for *Listeria monocytogenes* serotype 4b. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3548–3552.
- KERDAHI, K. F. & ISTAFANOS, P. F. (1997) Comparative study of colorimetric and fully automated enzyme-linked immunoassay system for rapid screening of *Listeria* spp. in foods. *Journal of AOAC International*, **80**, 1139–1142.
- KNIGHT, MICHAEL T., NEWMAN, M. C., BENZINGER, M. J., AGIN, J. R., ASH, M., SIMS, P. & HUGHES, D. (1996) TECRA *Listeria* Visual Immunoassay (TLVIA) for detection of *Listeria* in foods: Collaborative study, *Journal of AOAC International*, **79**, 1083–1094.
- LINGNAU, A., DOMANN, E., HUDEL, M., BOCK, M., NICTERLEIN, T., WEHLAND, J. & CHAKRABORTY, T. (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infection and Immunity*, **64**, 3896–3903.
- LOISEAU, O., COTTIN, J., ROBERT, R., TRONCHIN, G., MAHAZA, C. & SENET, J. M. (1995) Development and characterization of monoclonal antibodies specific for the genus *Listeria*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **11**, 219–230.
- MCLAUCHLIN, J. & JONES, D. (1998) *Erysipelothrix* and *Listeria*, in *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Volume 2: Systematic Bacteriology (Balows, A. & Duerden, B. I., Eds.), Arnold, London, UK, pp. 683–708.
- MULLER, S., HAIN, T., PASHALIDIS, P., LINGNAU, A., DOMANN, E., CHAKRABORTY, T. & WEHLAND, J. (1998) Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infection and Immunity*, **66**, 3128–3133.
- NANNAPANENI, R., STORY, R., BHUNIA, A. K. & JOHNSON, M. G. (1998a) Unstable expression and thermal instability of a species-specific cell surface epitope associated with a 66-kilodalton antigen recognized by

- monoclonal antibody EM-7G1 within serotypes of *Listeria monocytogenes* grown in nonselective and selective broths. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3070–3074.
- NANNAPANENI, R., STORY, R., BHUNIA, A. K. & JOHNSON, M. G. (1998b) Reactivities of genus-specific monoclonal antibody EM-6E11 against *Listeria* species and serotypes of *Listeria monocytogenes* grown in non-selective and selective enrichment broth media. *Journal of Food Protection*, **61**, 1195–1198.
- SPINKS, C. A., WYATT, G. M., EVEREST, S., JACKMAN, R. & MORGAN, M. R. A. (2002) A typical antibody specificity: advancing the development of a generic assay for sulphonamides using heterologous ELISA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 428–434.
- VAZ-VELHO, M., DUARTE, G. & GIBBS, P. (2000) Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. *Journal of Microbiological Methods*, **40**, 147–151.
- WIECKOWSKA-SZAKIEL, M., BUBERT, A., ROZALSKI, M., KRAJEWSKA, U., RUDNICKA, W. & ROZALSKA, B. (2002) Colony-blot assay with anti-p60 antibodies as a method for quick identification of *Listeria* in food. *International Journal of Food Microbiology*, **72**, 63–71.

Martina Blažková · Ludmila Karamonová ·
Mária Greifová · Ladislav Fukal · Ignác Hoza ·
Pavel Rauch · Gary Wyatt

Development of a rapid, simple paddle-style dipstick dye immunoassay specific for *Listeria monocytogenes*

Received: 23 November 2005 / Revised: 12 January 2006 / Accepted: 19 January 2006 / Published online: 28 March 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract We have developed two types of new paddle-style dipstick dye immunoassays. The first is genus *Listeria* specific and the second is specific to *Listeria monocytogenes*. They are based respectively, on antisera raised against heat-killed *L. monocytogenes* cells and against internalin B crude extract, a virulence protein found only in the pathogenic *L. monocytogenes*. The minimum detectable level for *L. monocytogenes* is 2×10^7 CFU ml⁻¹ for strain number 88/049 in pure culture. Detection is unaffected by the presence of high numbers (approximately log 8.0 CFU/ml) of the other microorganisms tested. When the dipsticks were applied to milk samples inoculated with *L. monocytogenes* reference material (ALM92), there was a strong response to the enrichment cultures. The new assay may prove useful in detection of *L. monocytogenes* in enrichment cultures of milk and ice cream food samples.

Keywords Dipstick immunoassay · *Listeria monocytogenes* · Milk · Ice cream

Introduction

Listeria monocytogenes is a food-borne pathogen found in dairy products, meat (including poultry and fish) and,

to a lesser extent, in vegetables (for a review, see [1]). Chilled ready-to-eat foods are a particular concern because the organism can grow at refrigeration temperatures. The principal control measure is an effective quality assurance system, nowadays usually involving hazard analysis critical control point (HACCP) methods. For such a system to be successful, environmental and production line sampling is needed [1]. However, traditional microbiological methods are time consuming and expensive and thus discourage extensive sampling. Rapid diagnostic tests can simplify test procedures and make increased sampling a realistic possibility. However, if false-positive test results are to be avoided, the methods must be specific for *L. monocytogenes* and should not react either with non-pathogenic *Listeria* species or with other unrelated bacteria. This is essential if the confidence of the food industry and the regulatory bodies in rapid diagnostic methods is to be achieved.

The most user friendly rapid methods are those based on antibodies, and such tests can be formatted in many ways, the most common being methods based on 96-well microplate technology. This format is excellent when multiple samples are to be tested at the same time, and the test can take place in a laboratory, but there are occasions when a 'one-off' test is required, possibly in a situation outside the laboratory. Thus, a simple test that requires no laboratory-based equipment might prove very useful in such situations.

L. monocytogenes has a complex pathogenicity mechanism, with several virulence factors that allow infection to spread by direct cell-to-cell transmission. Although some *L. monocytogenes* virulence proteins have homologs in many other *Listeria* species, the internalin protein family (which mediates entry to host cells) is found only in *L. monocytogenes* and the animal pathogen *L. ivanovii*. Thus, these proteins offer a potential target for *L. monocytogenes*-specific diagnostic methods.

Previously [2], we reported the development of a microplate-based ELISA that is specific for *L. monocytogenes*, based on a polyclonal antibody raised to an extract of internalin. In this paper, we describe the development of dye immunoassays for listeriae based on dipsticks which,

M. Blažková (✉) · L. Karamonová · L. Fukal · P. Rauch
Department of Biochemistry and Microbiology,
Institute of Chemical Technology,
Technická 5,
166 28 Prague, Czech Republic
e-mail: martina.blazkova@vscht.cz

M. Greifová
Slovak Technical University,
Bratislava, Slovakia

I. Hoza
Tomas Bata University in Zlín,
762 72 Zlín, Czech Republic

G. Wyatt
Institute of Food Research, Norwich Research Park,
Norwich, NR4 7UA, UK

for some analytical purposes, may offer a more convenient assay format than microplates. The dipsticks use either the polyclonal antibodies reported in the previous work or another anti-*Listeria* antibody with a different specificity range.

Materials and methods

Cultures

Bacteria strains used in the experiments are shown in Table 1. Cultures were maintained on Petri plates of Oxford agar (Oxoid) at 4 °C.

Enrichment procedure

For preparation of calibration curves and cross reactivity experiments, cultures were grown in 10 ml Fraser Broth Base (Oxoid) when antibody against virulence protein internalin B was used, and *Listeria* Enrichment Broth Base (LEB Oxoid) when antibody against dead *L. monocytogenes* cells was used, respectively at 37 °C for 18 h.

For an initial evaluation of the dipstick immunoassay, reference capsules [3] were used to inoculate milk samples (UHT commercially produced milk). Three separate aliquots (25 ml) of sterile milk were each inoculated with

Table 1 Strains of bacteria used

Species	Strain number	Origin
<i>Listeria monocytogenes</i>	ALM 92	Reference material
<i>Listeria monocytogenes</i>	88/049	NCTC 4886
<i>Listeria monocytogenes</i>	86/010	NCTC 4885
<i>Listeria monocytogenes</i>	88/013	Milk from IFR
<i>Listeria innocua</i>	88/025	Salad from IFR
<i>Listeria ivanovii</i>	88/039	PHLS
<i>Listeria welshimeri</i>	88/043	NCTC 11857
<i>Listeria seeligeri</i>	89/017	ATCC 35967
<i>Listeria grayi</i>	88/049	NCTC 10815
<i>Bacillus cereus</i> 99/G		Milk at STU
<i>Enterobacter cloacae</i> 92/H		Cabbage at STU
<i>Enterococcus faecalis</i>		CCM 2308
<i>Lactobacillus plantarum</i>		CCM 7039

one gelatin reference capsule, containing approximately 5 CFU *L. monocytogenes* ALM 92 [3]. After dissolution of the capsules, the milk aliquots were transferred to half Fraser broth (225 ml) and incubated for 24 h at 37 °C. Aliquots (1 ml) of these cultures were transferred to full Fraser broth (9 ml) for use with dipsticks prepared with antibody against virulence protein internalin B, and to full *Listeria* Enrichment Broth Base (9 ml) for use with dipsticks prepared with antibody against dead *L. monocytogenes* cells, and incubated for a further 18 h at 37 °C. Samples

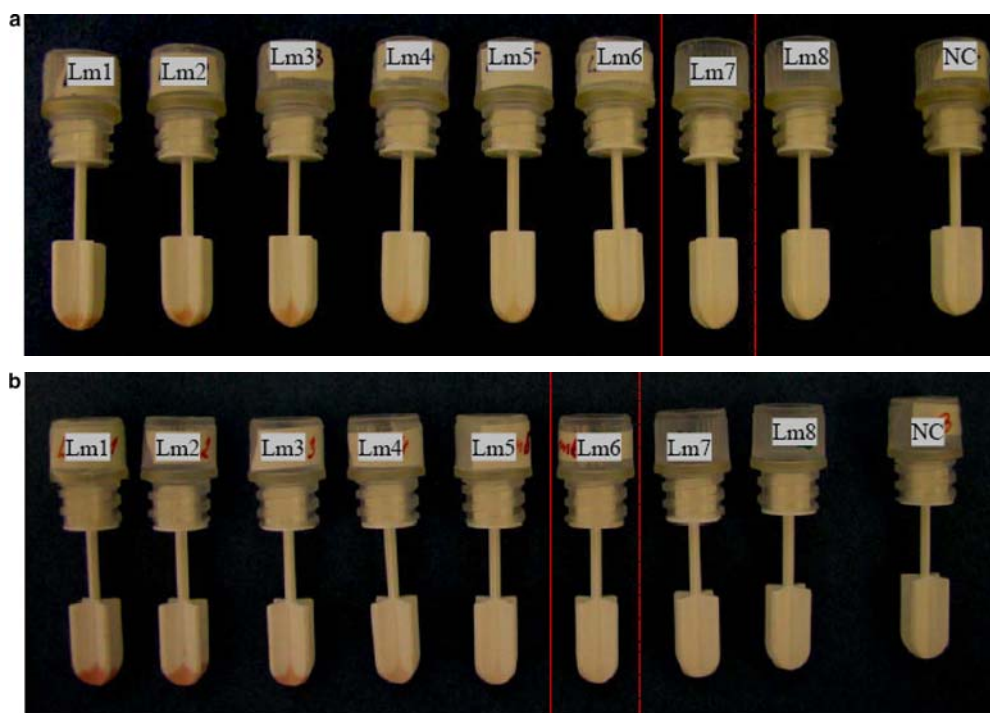


Fig. 1 **a** Semi-quantitative range for dipstick technology with antibody against *Listeria monocytogenes* dead cells (Ab/Lm). Two-fold dilution: $c_{Lm1} = 1.8 \times 10^8$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm2} = 9 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm3} = 4.5 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm4} = 2.3 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm5} = 1.1 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm6} = 5.6 \times 10^6$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm7} = 2.8 \times 10^6$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm8} = 1.4 \times 10^6$ CFU ml⁻¹. **b** Semi-quantitative range for dipstick technology with antibody

against internalin B (Ab/InlB). Two-fold dilution: $c_{Lm1} = 6.3 \times 10^8$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm2} = 3.1 \times 10^8$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm3} = 1.6 \times 10^8$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm4} = 7.8 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm5} = 3.9 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm6} = 2 \times 10^7$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm7} = 9.8 \times 10^6$ CFU ml⁻¹, $c_{Lm8} = 4.9 \times 10^6$ CFU ml⁻¹. Lm, *Listeria monocytogenes* 88/049; NC, negative control (medium Fraser)

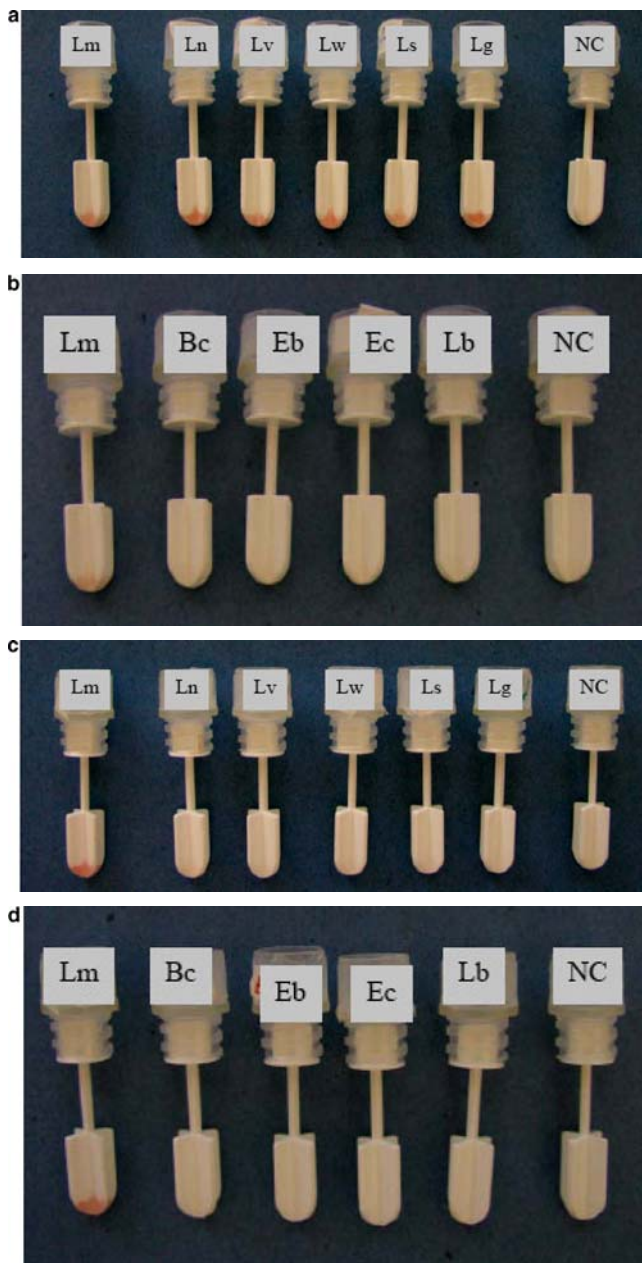


Fig. 2 a, b The evidence of genus *Listeria* dipstick specificity (Ab/Lm). c, d The evidence of *Listeria monocytogenes* dipstick specificity (Ab/InlB). Lm, *Listeria monocytogenes*; Ln, *Listeria innocua*; Lv, *Listeria ivanovii*; Lw, *Listeria welshimeri*; Ls, *Listeria seeligeri*; Lg, *Listeria grayi*; Bc, *Bacillus cereus*; Eb, *Enterobacter cloacae*; Ec, *Enterococcus faecalis*; Lb, *Lactobacillus plantarum*; NC, negative control (medium Fraser)

were withdrawn from the full Fraser and LEB transfer cultures after an 18 h incubation (i.e. 42 h after initiation of this procedure). Viable counts were performed on the full Fraser cultures at the same time by plating a dilution series on Brain Heart Agar (Oxoid).

Sample preparation

Flasks containing 45 ml of half Fraser and 5 ml of pasteurized milk and 5 g of chocolate ice cream, respectively,

were artificially contaminated with cells by adding 1 ml volumes of dilutions of overnight cultures in 0.9% (w/w) NaCl to obtain inoculum levels of 10^2 CFU ml⁻¹. After an overnight cultivation 1 ml aliquots of these cultures were transferred to 9 ml full Fraser broth, when antibody against virulence protein internalin B was used and to 9 ml LEB when antibody against dead *L. monocytogenes* cells was used. The exact inoculum level was controlled by plating on Brain Heart Agar (Oxoid) in duplicate. Prepared samples were incubated for 18 h at 37 °C and were then analysed by both types of dipstick (prepared with Lm antibody and InlB antibody, see later sections for definitions of these antibodies).

Immunoreagents

Preparation of antibodies

The preparation of internalin B, and the production, purification and labelling of the antibodies was described previously by Karamonova et al. [2]. The method of internalin B preparation was adapted from that of Muller et al. [4] using an over-producing *L. monocytogenes* clone (EGD pERL3 50-1, kindly donated by Dr. T. Chakraborty, Giessen, Germany [5]). Rabbits were immunised with either the InlB extract or dead cells of *L. monocytogenes* 88/013. Dead cells were prepared as follows. Cells were cultivated in Brain-Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid) for 24 h at 37 °C. The culture was centrifuged and the supernatant discarded. The pellet was re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS; 0.14 M NaCl, 0.0015 M KH₂PO₄, 0.008 M Na₂HPO₄, 0.0027 M KCl; pH 7.4) and pasteurized for 7 min at 72 °C.

IgG was purified from serum with an affinity column of protein A. All solutions and antisera were sterilized by membrane filtration. IgG fractions were lyophilised.

The IgG fraction of the serum raised against internalin B extract is subsequently referred to in this paper as “InlB antibody” and that one against dead *L. monocytogenes* cells as “Lm antibody”. Both IgG fractions were labelled with horseradish peroxidase using the Linx HRP Rapid Protein Conjugation Kit (Invitrogen BV, Groningen, The Netherlands).

Preparation of dipsticks

Dipsticks (Nunc-ImmunoTM Stick, Maxisorp, NuncTM) were coated (100 µl per tube) with antibody (Lm or InlB) in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, diluted to 1:200 (50 µg/ml) and incubated for 2 h at 37 °C. The dipsticks were washed four times in PBST (0.01 M phosphate buffer, containing NaCl 8 g l⁻¹, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4).

Mode of use

Milk and/or ice cream samples containing microorganisms, two times diluted in PBST + 5% (w/v) dried milk

Table 2 Detection of *Listeria monocytogenes* resp. genus *Listeria* by using specific dipstick in milk and chocolate ice cream contaminated by different microorganisms

Sample number		Bacteria strain	Results	
Milk	Chocolate ice cream		Milk	Chocolate ice cream
Ab/InlB				
A01	B01	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
A02	B02	<i>Listeria monocytogenes</i> 88/049	+	+
A03	B03	<i>Listeria monocytogenes</i> 86/010	+	+
A04	B04	<i>Listeria monocytogenes</i> 88/013	+	+
A05	B05	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria innocua</i> 88/025	+	+
A06	B06	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039	+	+
A07	B07	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria welshimeri</i> 88/043	+	+
A08	B08	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria seeligeri</i> 89/017	+	+
A09	B09	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria grayi</i> 88/049	+	+
A10	B10	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Bacillus cereus</i>	+	+
A11	B11	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
A12	B12	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+
A13	B13	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+
A14	B14	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria innocua</i> 88/025	+	+
		<i>Bacillus cereus</i>	+	+
A15	B15	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039	+	+
		<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+
A16	B16	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
		<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+
A17	B17	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria innocua</i> 88/025	+	+
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039	+	+
		<i>Listeria welshimeri</i> 88/043	+	+
		<i>Listeria seeligeri</i> 89/017	+	+
		<i>Listeria grayi</i> 88/049	+	+
A18	B18	Negative control	—	—
		<i>Bacillus cereus</i>	—	—
		<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—
		<i>Enterococcus faecalis</i>	—	—
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	—	—
		<i>Listeria innocua</i> 88/025	—	—
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039	—	—
		<i>Listeria welshimeri</i> 88/043	—	—
		<i>Listeria seeligeri</i> 89/017	—	—
		<i>Listeria grayi</i> 88/049	—	—
Ab/Lm				
A19	B19	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
A20	B20	<i>Listeria monocytogenes</i> 88/049	+	+
A21	B21	<i>Listeria monocytogenes</i> 86/010	+	+

Table 2 Continued

Sample number		Bacteria strain	Results	
Milk	Chocolate ice cream		Milk	Chocolate ice cream
A22	B22	<i>Listeria monocytogenes</i> 88/013	+	+
A23	B23	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria innocua</i> 88/025		+
A24	B24	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039		+
A25	B25	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria welshimeri</i> 88/043		+
A26	B26	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria seeligeri</i> 89/017		+
A27	B27	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria grayi</i> 88/049		+
A28	B28	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Bacillus cereus</i>		+
A29	B29	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Enterobacter cloacae</i>		+
A30	B30	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Enterococcus faecalis</i>		+
A31	B31	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Lactobacillus plantarum</i>		+
A32	B32	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria innocua</i> 88/025		+
		<i>Bacillus cereus</i>		+
A33	B33	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039		+
		<i>Enterococcus faecalis</i>		+
A34	B34	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Enterobacter cloacae</i>		+
		<i>Enterococcus faecalis</i>		+
		<i>Lactobacillus plantarum</i>		+
A35	B35	<i>Listeria monocytogenes</i> ALM 92	+	+
		<i>Listeria innocua</i> 88/025		+
		<i>Listeria ivanovii</i> 88/039		+
		<i>Listeria welshimeri</i> 88/043		+
		<i>Listeria seeligeri</i> 89/017		+
		<i>Listeria grayi</i> 88/049		+
A36	B36	Negative control	—	—
		<i>Bacillus cereus</i>		—
		<i>Enterobacter cloacae</i>		—
		<i>Enterococcus faecalis</i>		—
		<i>Lactobacillus plantarum</i>		—

(100 µl/tube), were added to the tubes containing the coated dipsticks and these were then incubated for 2 h at 37 °C. After the incubation, dipsticks were washed four times with PBST. Lm antibody–horseradish peroxidase conjugate, or InIB antibody–horseradish peroxidase conjugate, respectively, diluted 1:20 in PBST + 5% dried milk was added (100 µl/tube) and the tubes were then incubated for 2 h at 37 °C. After further washing with PBST (four times), 100 µl of freshly prepared AEC substrate (Sigma AEC-101) was added to each dipstick tube and incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by washing the dipstick with distilled water.

Results

Dipstick dye technique development

A new direct sandwich dipstick format for detection of listeriae in foods has been developed using either Lm antibody or InIB antibody as capture antibody. The same antibodies were used for the preparation of conjugate with horseradish peroxidase (InIB or Lm antibody horseradish peroxidase) and served as a detector molecule. The semi-quantitative range for the dipstick technology is shown in Fig. 1a and b. The detection limit for dipsticks

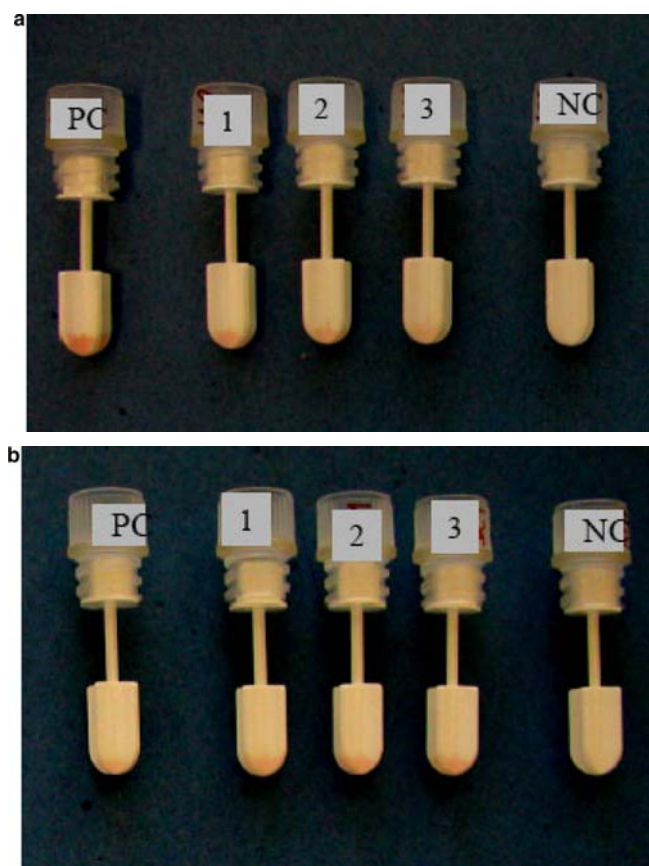


Fig. 3 **a** Genus *Listeria* dipsticks responses on reference material ALM 92, detection of 10^0 cells in 25 ml of milk (Ab/Lm). **b** Specific *Listeria monocytogenes* dipsticks responses on reference material ALM 92, detection of 10^0 cells in 25 ml of milk (Ab/InlB). PC, positive control (milk contaminated with 10^8 cells ALM 92 and cultivated the same way as samples); 1–3, sample numbers; NC, negative control (milk without contamination cultivated the same way as samples)

prepared with InlB antibody is 2×10^7 CFU ml $^{-1}$ and for those prepared with Lm antibody is 3×10^6 CFU ml $^{-1}$, for strain number 88/049 in pure culture.

The described dipstick has been tested for confirmation of a range of *Listeria* strains (Fig. 2a–d). By using the InlB antibody only *L. monocytogenes* positively interacts with the dipstick, showing the specificity of the assay. Figure 2c and d shows that the dipstick formats give a satisfactorily specific assay of *L. monocytogenes* cells with respect to other microorganisms tested. The InlB antibody was found to be specific to *L. monocytogenes* and did not bind possible food contaminating microflora. The representative microorganisms were collected from gram-positive, gram-negative, coccus and rods: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterobacter aerogenes*.

The dipstick prepared with Lm antibody interacts with all *Listeria* strains but not with other bacteria tested and thus was recognised as genus specific (Fig. 2a and b).

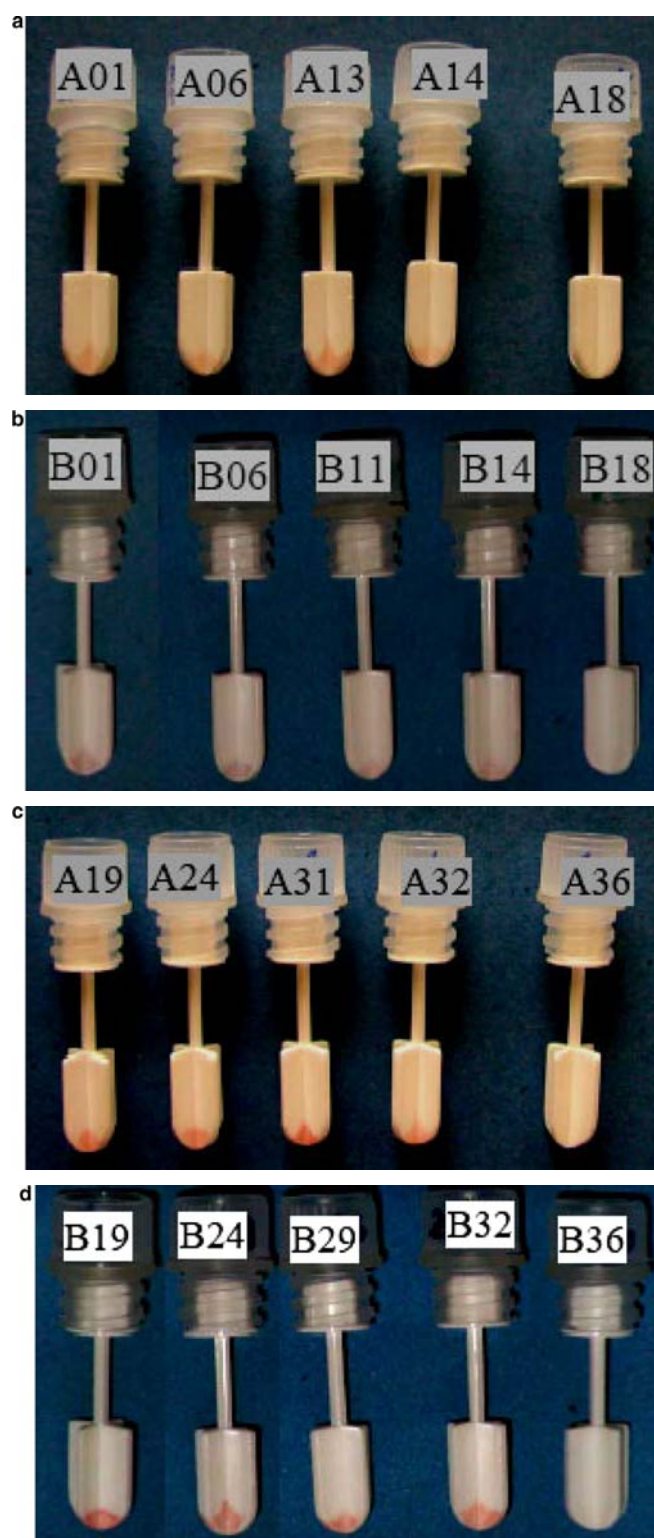


Fig. 4 Several examples of dipsticks illustrating Table 2. Examples of application of InlB antibody dipstick technique to milk (**a**) and ice cream (**b**) model samples contaminated by *L. monocytogenes*. Examples of application of Lm antibody dipstick technique to milk (**c**) and ice cream (**d**) model samples contaminated by *L. monocytogenes*

Application of the dipstick assay to milk samples contaminated with reference material (ALM92)

The developed dipstick techniques were finally verified by detection of *L. monocytogenes* in sterilised milk, contaminated with reference material ALM92, which contains approximately five cells of this microorganism. Three milk samples were cultivated in half Fraser medium. When the dipstick dye technology was applied to milk samples prepared by this procedure, there was a strong response to the enrichment cultures (Fig. 3a and b).

Application of dipstick technique to milk and ice cream model samples contaminated by *L. monocytogenes*

The results are summarised in Table 2 and some of them are also illustrated in Fig. 4a–d. *L. monocytogenes* was inoculated in the presence of other microorganisms and assayed by the developed dipstick method.

Table 2 and Fig. 4 also show that the dipstick format gives a satisfactorily specific assay of *L. monocytogenes* cells with respect to other microorganisms tested, when InlB antibody is used. The InlB antibody was thus found to be specific to *L. monocytogenes* and did not bind possible food contaminating microflora. The representative microorganisms were collected from gram-positive, gram-negative, coccus and rods: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterobacter aerogenes*.

Discussion

We report here the development of a *L. monocytogenes*-specific paddle-style dipstick dye immunoassay technique (see Fig. 2c and d) using polyclonal antibodies raised to *L. monocytogenes* cell preparation optimised for extraction of internalin B protein (InlB antibody). The assay, which clearly distinguishes the pathogenic *L. monocytogenes* species from the closely related non-pathogenic species *L. innocua* and from the other *Listeria* species, was developed only by targeting antibody production to internalin B, a protein associated with the virulence of *L. monocytogenes* (Fig. 2c and d).

Dipsticks prepared with Lm antibody recognised all tested strains of the genus *Listeria* (Fig. 2a and b) and are thus not specific for *L. monocytogenes* but can be used generally for the detection of genus *Listeria*.

It was confirmed that the dipstick techniques developed are applicable for *L. monocytogenes* determination in 25 ml

of milk test samples, contaminated with low numbers of cells (approximately five) of a *L. monocytogenes* strain, even though the conditions of preparation and maintenance of samples for inoculation were less optimal (freeze-dried cells in capsules versus fresh culture in culture medium used in previous experiments). In all, six capsules gave positive reactions for the presence of *L. monocytogenes* by dipsticks (Fig. 3b). The adopted method, with inoculation of 1 ml sample (in half Fraser) to 9 ml of Full Fraser, is applicable for detection of *L. monocytogenes* at concentrations of 10^0 per tested sample.

It is not currently envisaged that immunoassay (not any similar rapid method) would be used directly on food samples; it is likely that the common requirement to detect one cell in 25 g of food will always need an enrichment culture before the end-point detection test is applied. However, if the assay sensitivity could be improved, this might allow a reduction in incubation time for the enrichment. Remarkably, the specificity and sensitivity of the developed *L. monocytogenes*-specific dipstick was maintained when tested in the presence of high numbers of other *Listeria* species, including the closely related *L. innocua* and other possible microbial food contaminants (Table 2 and Fig. 4).

Strain-to-strain variation in the extent of binding of *L. monocytogenes* in the dipstick detection was noted, presumably due to variation in surface protein expression, but this feature does not influence the detection of *L. monocytogenes* in tested samples.

Our dipsticks may thus prove useful as a rapid diagnostic for *L. monocytogenes* in milk and ice cream samples; the next stage is to validate it with other relevant food samples.

Acknowledgement This work was supported by the Czech Grant Agency, No. 525/03/0350 and by Ministry of Education, Grant No. MSM 6046137305.

References

1. Farber JM, Peterkin P (2000) *Listeria monocytogenes*. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW (eds) The microbiological safety and quality of food, vol II. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, pp 1178–1232
2. Karamonová L, Blažková M, Fukal L, Rauch P, Greifová M, Horáková K, Tomáška M, Roubal P, Brett GM, Wyatt GM (2003) Food Agric Immunol 15:167–182
3. Loiseau O, Cottin J, Robert R, Tronchin G, Mahaza C, Senet JM (1995) FEMS Immunol Med Microbiol 11:219–230
4. Muller S, Hain T, Pashalidis P, Lingnau A, Domann E, Chakraborty T, Wehland J (1998) Inf Immunol 66:3128–3133
5. Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, Chakraborty T (1995) Inf Immunol 64:3896–3903

Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in food

Martina Blažková · Marjo Koets · Pavel Rauch ·
Aart van Amerongen

Received: 15 January 2009 / Revised: 26 June 2009 / Accepted: 8 July 2009 / Published online: 15 August 2009
© The Author(s) 2009. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract We present a new nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for the assessment of listeria contamination. The detection procedure starts with enrichment of sample in Half Fraser broth (24 h). Following isolation of DNA, a duplex PCR is performed with two labelled primer sets, one generic and directed to a specific sequence of the gene encoding 16S rRNA from *Listeria* spp. and the other specific and directed to a part of the *prfA* gene encoding the central virulence gene regulator from the food pathogen *Listeria monocytogenes* (3.5 h). The PCR solution is directly added to the one-step assay device and the appearance of a grey/black line is indicative of the presence of specific amplicons (max 15 min). In all tests performed, the method correctly identified *L. monocytogenes* and strains of *Listeria* spp. PCR material of over 20 food samples was tested by NALFIA. The method proved to be useful for the detection of *L. monocytogenes* in different kinds of food samples.

Keywords Food-borne pathogen · Immunochromatographic test · Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) · *Listeria monocytogenes* · Food · Nucleic acid testing · Nanoparticles

Introduction

Each year, millions of people become ill from food-borne diseases caused by *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* [1]. For example, only in EU in 2005, it was reported in nearly 400,000 cases [2]. The effective control of food safety can be improved by the detection of pathogenic microorganisms with rapid methods. These should be simple, cost effective, easy to interpret, and with sufficient sensitivity and specificity.

The genus *Listeria* comprises six recognized species: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ssp. *ivanovii* and *londoniensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, and *L. grayi*. *Listeria* can survive and grow over a wide range of environmental conditions [3]. This allows the listeria to overcome food preservation and safety barriers [4]. Although occurrence of *Listeria* strains in food may indicate errors in good hygienic and manufacturing practice, only *L. monocytogenes* is a significant human and animal pathogen, which is responsible for severe invasive disease, listeriosis [5, 6].

Outbreaks caused by *L. monocytogenes* have been associated with ingestion of a variety of contaminated foods and were reported from many countries, including Australia, Switzerland, France, and the United States [7–10].

The minimum infective dose of *L. monocytogenes* has not been established. According to the Commission Regulation No 1444/2007, the food law of European Union insists on the absence of *L. monocytogenes* (not detectable in 25 g of food product) in ready-to-eat foods intended for infants and for special medical purposes. The ready-to-eat foods, other than those mentioned before, may contain <100 cfu/g during their shelf life [11]. The standard isolation method for *L. monocytogenes* from food samples is described in ISO 11290-1 and 11290-2 [12]. Despite recent changes in ISO procedure, when application of modern

M. Blažková · P. Rauch
Department of Biochemistry and Microbiology,
Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5,
166 28 Prague 6, Czech Republic
e-mail: martina.blazkova@vscht.cz

M. Koets · A. van Amerongen (✉)
Biomolecular Sensing & Diagnostics, Agrotechnology & Food
Sciences Group, Wageningen University and Research Centre,
P.O. Box 17, 6700 AA Wageningen, The Netherlands
e-mail: aart.vanamerongen@wur.nl

chromogenic medium (Agar *Listeria* Ottavani & Agosti) was included [12, 13], the total procedure takes 5–7 days, which is not optimal for testing foods with short shelf lives.

With the goal to overcome problems associated with traditional microbiological methods such as being time consuming and labour intensive many new modern techniques have been developed. They are based on either chromogenic media [14–16], antibodies [17–19], or nucleic acid-based techniques [20, 21]. Identification of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* using nucleic acid testing is becoming increasingly popular. The major advantage of these nucleic acid-based techniques is the fact that specificity is based on genomic sequences and does not rely on the expression of particular antigens or enzymes. In addition, nucleic acid-based methods can be extremely sensitive and specific. A number of test kits for *Listeria* are commercially available [22, 23].

The aim of this study was to develop a rapid and sensitive nucleic acid method for detection of *L. monocytogenes* in particular and the genus *Listeria* in general, with a substantially reduced pre-enrichment phase. For the detection of amplicons, we used a one-step nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) [24]. In this method, a small volume of the final PCR solution is directly added to the one-step assay device and the appearance of a grey/black line is indicative of the presence of the specific amplicon. The visualization is mediated by using carbon nanoparticles. In the past years, nanoparticles were introduced as a detection tool in bioanalytics [25], which gives an alternative to conventional enzymatic or fluorescent labels, and enables easy and clear interpretation.

Materials and methods

Cultures

Strains of microorganisms used in the experiments are shown in Table 1. Cultures of *Listeria* and other bacteria were maintained on Petri plates of Oxford agar (Oxoid) or Brain Heart Infusion Agar (Oxoid), respectively at 4 °C. Prior to experiments, cultures were grown in 5 ml Fraser Broth Base (Oxoid) at 37 °C for 18 h.

Sample preparation

Model milk samples for verification of NALFIA were artificially contaminated with four different strains of *L. monocytogenes* (microbiological reference strain ALM 92 was tested in triplicate, *L. monocytogenes* NCTC 4886, *L. monocytogenes* NCTC 4885, and *L. monocytogenes* isolated from milk in the Institute of Food Research, Norwich, UK), two other *Listeria* subspecies (*L. innocua*, *L.*

ivanovii), and *Enterococcus faecalis*. Decimal dilutions of overnight cultures of all tested bacterial strains were prepared. One ml aliquots of the cultures containing less than 10 cells were inoculated into flasks containing 25 ml of sterilized milk. One non-contaminated milk sample was cultivated in the same way as a negative control.

The developed NALFIA was applied on real food samples which were prepared by the following procedure. Twelve food samples were collected from two supermarket chains, seven samples were obtained from one milk-producing biofarm in the Czech Republic, and five samples were part of internal lab trials.

All samples were cultivated according to the present standard isolation method for *L. monocytogenes* from food samples [12]. Flasks containing 225 ml of Half Fraser broth (Oxoid) were mixed with 25 ml or 25 g of food and incubated for 24 h at 37 °C whilst shaking. After this procedure, samples (1 ml) were used for DNA isolation. The results were confirmed by the standard isolation microbiological method with confirmation on chromogenic agar ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti, Bio-rad). Total bacterial counts in solutions used in this study were determined by plating on BHI agar (Oxoid). The plates were incubated at 37 °C for 48 h.

DNA extraction

The DNA extractions from enriched samples were performed using a GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma), with the Gram-positive bacterial protocol.

Amplification of genetic material

A specific sequence (1,003 bp) of the gene encoding 16S rRNA from *Listeria* spp. was amplified by PCR using 5'-end labelled specific primers [26]. One was labelled with biotin (B, primer C: 5'-AGG TTG ACC CTA CCG ACT TC-3') and the other with fluorescein (FL, primer D: 5'-CAA GGA TAA GAG TAA CTG C-3'). A set of primers [27] specific for *L. monocytogenes* was used to amplify a part (274 bp) of the *prfA* gene encoding the central virulence gene regulator from this food pathogen. One of these primers was labelled with digoxigenin (DIG, primer LIP2: 5'-GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG G-3') and the other with biotin (primer LIP1: 5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC-3'). The optimized composition of the reaction mixture was 2.5 µl of FastStart *Taq* DNA Polymerase buffer (500 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 0.15 mM of dNTP, 2 U of FastStart *Taq* DNA Polymerase (all from Roche), 0.1 µM of primers LIP1 and LIP2, 0.2 µM of primers C and D, and 2 µl of prepared template DNA. The final volume was adjusted to 25 µl with distilled water. The

Table 1 Strains of bacteria used in this study

Species/strain (serotype)	Origin	Species/strain	Origin
<i>L. monocytogenes</i>	Ref. material ALM 92, NCTC 13273	<i>Bacillus cereus</i>	AFSG
<i>L. monocytogenes</i> (1/2a)	NCTC 4886	<i>Enterobacter cloacae</i>	Cabbage at STU
<i>L. monocytogenes</i> (4b)	NCTC 4885	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 2308
<i>L. monocytogenes</i>	Milk from IFR	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCM 7039
<i>L. monocytogenes</i> (1/2c)	NCTC 5348	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544
<i>L. monocytogenes</i> (4a)	NCTC 5214	<i>E. sakazakii</i>	CCM 3460
<i>L. monocytogenes</i> (4b)	NCTC 10527	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 10888	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	ATCC 25923
<i>L. monocytogenes</i>	Chicken from IFR	<i>Proteus</i> sp.	CCM 1799
<i>L. innocua</i>	Salad from IFR	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>L. ivanovii</i>	PHLS	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> , <i>enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967	<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> , <i>typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>L. grayi</i>	ATCC 19120	<i>Serratia marcescens</i> ssp. <i>marcescens</i>	ATCC 13880
<i>L. welshimeri</i>	NCTC 11857	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

NCTC UK National Collection of Type Cultures, ATCC American Type Culture Collection, PHLS UK Public Health Laboratory Service, IFR Institute of Food Research, Norwich, CCM Czech Collection of Microorganisms, AFSG Agrotechnology & Food Sciences Group, The Netherlands, STU Slovak University of Technology, Slovak Republic

PCR was performed in the GeneAmp 9700 96-well thermal cycler (Applied Biosystems) with the following steps: an initial denaturation at 95 °C for 4 min, 25 cycles each having a denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and elongation at 74 °C for 1 min with a final extension at 74 °C for 5 min.

Following PCR, two types of double-labelled amplicons could be obtained: amplicons labelled with digoxigenin on one side and biotin on the other side (DIG-labelled) if *Listeria monocytogenes* template DNA was present and amplicons labelled with fluorescein and biotin (FL-labelled) if *Listeria* spp. DNA was present.

Immune reagents

NeutrAvidin Biotin-Binding Protein was from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) and Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Biotin, 2000 ng IgG/5 mm) was from Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK). Affinity-purified goat anti-fluorescein antibody (anti-FL, 500 ng/5 mm) was obtained from Biomedica (Foster City, CA, USA) and polyclonal anti-digoxigenin antibody (anti-DIG, 200 ng/5 mm) was from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland).

Nucleic acid lateral flow immunoassay

As an assay format for preliminary characterization, an experimental setup using the wells of a microtitre plate was used. A tube format [28] was applied for final evaluation of the assay with food samples (Fig. 1).

Antibodies were immobilized on nitrocellulose membranes by spraying using a Linomat V (CAMAG, Muttens, Switzerland). A control line (CL) was added by spraying Biotin-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, a test line specific to all species from the genus *Listeria* (TL1) by spraying anti-FL, and a test line specific to *Listeria monocytogenes* (TL2) by spraying anti-DIG.

Following PCR, 3 µl of the reaction mixture containing the specific amplicons was mixed with 1 µl of carbon nanoparticles–NeutrAvidin conjugate, able to interact with the biotin-labelled amplicons, and running buffer (100 mM borate buffer, pH 8.8, 1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN₃) to a total volume of 100 µl. The mixture was run through nitrocellulose membranes and the result was read after maximally 15 min. Typical NALFIA results are shown in Fig. 2, together with electrophoresis. Labelled amplicons from samples containing *L. monocytogenes* (FL- and DIG-labelled) were demonstrated by the appearance of three grey/black lines. Samples with the *Listeria* spp. but not *L. monocytogenes* contained FL-labelled amplicons and were indicated by the appearance of two grey/black lines. PCR product prepared from samples without listeria template DNA showed only one grey/black line (control line).

Sensitivity analysis of NALFIA

Dilution ranges of DIG- and FL-labelled amplicons were prepared and tested in NALFIA. Amplicon concentrations were determined by the spectrophotometer NanoDrop (ND 1000, NanoDrop Technologies). Test lines were scanned

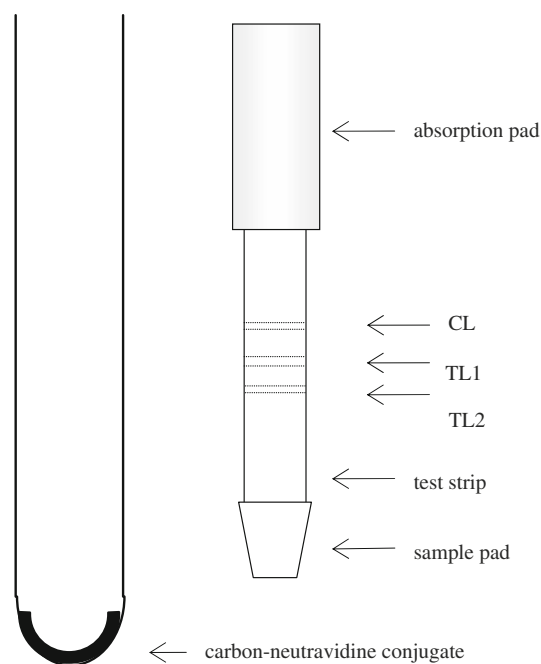


Fig. 1 A schematic drawing of a one-step tube assay [28]. Carbon-NeutrAvidin conjugate is dried on the bottom of the tube. Sample is applied on top of the conjugate and the strip is placed into the tube. If *L. monocytogenes* is present three grey/black lines will appear, if other *Listeria* species are present two lines will appear, and if the sample is negative only one control line will appear. CL control line formed by Biotin-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, TL1 test line specific to all species from the genus *Listeria* formed by α -FL, TL2 test line specific to *Listeria monocytogenes* formed by α -DIG

with a flatbed scanner (Epson Perfection V700 Photo) and the line intensities were converted to pixel grey volumes with TotalLab (Nonlinear Dynamics, Ltd.). Curve fitting was done with Excel (Microsoft Office).

Results and discussion

Development of NALFIA for *Listeria* detection

We present a rapid, reliable, and specific immunochromatographic tube assay for simultaneous nucleic acid detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*.

The developed procedure consists of an enrichment step (24 h), isolation of template DNA and a PCR amplification step of specific sequences (3.5 h), and an immunochromatographic detection of amplified product by NALFIA (5–15 min). To our knowledge, this is the first time that this combination of PCR and immunochromatographic one-step detection is described for *Listeria*. The combination of both techniques into an assay for rapid detection of specific nucleic acid targets was already described for detection of the *mecA* gene from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) cultures [29], for direct diagnosis of *Porphyromonas gingivalis* [30], and for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* [31].

For an optimal NALFIA result, the duplex PCR based on published results [26, 27] was slightly adjusted. In addition, FastStart Taq DNA polymerase was used for all experiments. Primers and polymerase concentrations were chosen to reach comparable intensities of the test lines: the *L. monocytogenes* specific line and the generic *Listeria* spp. line. By using the adapted protocol (see “Materials and methods”), the results appeared to be very reproducible. The performance of NALFIA was optimized in experiments in which the amounts of the carbon-NeutrAvidin conjugate, the concentration of immobilized capture antibody, and/or the volume of the PCR product varied.

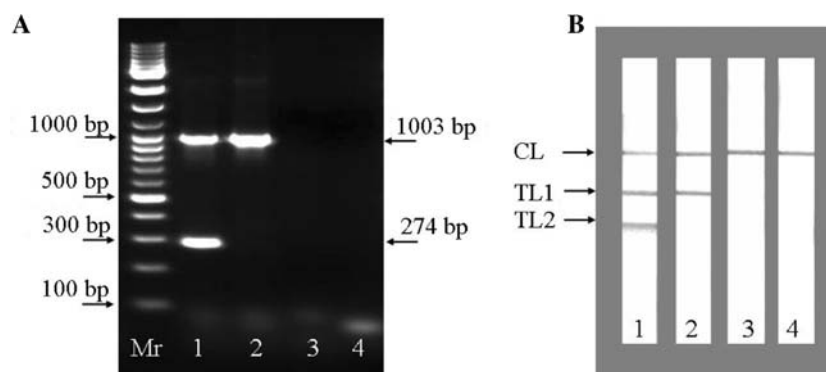


Fig. 2 Typical results of simultaneous detection of *L. monocytogenes* and generic *Listeria* spp. amplicons by agarose gel electrophoresis (a) and NALFIA (b) after duplex PCR. For both a and b, chromosomal DNA of *L. monocytogenes* (lane 1), *L. innocua* (lane 2), and *Enterobacter cloacae* (lane 3) was used for duplex PCR. The negative

control (lane 4) is a primer control (PCR without template DNA). Mr DNA size marker, TL1 test line specific to all species from genus *Listeria* (line of α -FL), TL2 test line specific to *L. monocytogenes* (line of α -DIG), CL control line (IgG-biotin)

The specificity and sensitivity of the developed NALFIA

The specificity of the described NALFIA was studied by testing a range of *Listeria* strains and other food-relevant

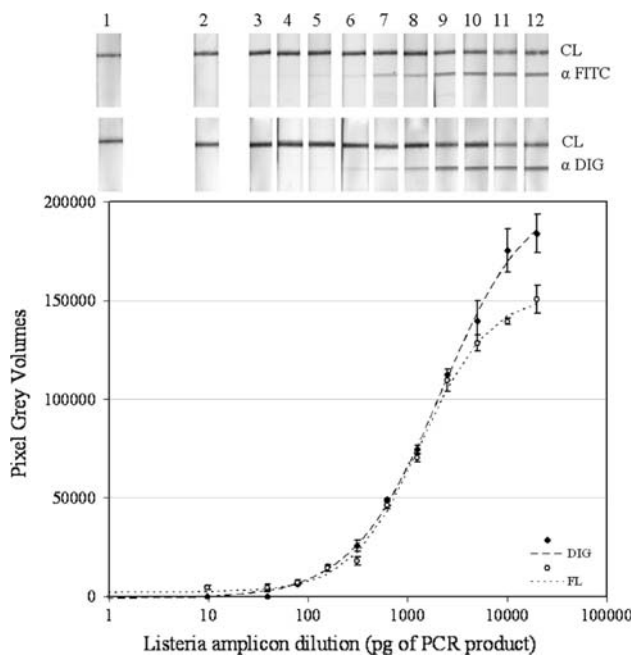


Fig. 3 Limit of detection of *Listeria*-NALFIA. Dilution series of amplified material of *L. monocytogenes* were tested by NALFIA. For generic *Listeria* detection, primers C, D (FL-labelled) were used in PCR, and for specific detection of *L. monocytogenes*, primers LIP1 and LIP2 were used (DIG-labelled). The upper panel shows scanned results obtained by NALFIA. The dilution range included 0 ng (lane 1), 0.01 ng (lane 2), 0.04 ng (lane 3), 0.08 ng (lane 4), 0.156 ng (lane 5), 0.313 ng (lane 6), 0.625 ng (lane 7), 1.25 ng (lane 8), 2.5 ng (lane 9), 5 ng (lane 10), 10 ng (lane 11), and 20 ng (lane 12). The lower panel shows the calculated pixel grey volumes after flatbed scanning and image analysis. Each point represents the mean of 3 values $\pm$ standard deviation. Results achieved with PCR material amplified with primers C, D (FL-labelled) is marked with open symbol, and PCR material amplified with primers LIP1 and LIP2 (DIG-labelled) with closed symbol

microorganisms (Table 1). PCR products of nine tested *L. monocytogenes* strains bound with both capture lines (the anti-DIG and the anti-FL line) and control line (CL); PCR products of all (5) other non-pathogenic *Listeria* only bound to the anti-FL line and control line. PCR products from 14 food-related, non-listerial microorganisms, the primers control (PCR without template DNA), and the buffer control (running buffer without PCR material) were negative and bound only to the control line (data not shown).

The sensitivity of NALFIA was set as the minimal concentrations of PCR amplicons that resulted in specific lines on the test membrane. Results are presented in Fig. 3 and show the dynamic range of NALFIA being 2.5–3 orders of magnitude for the DIG and FL assays. The lowest visually detectable amount was 0.1 ng of labelled amplicon.

With the optimized procedure, the lowest detectable amount of template DNA used for PCR was 50 pg of *L. monocytogenes* template DNA (Fig. 4), correlating with approximately 10^5 cells (Fig. 5), assuming a DNA content of 10^{-6} ng per cell [32]. These results corresponded to data received from experiments without pre-cultivation in which we were able to detect 10^5 cells in 1 ml of sample (Fig. 5).

Comparative costs and safety

The comparative costs and safety of electrophoresis and the typical NALFIA results are shown in Table 2. Electrophoresis is slightly cheaper in comparison with NALFIA, mainly due to the costs of labelled primers and components of immunochromatographic test (antibodies). On the other hand, NALFIA is user friendly, more rapid, less laborious (costs saving in personnel), and without any biological hazard.

Application of NALFIA to model milk samples

The *Listeria*-NALFIA technique was adapted to a tube format (see Fig. 1, [28]) to enable easy handling whilst

Table 2 Comparative costs and safety of NALFIA and electrophoresis including preparation of the sample

	NALFIA	Electrophoresis
Assessed price per 100 tests (in €)		
Cultivation, DNA isolation, PCR (without primers)	250	250
Primers	4 (labelled)	<1
Visualization	13 (antibodies, carbon)	5 (ethidium bromide)
Test components	4 (membranes, pads)	8 (agarose/gels)
Total price per 100 tests (in €)	271	264
Time for visualization of results	10 min	30–60 min
Required laboratory equipment	None	Electrophoresis station, UV transilluminator, Photosystem
Labour costs (electrophoresis = 100%)	80%	100%
Biological hazard	None	Ethidium bromide

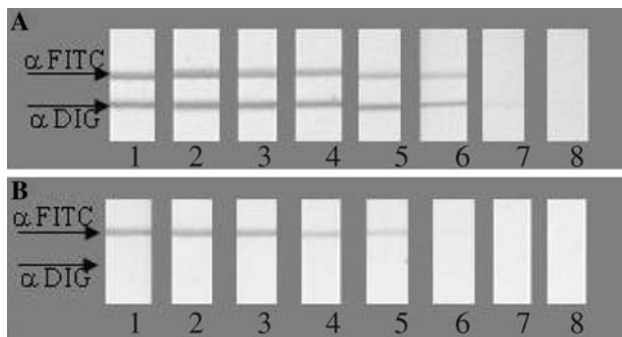


Fig. 4 Detection limit of duplex PCR-NALFIA. The detection limit of the assay was evaluated by using a diluted DNA of *L. monocytogenes* (a) and *L. innocua* (b). Dilution range included 10 ng (lane 1), 5 ng (lane 2), 2.5 ng (lane 3), 0.5 ng (lane 4), 0.25 ng (lane 5), 0.05 ng (lane 6), 0.01 ng (lane 7), and 0.005 ng (lane 8). Amplified DNA products were detected by NALFIA

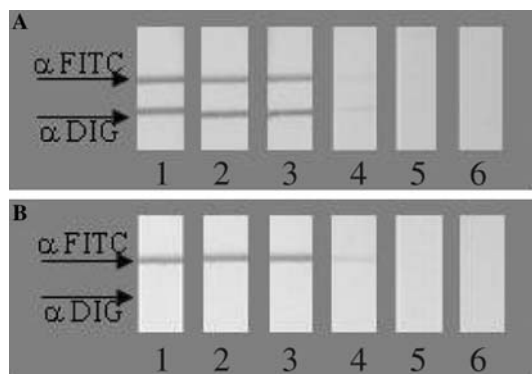


Fig. 5 Detection of cells dilutions. Multi-analyte NALFIA detection of PCR material that was prepared with DNA isolated from a dilution series of overnight cultures *L. monocytogenes* (a) and *L. innocua* (b). 1×10^8 cells, 2×10^7 cells, 3×10^6 cells, 4×10^5 cells, 5×10^4 , and 6×10^3 cells used for isolation

reducing the overall costs of the assay. The method was finally verified by testing samples of sterilized milk that had been artificially contaminated with low amounts of

different bacteria, including four different strains of *L. monocytogenes*, two strains of non-pathogenic *Listeria*, and *E. faecalis*. With the developed *Listeria*-NALFIA, less than 10 cells of *L. monocytogenes*/*Listeria* spp. were detected in 25 ml of milk within 28 h (24 h for cultivation, 4 h for PCR and NALFIA). No non-specific signals were visible when control samples (*E. faecalis* in milk, clear milk) were run (Fig. 6). The commercially available tests for specific detection of *L. monocytogenes* allow detecting *L. monocytogenes* within 37–54 h, whereas the current reference method for the detection of *L. monocytogenes* as proposed by ISO [12] allows the recovery of this pathogen in 5–7 days. The developed NALFIA procedure considerably reduces the total analysis time since the results can be obtained within 28 h from sample receipt. The application of NALFIA after cultural enrichment guarantees that target DNA is obtained from viable cells; damaged cells cannot result in false-positive lines.

Application of NALFIA to real food-related samples

The verified NALFIA was applied to a total of 24 real samples prepared from different types of food or food-related samples. The results are summarized in Table 3. Of the 24 tested samples, 15 contained *Listeria* spp. and 5 were positive for *L. monocytogenes*. All samples were also tested by the microbiological standard method and identical results as with NALFIA were obtained. Our results indicate that NALFIA can be a helpful tool for easier incorporation of molecular-biological methods as a routine diagnostic procedure for the identification of food-borne pathogens.

Conclusion

A rapid, specific, and user-friendly test for detection of *L. monocytogenes* is urgently needed by the food industry. In

Fig. 6 *Listeria*-NALFIA in tube format. PCR material was derived from milk samples that were incurred with various bacterial (sub)species: 1 *L. monocytogenes* (ALM 92, nr. 1 of triplicate), 2 *L. monocytogenes* (ALM 92, nr.2 of triplicate), 3 *L. monocytogenes* (ALM 92, nr.3 of triplicate), 4 *L. monocytogenes* (NCTC 4886), 5 *L. monocytogenes* (NCTC 4885), 6 *L. monocytogenes* (milk from IFR), 7 *L. innocua*, 8 *L. ivanovii*, 9 *Enterococcus faecalis*, and 10 negative milk control

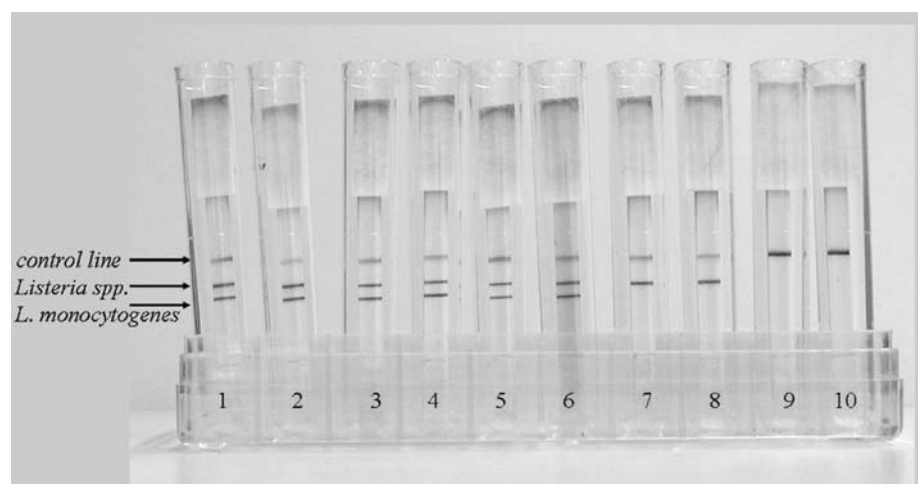


Table 3 Results of the detection tests for listeria presence in food and biofarm samples

Food	Results	
	NALFIA	Microbiological method
Diary products		
Milk	neg	neg
Ice cream	neg	neg
Soft-dried cream cheese	Lm	Lm
Vegetable		
Broccoli	Lm	Lm
Spinach	gL	gL
Ready-to-eat salad		
Potato salad	gL	gL
Delicacy salad	neg	neg
Sprouted seeds		
Snail-clover/alfalfa	neg	neg
Mongoose	neg	neg
Nutrition for children		
Vegetables with turkey	neg	neg
Bilberries	neg	neg
Frozen bilberries	Lm	Lm
Biofarm samples		
Raw milk	gL	gL
Water	neg	neg
Silage	gL	gL
Hay	gL	gL
Faeces	gL	gL
Surface sample—nipple	neg	neg
Surface sample—floor	gL	gL
Inter-lab trials		
Pasta A	gL	gL
Pasta B	Lm	Lm
Dried milk A	Lm	Lm
Dried milk B	gL	gL
Dried milk C	gL	gL

neg negative result, Lm presence of *L. monocytogenes* detected, gL presence of bacteria from genus *Listeria* detected

a procedure in which the *Listeria*–NALFIA was applied, we have shown that the approach of using the combination of nucleic acid amplification and an immunochemical-based detection principle offers favourable advantages in terms of sensitivity, specificity, costs, and especially speed. Furthermore, since the *Listeria*–NALFIA simultaneously detects *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*, this method will help to improve the microbiological standards of foodstuffs. This method not only helps to point at the hygienically errors in food production indicated by the *Listeria* spp. presence but it also reveals dangerous contamination by the human pathogen *L. monocytogenes*.

Acknowledgments This work was supported by the grants from Ministry of Education of Czech Republic 2B08050 and MSM 604 613 7305 (author Martina Blažková), which were really appreciated.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV (1999) Emerg Infect Dis 5:607–625
2. European Food Safety Authority (2006) EFSA J 310, ISBN: 92-9199-016-7
3. Vázquez-Boland A, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, Gonzáles-Zorn B, Wehland J, Kreft J (2001) Clin Microbiol Rev 14(3):584–640
4. Gandhi M, Chikindas ML (2007) Int J Food Microbiol 113:1–15
5. Gray ML, Killinger AH (1966) Bacteriol Rev 30(2):309–382
6. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM (2007) J Microbiol Immunol Infect 40:4–13
7. WHO (2002) Foodborne diseases, emerging. <http://www.who.int>
8. Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Abadias M, Kurtzman CP, Camp MJ (2006) Appl Environ Microbiol 72(2):1135–1140
9. MacDonald PDM, Whitwam RE, Boggs JD, MacCormack JN, Anderson KL, Reardon JW, Saah RJ, Graves LM, Hunter SB, Sobel J (2005) Clin Infect Dis 40:677–682
10. El Amin A (2006) <http://www.foodqualitynews.com/news/ng.asp?n=71566-fsa-salads-listeria>. Accessed 10 Sept 2008
11. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs
12. International Standard ISO 11290-1 (1996) Part 1: Detection method
13. Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M (1997) In: Quimper Froid symposium proceedings, France, 16–18 June 1997, ADRIA Quimper, p 6
14. Sacchetti R, Bianucci F, Ambrogiani E (2003) New Microbiol 26(3):269–274
15. Vlaemynck G, Lafarge V, Scotter S (2000) J Appl Microbiol 88:430–441
16. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM (2005) FEMS Microbiol Rev 29:851–875
17. Feldsine PT, Lienau AH, Leung SC, Mui LA (2002) J AOAC Int 85(2):470–478
18. Karamonová L, Blažková M, Fukal L, Rauch P, Greifová M, Horáková K, Tomáška M, Roubal P, Brett GM, Wyatt GM (2003) Food Agric Immunol 15:167–182
19. Blažková M, Karamonová L, Greifová M, Fukal L, Hoza I, Rauch P, Wyatt GM (2006) Eur Food Res Technol 223:821–827
20. Nugen SR, Baeumner AJ (2008) Anal Bioanal Chem 391:451–454
21. Kacliková E, Pangallo D, Drahovská H, Oravcová K, Kuchta T (2003) Food Control 14:175–179
22. Hochberg AM, Roering A, Gangar V, Curiale M, Barbour WM, Mroyinski PM (2001) J AOAC Int 84(4):1087–1097 ISSN 1060-3271
23. Amagliani G, Giammarini C, Omiccioli E, Brandi G, Magnani M (2007) Food Control 18:1137–1142
24. van Amerongen A and Koets M (2005) In: van Amerongen A, Barug D, Lauwaars M (eds) Rapid methods for biological and

- chemical contaminants in food and feed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. ISBN: 9076998531
25. Baptista P, Pereira E, Eaton P, Doria G, Miranda A, Gomes I, Quaresma P, Franco R (2008) *Anal Bioanal Chem* 397:943–950
 26. Herman LMF, de Ridder HFM, Vlaemynck GMM (1995) *J Food Prot* 58(8):867–872
 27. D'Agostino M, Wagner M, Vazquez-Boland JA, Kuchta T, Karpiskova R, Hoorfar J, Novella A, Scortii M, Ellison J, Murray A, Fernandes I, Kuhn M, Pazlarova J, Heuvelink A, Cook N (2004) *J Food Prot* 67(8):1646–1655
 28. Koets M, Sander I, Bogdanovic J, Doekes G, van Amerongen A (2006) *J Environ Monit* 8(9):942–946
 29. Fong WK, Modrusan Z, McNevin JP, Marostenmaki J, Zin B, Bekkaoui F (2000) *J Clin Microbiol* 38(7):2525–2529
 30. Takada K, Sakaguchi Y, Oka C, Hirasawa M (2005) *J Periodontol* 76(4):508–512
 31. Soo P-Ch, Horng Y-T, Hsueh P-R, Shen B-J, Wang J-Y, Tu H-H, Wei J-R, Hsieh S-Ch, Huang Ch-Ch, Lai H-Ch (2006) *J Microbiol Methods* 66(3):440–448
 32. Nelson KE, Fouts DE, Mongodin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, Rasko DA, Angiuoli SV, Gill SR, Paulsen IT, Peterson J, White O, Nelson WC, Nierman W, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Haft DH, Selengut J, Aken SV, Khouri H, Fedorova N, Forberger H, Tran B, Kathariou S, Wonderling LD, Uhlich GA, Bayles DO, Luchansky JB, Fraser CM (2004) *Nucleic Acids Res* 32(8):2386–2395

UŽITNÝ VZOR

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011 - 24216**

(22) Přihlášeno: **14.04.2011**

(47) Zapsáno: **10.10.2011**

(11) Číslo dokumentu:

22776

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 30/92 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

(73) Majitel:

Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Praha, CZ

(72) Původce:

Blažková Martina Ing. Ph.D., Praha, CZ

Javůrková Barbora Ing., Praha, CZ

Fukal Ladislav Prof. Ing. CSc., Praha, CZ

Rauch Pavel Prof. Ing. DrSc., Praha, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Květoslava Kubíčková, Doubravčická 2201, Praha 10, 10000

(54) Název užitého vzoru:

Diagnostická souprava na detekci patogenních mikroorganismů ve vzorcích biologického původu

CZ 22776 U1

Diagnostická souprava na detekci patogenních mikroorganismů ve vzorcích biologického původu

Oblast techniky

Řešení se týká diagnostické soupravy na detekci patogenních mikroorganismů, respektive patogenních mikroorganismů ve vzorcích biologického původu, zejména v potravinách.

Dosavadní stav techniky

Patogenní mikroorganismy jsou stálým a trvalým nebezpečím ohrožujícím zdraví obyvatelstva a patří, podle každoročních zpráv Světové zdravotnické organizace (WHO), k nejrizikovějším faktorům i ve srovnání s takovými civilizačními chorobami jako je rakovina a AIDS. Zavedení „Systému kritických bodů“ (HACCP), které je v ČR pro výrobu potravin povinné od 1. 1. 2000, vyvolalo tlak na urychlený vývoj metod pro rychlé a specifické stanovení sledovaných parametrů. V roce 2005 přijala Evropská komise regulační opatření č. 2073/2005, kterým se stanovují mikrobiologická kritéria pro potraviny. Opatření bylo modifikováno v roce 2007, č. 1441/2007. Toto regulační opatření vyžaduje nepřítomnost patogenních mikroorganismů (např.: salmonely, listerie, enterobaktera, aj.), ve 25/10 g vzorku potravin. Detekce patogenních mikroorganismů klasickými kultivačními normovanými metodami trvá běžně 5 až 8 dní. Ani biochemické testy nebo využití chromogenních a fluorescenčních substrátů významně nezkracuje dobu potřebnou k získání výsledku. Moderní molekulárně-biologické techniky jsou sice rychlejší, ale vyžadují používání nákladných přístrojů, postupů a vysoce kvalifikované pracovníky.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nevýhody odstraňuje diagnostická souprava na detekci patogenních mikroorganismů, která podle technického řešení sestává z diagnostického proužku z nitrocelulózové membrány fixované na plastové výztuži, diagnostický proužek je na začátku, v místě startu v kontaktu s první podložkou pro vzorek amplikonu, což je produkt polymerázové řetězové reakce (PCR), tj. části DNA získané ze zkoumaného vzorku obsahujícího patogenní mikroorganismy. Během této reakce vzniká značený amplikon specifický pro hledaný patogenní mikroorganismus. První podložka je nasycena prvním blokačním pufrem č. 1. Začátek diagnostického proužku je dále v kontaktu s druhou podložkou nasycenou druhým blokačním pufrem č. 2 a následně konjugátem nanočástic uhlíku s avidinem. Dále je na diagnostickém proužku v příčných linkách nanesena nejméně jedna specifická protilátka o koncentraci 10 až 500 ng/μl, a to podle počtu detegovaných patogenních mikroorganismů. Pro každý patogenní mikroorganismus je jedna linka protilátky, a dále je na diagnostickém proužku nanesena poslední kontrolní linka, na kterou je imobilizován biotin vázaný přes imunoglobuliny třídy IgG o koncentraci 1 až 100 ng/μl, konec diagnostického proužku je v kontaktu s absorpční podložkou a vše je zakryto plastovým krytem, který se dotýká plastové výztuže. Kryt je opatřen otvorem nad první podložkou, a průzorem nad detekční částí diagnostického proužku. Součástí diagnostické soupravy je dále lahvička s roztokem reakčního pufru.

Reakční pufr obsahuje 0,1M borátový pufr, pH 8,8, 1% (w/v) hovězí sérový albumin (BSA), 0,02% (w/v) NaN_3 , 0,05% (v/v) neionogenní tenzid.

První blokační pufr č. 1 obsahuje 0,1M borátový pufr, 1% (w/v) hovězí sérový albumin (BSA), 0,02% (w/v) NaN_3 a 0,01 % (w/v) sacharózy.

Druhý blokační pufr č. 2 obsahuje 0,1M borátový pufr, 1% (w/v) BSA, 0,02% (obj./obj) NaN_3 , 0,1% (v/v) neionogenní tenzid a 0,01 % (w/v) sacharózy.

První podložka má velikost pórů 3 až 12 μm, kapilární vztlínavost vody 20 až 250 s na 4 cm.

Druhá podložka má velikost pórů 5 až 25 μm, kapilární vztlínavost vody 30 až 180 s na 4 cm.

Absorpční podložka je tvořena materiálem s velikostí pórů 2 až 14 μm .

Diagnostický proužek nitrocelulózové membrány o rozměrech 2,5 až 5 cm $\times$ 0,4 až 0,8 cm je tvořen z materiálů vyznačujících se velikostí pórů 4 až 10 μm , kapilární vzlinavostí vody 40 až 200 s na 4 cm.

- 5 Plastová výztuž diagnostického proužku o rozměrech 3 až 6 cm $\times$ 0,5 cm $\times$ 1 cm a kryt jsou vytvořeny z plastů na bázi vinylů, polyamidů, polyesterů a fluoroplastů.

Na diagnostickém proužku je ve vzdálenosti 1,5 až 4,0 cm od začátku diagnostického proužku v příčné lince imobilizována protilátka o koncentraci 30 až 300 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, schopná imunochemické interakce se značkovací látkou obsaženou v ampliconu, čímž se prokáže přítomnost patogenního mikroorganismu X. Ve vzdálenosti 2,0 až 5,0 cm od začátku diagnostického proužku je v další příčné lince imobilizována protilátka o koncentraci 40 až 400 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, schopná imunochemické interakce se značkovací látkou obsaženou v ampliconu, který prokazuje přítomnost patogenního mikroorganismu Y. Značkovací látka je vybrána ze skupiny tvořené fluoresceinem, rhodaminem, texaskou červení digoxigeninem. Ve vzdálenosti 2,8 až 5,5 cm od okraje je imobilizován biotin, který interaguje s konjugátem nanočástic uhlíku s avidinem.

S výhodou je na diagnostickém proužku ve vzdálenosti 2,0 až 3,0 cm od začátku diagnostického proužku imobilizována protilátka o koncentraci 100 až 200 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ interagující s digoxigeninem, tj. testovací linie pro patogenní mikroorganismus X, ve vzdálenosti 2,4 až 4,0 cm od okraje diagnostického proužku je imobilizována protilátka o koncentraci 200 až 500 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ interagující s fluoresceinem, tj. testovací linie pro detekci patogenního mikroorganismu Y, a ve vzdálenosti 2,8 až 5,0 cm od okraje diagnostického proužku je imobilizován biotin vázaný na imunoglobulin třídy IgG, to je kontrolní linie.

Diagnostické proužky pro diagnostickou soupravu podle technického řešení jsou připravené a skladované v suchu ve vakuovaných sáčcích při teplotě kolem 20 °C. Expirační doba je nejméně jeden rok.

Detekce patogenních mikroorganismů diagnostickou soupravou podle technického řešení je založena na imunochemické interakci ampliconu se specifickými protilátkami imobilizovanými na diagnostickém proužku. Amplicon je produkt polymerázové řetězové reakce (PCR), tj. části DNA získané ze zkoumaného vzorku obsahujícího patogenní mikroorganismy. Během této reakce vzniká amplicon značený značkovací látkou vybranou například ze skupiny: biotin fluorescein, rhodamine, texaská červen, nebo digoxigenin. Amplicon obsahuje též biotin a proto amplicon aplikovaný na první podložku pro vzorek ampliconu interaguje s konjugátem nanočástic uhlíku s avidinem, který je zakotven na startu v druhé podložce a postupně spolu postupují, díky kapilárním silám, diagnostickým proužkem k liniím s imobilizovanými protilátkami. Při průchodu přes zóny obsahujícími protilátky proti značkovacím látkám ampliconů jsou prostřednictvím imunochemické interakce postupně zachytávány amplicony obsahující části DNA specifické pro jednotlivé patogenní mikroorganismy. Přebytek konjugátu nanočástic uhlíku s avidinem postupuje dále diagnostickým proužkem a interaguje s kontrolní linií obsahující biotin. Nanočástice uhlíku umožní vizuální průkaz výsledku testu.

Schematický náčrt diagnostické soupravy podle technického řešení je na Obr. 1 a na Obr. 2a, b, c je půdorys diagnostické soupravy s výsledky testu. Při aplikaci pozitivního vzorku (vzorek obsahující hledané patogenní mikroorganismy) dojde ke vzniku celkem dvou/tří (podle počtu detegovaných patogenních mikroorganismů) černých linek - testovací (jedna/dvě) a kontrolní linky (jedna). Pokud se zbarví pouze kontrolní linka, byl vzorek negativní a žádný patogenní mikroorganismus nebyl přítomen. V případě, že nedojde ke vzniku žádné barevné linky, svědčí to o nesprávném provedení testu.

Detekce pomocí diagnostické soupravy pro detekci patogenních mikroorganismů v biologických vzorcích podle technického řešení je velmi spolehlivá, přesná, rychlá a specifická. Práce s diagnostickým proužkem je velmi jednoduchá.

Přehled obrázků

Obr. 1: schematický náčrt diagnostické soupravy a vysvětlující značky.

Obr. 2: znázorňuje půdorys diagnostické soupravy včetně krytu s otvorem nad první podložkou a průzorem v krytu nad detekční částí diagnostického proužku se zvýrazněním jednotlivých linií na diagnostickém proužku po provedení testu:

- a) s pozitivním testem pro dva patogenní mikroorganismy přítomné ve vzorku,
- b) s pozitivním testem pouze pro jeden patogenní mikroorganismus ve vzorku,
- c) vzorek bez patogenních mikroorganismů.

Následující příklady diagnostické soupravy na detekci mikrobiálních patogenních mikroorganismů v biologických vzorcích, například v potravinách, diagnostickým proužkem membrány podle technického řešení pouze dokládají možná provedení a využití, aniž by toto řešení jakkoliv omezovaly.

Příklady provedeníPříklad 1

Zařízení pro diagnostickou soupravu na detekci mikrobiálních patogenních mikroorganismů v biologických vzorcích, podle technického řešení, je znázorněno na obr. 1 a skládá se z následujících dílů: z plastového krytu a a plastové výztuže f, na níž je fixován diagnostický proužek d. Začátek diagnostického proužku d je v kontaktu s první podložkou b pro vzorek amplikonu, která je nasycena prvním blokačním pufrem č. 1 a druhou podložkou c pro konjugát nanočástic uhlíku s avidinem, která je nasycena druhým blokačním pufrem č. 2. Na obr. 1 je první podložka b umístěna před diagnostickým proužkem d a druhá podložka c je umístěna v místě startu na diagnostickém proužku d. Dále je na diagnostickém proužku d nanášena ve vzdálenosti 2,1 cm od začátku diagnostického proužku d první příčná linka 1.1 obsahující specifickou protilátku X a dále je na diagnostickém proužku d nanášena ve vzdálenosti 2,4 cm od začátku diagnostického proužku d druhá příčná linka 1.2 obsahující specifickou protilátku Y a poslední příčná kontrolní linka 2 obsahující biotin vázaný přes imunoglobuliny třídy IgG je nanášena ve vzdálenosti 2,8 cm od začátku diagnostického proužku d. Konec diagnostického proužku d je v kontaktu s absorpční podložkou e, v tomto případě je umístěna na diagnostickém proužku d a vše je zakryto plastovým krytem a, který se dotýká plastové výztuže f. Plastový kryt a je opatřen otvorem 4 a pokud kryt a není průhledný, tak dále průzorem 5, který je pouhým otvorem nebo je tvořen průhledným plastem a umožňuje pohled na detekční část diagnostického proužku d. Kryt a je na obr. 2 spojen s plastovou výztuží f pružnými plastovými panty. Součástí je lahvička s roztokem reakčního pufru.

Diagnostické proužky d po nanášení příčných linek 1.1 až 1.n protilátek a kontrolní linky 2 včetně použitých blokačních pufrů v první podložce b a druhé podložce c jsou zasušeny proudem vzduchu o teplotě 20 °C.

Diagnostické proužky membrán d se po zasušení skladují v suchu ve vakuovaných sáčkích při teplotě kolem 20 °C.

Součástí soupravy je lahvička s roztokem reakčního pufru 3 (0,1M borátový pufr, pH 8,8, obsahující 1% (w/v) hovězí sérový albumin, 0,05% w/v Tween 20, 0,02% (w/v) NaN₃).

Na obr. 2 je znázorněn 3× půdorys diagnostické soupravy s proužkem membrány d:

- a) Znázorňuje otvor 4 v plastovém krytu a pro vkápnutí vzorku amplikonu s reakčním pufrem 3 na podložku b a diagnostický proužek d s třemi zřetelnými pozitivními linkami 1.1, 1.2 a 2 po prostoupení vzorku amplikonu diagnostickým proužkem d až za kontrolní linku 2. Vzorek obsahuje patogenní mikroorganismy X a Y.
- b) Znázorňuje otvor 4 v plastovém krytu a pro vkápnutí vzorku amplikonu s reakčním pufrem 3 na podložku b a membránu d se zřetelnou pozitivní linkou 1.2 po prostoupení vzorku ampli-

konu diagnostickým proužkem d až za kontrolní linku 2. Vzorek obsahuje pouze patogenní mikroorganismus Y.

- c) Znázorňuje otvor 4 v plastovém krytu a pro vkápnutí vzorku amplikonu s reakčním pufrem 3 na podložku b a diagnostický proužek d se zřetelnou pozitivní linkou 2 po prostoupení vzorku amplikonu diagnostickým proužkem d až za kontrolní linku 2. Vzorek neobsahuje patogenní mikroorganismy.

Příklad 2

Příprava potravinového/biologického vzorku pro detekci probíhá stejně jako u všech dosud používaných metod detekce patogenních mikroorganismů:

- 10 Vzorek 10 g instantní dětské výživy se homogenizuje ve 100 ml kultivačního média vhodného pro detegování patogenní mikroorganismus (např.: modifikovaná laurylsulfátová tryptická živná půda). Kultivace probíhá přes noc, obvykle 12 h při 37 °C. Z takto získaného vzorku s nabohaceným obsahem patogenních mikroorganismů se extrahuje mikrobiální DNA některou běžně používanou a komerčně dostupnou soupravou. Získaná DNA se amplifikuje metodou polymerázové
- 15 řetězové reakce, a získá se amplikon značený digoxigeninem a biotinem, specifický pro hledaný patogenní mikroorganismus. Specifická protilátka proti digoxigeninu nanesená na lince 1.1 na diagnostický proužek d zachytí amplikon značený digoxigeninem a biotinem společně s navázaným konjugátem nanočástic s avidinem, který umožní vizuální detekci přítomného patogenního mikroorganismu.

- 20 Postup detekce jednoho patogenního mikroorganismu:

- Použije se proužek membrány d s jednou testovací linkou 1.1, na které je naneseena specifická protilátka proti digoxigeninu a kontrolní linka 2. Na startovací místo na první podložku b se nanese 5 µl vzorku amplikonu smíchaného se 100 µl roztoku reakčního pufru (0,1 M borátový pufr, pH 8,8, obsahující 1% (w/v) hovězí sérový albumin, 0,05% (v/v) neionogenní tenzid, 0,02% (w/v) NaN₃). Do 10 minut po aplikaci vzorku amplikonu se na diagnostickém proužku d odečte
- 25 pozitivní (dvě linky - obr. 2b) nebo negativní výsledek (jedna linka - obr. 2c), tedy přítomnost nebo nepřítomnost patogenního mikroorganismu ve vzorku.

Příklad 3

Postup detekce dvou patogenních mikroorganismů:

- 30 Použije se proužek membrány d se dvěma testovacími linkami 1.1 a 1.2 obsahujícími dvě různé protilátky, specifické pro dva různé patogenní mikroorganismy. Na startovací místo na první podložku b se nanese po 5 µl vzorku obsahujícího amplikon značený digoxigeninem a biotinem a amplikon značený fluoresceinem a biotinem smíchaných se 100 µl roztoku reakčního pufru. Do 10 minut po aplikaci vzorku na diagnostický proužek odečteme pozitivní nebo negativní výsledek,
- 35 tedy přítomnost nebo nepřítomnost patogenního mikroorganismu ve vzorku. Na obr. 2a je znázorněn pozitivní výsledek identifikující 2 patogenní mikroorganismy.

Průmyslová využitelnost

- Zařízení pro diagnostickou soupravu na detekci patogenních mikroorganismů ve vzorcích biologického původu, zejména v potravinách, je využitelné v kontrolních laboratořích potravinářského
- 40 průmyslu.

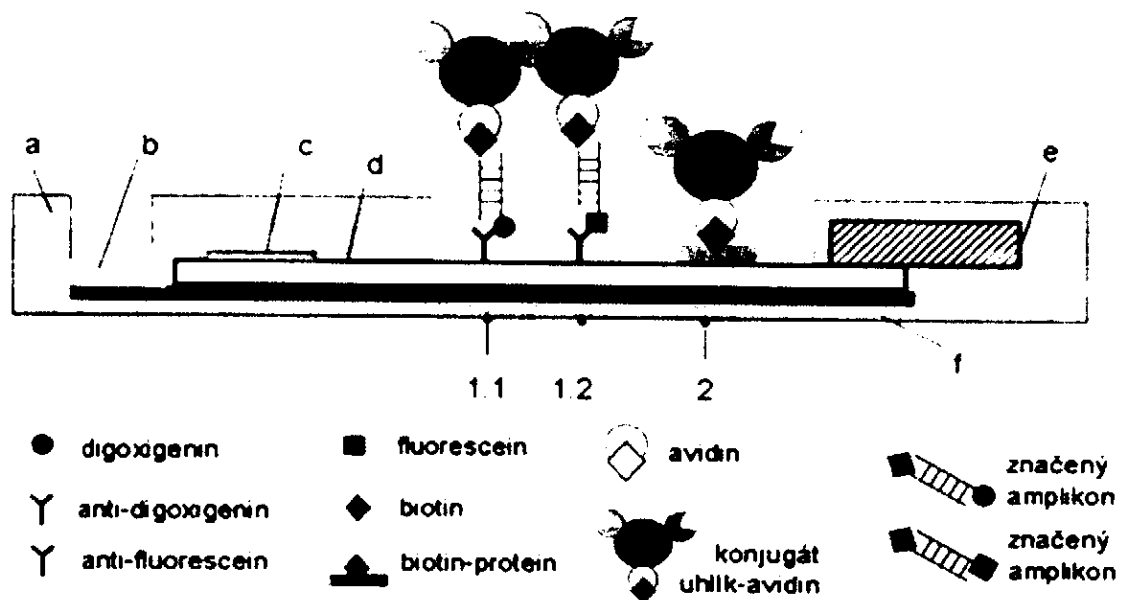
NÁROKY NA OCHRANU

1. Diagnostická souprava na detekci patogenních mikroorganismů ve vzorcích biologického původu, zejména v potravinách, **vyznačující se tím**, že je tvořena diagnostickým proužkem (d) z nitrocelulózové membrány fixovaným na plastové výztuži (f), diagnostický proužek (d) je na začátku, na místě startu v kontaktu s první podložkou (b) pro vzorek amplikonu, která je nasycena prvním blokačním pufrem č. 1 a po té s druhou podložkou (c) pro konjugát nanočástic uhlíku s avidinem, která je nasycena druhým blokačním pufrem č. 2, a je umístěna na diagnostickém proužku (d), dále je na diagnostickém proužku (d) nanесena minimálně jedna příčná linka (1.1, 1.2 až 1.n) obsahující specifickou protilátku o koncentraci 10 až 500 ng/μl, a dále je na membránu nanесena poslední příčná kontrolní linka (2) obsahující biotin vázaný přes imunoglobuliny třídy IgG o koncentraci 1 až 100 ng/μl, přičemž konec diagnostického proužku (d) je v kontaktu s absorpční podložkou (e) a vše je zakryto plastovým krytem (a), s otvorem (4) nad první podložkou (b), a průzorem (5) nad detekční částí diagnostického proužku (d), kterýžto kryt (a) se dotýká plastové výztuže (f) a dále souprava obsahuje lahvičku s roztokem reakčního pufru.
2. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že první blokační pufr č. 1 obsahuje 0,1M borátový pufr, 1 % (w/v) hovězího sérového albuminu, 0,02% (w/v) NaN₃, a 0,01 % (w/v) sacharózy.
3. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že druhý blokační pufr č. 2 obsahuje 0,1M borátový pufr, 1 % (w/v) hovězího sérového albuminu, 0,02% (w/v) NaN₃, 0,1% (v/v) neionogenní tenzid, a 0,01 % (w/v) sacharózy.
4. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reakční pufr obsahuje 0,1M borátový pufr, pH 8,8, 1 % (w/v) hovězího sérového albuminu, 0,02% (w/v) NaN₃, a 0,05% (v/v) neionogenní tenzid.
5. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že první podložka (b) pro vzorek amplikonu má velikost pórů 3 až 12 μm, a kapilární vztlínavost vody 20 až 250 s na 4 cm.
6. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že druhá podložka (c) pro konjugát má velikost pórů 5 až 25 μm, kapilární vztlínavost vody 30 až 180 s na 4 cm a je nasycená blokačním pufrem č. 2, k němuž je následně aplikován konjugát nanočástic uhlíku s avidinem.
7. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že absorpční podložka (e) je tvořena materiálem s velikostí pórů 2 až 14 μm.
8. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že diagnostický proužek (d) o rozměrech 2,5 až 5 cm × 0,4 až 0,8 cm je tvořen nitrocelulózovou membránou s velikostí pórů 4 až 10 μm a kapilární vztlínavostí vody 40 až 200 s na 4 cm.
9. Diagnostická souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že plastová výztuž (f) membrány (d) o rozměrech 3 až 6 cm × 0,5 cm × 1 cm je vytvořena z plastů vybraných ze skupiny na bázi vinylů, polyamidů, polyesterů nebo fluoroplastů.

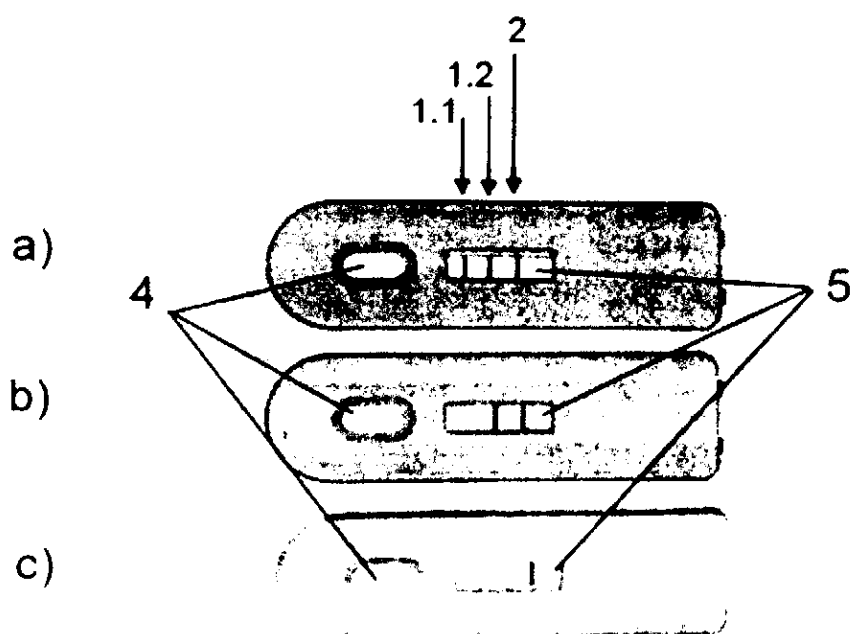
10. Diagnostická souprava podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že na diagnostickém proužku (d) je ve vzdálenosti 1,5 až 4,0 cm od začátku diagnostického proužku (d) imobilizována první linka (1.1) protilátky X o koncentraci 30 až 300 ng.μl⁻¹, která je schopná imunochemické interakce se značkovací látkou vázanou na vzorek amplikonu, ve vzdálenosti 2,0 až 5,0 cm od začátku diagnostického proužku (d) je imobilizována druhá linka (1.2) protilátky Y o koncentraci 40 až 400 ng.μl⁻¹, která je schopná imunochemické interakce se značkovací látkou vázanou na vzorek amplikonu, a ve vzdálenosti 2,8 až 5,5 cm od začátku diagnostického proužku (d) je imobilizována poslední kontrolní linka (2) obsahující biotin o koncentraci 1 až 100 ng/μl, který interaguje s konjugátem nanočástic uhlíku s avidinem.
11. Diagnostická souprava podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že značkovací látka je vybrána ze skupiny tvořené biotinem, fluoresceinem, rhodaminem, texaskou červení nebo digoxigeninem.
12. Diagnostická souprava podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že na diagnostickém proužku (d) je ve vzdálenosti 2,0 až 3,0 cm od začátku diagnostického proužku (d) imobilizována první linka (1.1) protilátky X o koncentraci 100 až 200 ng.μl⁻¹ schopná imunochemické interakce s digoxigeninem, a ve vzdálenosti 2,4 až 4,0 cm od začátku diagnostického proužku (d) je imobilizována druhá linka (1.2) protilátky Y o koncentraci 200 až 500 ng.μl⁻¹, která je schopná imunochemické interakce se fluoresceinem obsaženým ve vzorku amplikonu a ve vzdálenosti 2,8 až 5,0 cm od začátku diagnostického proužku (d) je imobilizována poslední kontrolní linka (2) obsahující biotin.

1 výkres

Obr. 1



Obr. 2



Konec dokumentu

Carbon Nanoparticles as Detection Label for Diagnostic Antibody Microarrays

Aart van Amerongen^{1,2,*}, Geert A.J. Besselink³,
Martina Blazkova⁴, Geertruida A. Posthuma-Trumpie¹,
Marjo Koets¹ and Brigit Beelen-Thomissen¹

¹Wageningen University and Research Centre,
Food and Biobased Research – Biomolecular Sensing and Diagnostics,

²Laboratory of Organic Chemistry, Wageningen University,

³MESA⁺ Institute for Nanotechnology, University of Twente,

⁴Institute of Chemical Technology, University of Prague,

^{1,2,3}The Netherlands,

⁴Czech Republic

1. Introduction

The presence of harmful pathogenic microorganisms is a growing problem in healthcare, food, feed and the environment. In addition, the increasing appearance of antibiotic resistant microorganisms adversely affects this situation. In the current standard detection methods time-consuming and expensive enrichment protocols are being used. Generally, these methods need to be performed in highly equipped laboratories by trained personnel. Often the time needed to confirm the presence of a particular pathogen using standard methods averages 2 to 7 days, which is too long to timely take actions. In human health for example this lack of speed can result in lost working hours, hospitalization or even death. The recent outbreak of food-borne *Escherichia coli* in Germany and other European countries (May 2011) has shown the dramatic consequences of pathogen contaminated food (Askar et al. 2011; Frank et al. 2011). Apart from *E. coli* there are several other pathogenic microorganisms that have to be monitored intensively in the food chain. Amongst those are *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. As different strains of these species may have various degrees of pathogenicity it is very informative to be able to discriminate between harmless and harmful strains. In food production good manufacturing programs were set up to ensure food safety. To comply with these safety rules it would be advantageous to have a versatile, fast, low-cost and on-site assay format available for (on-line) monitoring of food-borne pathogens with a suitable number of target organisms. In the majority of diagnostic questions this number is 5 to maximally 10.

Many efforts have been made to speed up the detection of harmful microorganisms, the focus of these developments being on faster, more sensitive and more convenient methods (Mandal et al. 2011). Especially when handling large amounts of samples it is a great asset if a detection method allows for medium- to high-throughput screening. In these cases it is

also valuable if the steps from sample processing to read-out of the results have been maximally automated.

In drug discovery and life sciences research both DNA and, increasingly, protein microarrays are crucial tools (Timlin 2006), whereas the application of microarrays as diagnostics is very promising (Venkatasubbarao 2004). Pathogen detection in food by DNA microarrays has been reported by various groups (D'Agostino et al. 2004; Glynn et al. 2006; Kostrzynska & Bachand 2006; Volokhov et al. 2002). However, despite its high potential the microarray platform is still not an emerging tool in the regular diagnostic field, especially in the case of protein microarrays (Dieterle & Marrer 2008). Several reasons may be responsible for this limited presence of protein microarrays such as the lack of sufficient biological recognition elements (e.g., antibodies) and/or their sensitivity and specificity and the inferior conformational stability that some proteins may have. Many problems have still to be overcome for validated in vitro diagnostics using protein microarrays (Hartmann et al. 2009).

To increase the applicability and to reduce the costs of protein microarrays we investigated the use of carbon nanoparticles as signal labels and a conventional flatbed scanner to digitize the image. A nucleic acid detection format was used employing double-tagged amplicons that can be sandwiched between array-immobilised anti-tag antibodies and neutravidin coated carbon nanoparticles. The image was processed using image analysis software to produce the pixel grey volume of the spots generated by the label. As an alternative label to gold and latex, carbon nanoparticles have been used to develop lateral flow immunoassays (LFIA) for over 15 years (Aldus et al. 2003; Capps et al. 2004; Kalogianni et al. 2011; Koets et al. 2006; Koets et al. 2011; Lonnberg et al. 2008; Noguera et al. 2011; Posthuma-Trumpie et al. 2008; van Amerongen et al. 1993; van Amerongen & Koets 2005; van Dam et al. 2004). The possibility to use the pixel grey volume of the carbon particles in data processing following digitization by a CCD camera and image analysis was already shown in 1994 in a comparison between a simple one-step lateral flow immunoassay and a radioimmunoassay specific for the human chorionadotropin hormone (van Amerongen et al. 1994). Excellent agreement was achieved among these two techniques with a correlation coefficient of 0.999. The use of a conventional flatbed scanner to digitize carbon lines was described (Lonnberg & Carlsson 2001), which by that time was 300 times more sensitive than the CCD camera used in 1994 (van Amerongen et al. 1994). In a recent PubMed literature survey conducted by FIND Diagnostics and published in Clinical Chemistry on the sensitivity of lateral flow immunoassays (Gordon & Michel 2008) the sensitivity of the carbon label was calculated to be in the low picomolar range for LFIA specific for a *Schistosomiasis* carbohydrate antigen and fungal alpha-amylase, respectively, even when the assays were judged by visual inspection (Koets et al. 2006; van Dam et al. 2004). The position occupied by carbon nanoparticles in the sensitivity ranking list of nanoparticles (Gordon & Michel 2008) holds great promise for the application of these particles as signal labels in microarrays too. Recently, a review about the carbon label in diagnostics has been published (Posthuma-Trumpie et al. 2012).

In this chapter we describe the multi-analyte detection of amplified DNA using an antibody microarray. The nucleic acid detection is based on the use of tagged primers in a PCR resulting in double-tagged amplicons that can be sandwiched between immobilised anti-tag antibodies and neutravidin. Reverse primers were tagged by using biotin and forward

primers by discriminating tags such as digoxigenin (DIG), dinitrophenol (DNP), fluorescein (FL), and Texas Red (TxR). In this one-step format, the labelled amplicons were mixed with the conjugate of neutravidin and carbon nanoparticles in incubation buffer, immediately applied and detected after one to several hours. Such mixed immuno-DNA formats have been used in lateral flow and microfluidic detection assays (Baeumner 2004; Blazkova et al. 2009; Blazkova et al. 2011; Corstjens et al. 2001; Koets et al. 2009; Kozwicz et al. 2000; Mens et al. 2008; Noguera et al. 2011; van Amerongen & Koets 2005; Wang et al. 2006). To get proof of concept for the use of carbon nanoparticles as signal labels in antibody microarrays we studied two applications in which the antigens consisted of double-tagged DNA amplicons: the detection of *L. monocytogenes* and the detection of three antibiotic resistance genes from *Salmonella* spp. (D'Agostino et al. 2004; van Hoek et al. 2005).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

NeutrAvidin Biotin-Binding Protein (neutravidin) and biotin-labelled bovine serum albumin were from Pierce Biotechnology (Perbio Science Nederland BV, Etten-Leur, The Netherlands); anti-digoxigenin antibody (α -DIG) and MgCl_2 were from Roche (Almere, The Netherlands); anti-texas red antibody (α -TxR) and goat anti-human immunoglobulin G (α -hIgG) were from Molecular Probes (Paisly, UK); anti-fluorescein antibody (α -FL) was obtained from Biomeda (Foster City, California, USA) and anti-dinitrophenol antibody (α -DNP) was from USBiological (Swampscott, USA). Human IgG, mouse IgG, Bovine serum albumin (BSA), essentially IgG free, and fluorescein isothiocyanate were from Sigma (Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, The Netherlands). Primers were from Eurogentec (Eurogentec Nederland bv, Maastricht, The Netherlands); dNTPs were from Pharmacia Biotech (GE Healthcare Europe GMBH, Branch office Benelux, Diegem, Belgium). Other chemicals were of the highest purity available and purchased from Merck (Amsterdam, The Netherlands).

2.2 Polymerase Chain Reaction

All PCRs were performed in the GeneAmp 9700 96 well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The resulting PCR products were analysed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the DNA 1000 kit.

Bacillus cereus: A set of primers was used to amplify part of the *gyrB1* gene sequence. The reverse primer was 5'-tagged with DIG and the forward primer with biotin. Primer sequences are shown in Table 1. The reaction mixture consisted of 1 μL *B. cereus* genomic DNA, 25 μL redTaq mastermix (Sigma), 10 pmol Rprimer, 10 pmol Fprimer, in a final reaction volume of 50 μL . The amplification reaction consisted of an initial denaturation step of 5 min at 94 $^{\circ}\text{C}$, and 30 cycles of each 30 s 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 55 $^{\circ}\text{C}$ and 1 min 72 $^{\circ}\text{C}$, followed by the final polymerisation at 74 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. In Fig. 1 a scheme of the technique is depicted.

Listeria spp.: A set of primers specific for *L. monocytogenes* was used to amplify a part (274 bp) of the *prfA* gene encoding the central virulence gene regulator as described (Blazkova et al. 2009). One of these primers was 5'-tagged with DIG and the other with biotin. To detect all *Listeria* species, a generic primer set for amplification of *Listeria* spp. has been selected (Herman et al. 1995), this primer set has been labelled with fluorescein/biotin.

Primer	Sequences	Tag	Specificity	Ref.
<i>gyrB</i> Bc1	5'-ATTGGTGACACCGATCAAACA-3'	Biotin	<i>B. cereus</i>	(Chen & Tsen 2002)
<i>gyrB</i> Bc2r	5'-TCATACGTATGGATGTTATTC-3'	DIG	<i>B. cereus</i>	(Chen & Tsen 2002)
<i>prfA</i> LIP1	5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC-3'	Biotin	<i>L. monocytogenes</i>	(D'Agostino et al. 2004)
<i>prfA</i> LIP2	5'-GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG G-3'	DIG	<i>L. monocytogenes</i>	(D'Agostino et al. 2004)
16S rRNA C	5'-AGG TTG ACC CTA CCG ACTTC-3'	Biotin	<i>Listeria</i> spp.	(Herman et al. 1995)
16S rRNA D	5'-CAA GGA TAA GAG TAA CTG C-3'	FL	<i>Listeria</i> spp.	(Herman et al. 1995)
<i>tet</i> (G)-F	5'-AAA GCC GGT TCG CAT CAA AC-3'	DNP	tetracycline resistance gene	Van Hoek, pers. comm.
<i>tet</i> (G)-R	5'-GGA AGA TCG CAT GTG TTG CC-3'	Biotin	tetracycline resistance gene	Van Hoek, pers. comm.
<i>aadA2</i> -F	5'-GCA GCG CAA TGA CAT TCT TG-3'	TxR	streptomycin resistance gene	(van Hoek et al. 2005)
<i>aadA2</i> -R	5'-CAT CCT TCG GCG CGA TTT TG-3'	Biotin	streptomycin resistance gene	(van Hoek et al. 2005)
<i>bla</i> _{PSE-1} -F	5'-CGC TAT CTG AAA TGA ACC AG-3'	DIG	β -lactam resistance gene	(van Hoek et al. 2005)
<i>bla</i> _{PSE-1} -R	5'-TTT CGC TCT GCC ATT GAA GC-3'	Biotin	β -lactam resistance gene	(van Hoek et al. 2005)

Table 1. Primer sequences used to amplify target microorganisms

S. typhimurium antibiotic resistance genes: The three resistance gene specific forward primers were 5'-tagged with a distinguishing tag: tetracycline with a DNP-tag, streptomycin with a TxR-tag and β -lactam with a DIG-tag. The reverse primers were labelled with a common biotin tag (Table 1). The amplification was performed using the Accu Prime PCR reaction kit (Invitrogen, Breda, The Netherlands). The reaction mixture consisted of 5 μ L 10x Accu Prime PCR buffer II, 10 pmol primer for the single analyte assay, 20 pmol primers for the multiplexed assay, 2.5 U Accu Prime Taq polymerase, 40 ng genomic DNA in a final volume of 50 μ L. Amplification was performed as follows: 30 s at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55.8 °C and 1 min at 68 °C. After 30 cycles, the mixture was kept at 72 °C for 7 min.

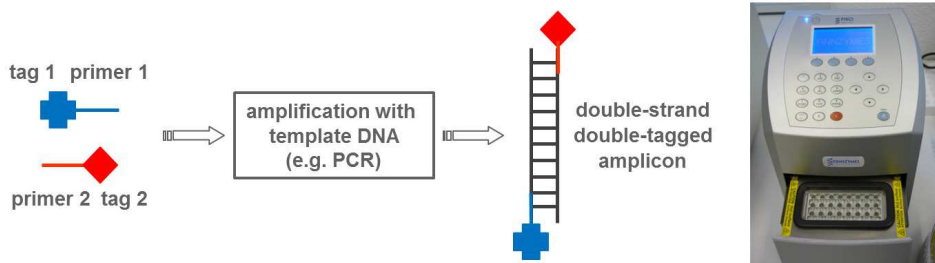


Fig. 1. Scheme of the amplification technique incorporating tags during amplification and a photograph of a low-cost and fast thermocycler to perform the amplification.

Primer sequences are shown in Table 1. The reaction mixture consisted of 2.5 mM MgCl_2 , 0.15 mM dNTP, 0.1 μM primers LIP1 and LIP2, 0.2 μM of primers C and D, 2 U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche, Almere, The Netherlands), 2 μL genomic DNA in a final volume of 25 μL . The amplification program consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 4 min, 25 cycles each having a denaturation step at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and polymerisation at 74 °C for 1 min, followed by the final polymerisation at 74 °C for 5 min.

2.3 Preparation of carbon nanoparticles – NeutrAvidin conjugate

Neutravidin was conjugated to colloidal nanoparticles as described in several patents by van Doorn et al. (van Doorn et al. 1987, 1996, 1997). Briefly, a colloidal carbon suspension (Spezial Schwartz 4, Evonik Degussa Industries AG, Essen Germany) was prepared as a stock at 1% (w/v) in demineralised water. The suspension was sonicated for 5-10 min on ice using a Branson model 250 sonifier (output control 3~27 W, 20 KHz). This carbon suspension was diluted five times with 5 mM borate buffer pH 8.8 to give a carbon concentration of 0.2% (w/v), and sonicated for a second time as above. Neutravidin dissolved in 5 mM borate buffer pH 8.8 was added to the diluted colloidal carbon suspension at a concentration of 350 μg of protein per mL of suspension. The pH was readjusted to pH 8.8 and the mixture was incubated overnight by end-over-end mixing at 4 °C. Neutravidin-carbon conjugate was washed two times in a 5 mM borate buffer, pH 8.8, containing 1% (w/v) BSA, and re-suspended and stored in a 100 mM borate buffer, pH 8.8, containing 1% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) NaN_3 as a 0.2% (w/v) carbon suspension.

2.4 Preparation of microarrays

Antibodies and other proteins were spotted on microscope glass slides by means of a TopSpot device (BioFluidix GmbH, Freiburg, Germany) (de Heij et al. 2004), which is a non-contact printing method. A 24-channel print head was employed for delivering ≈ 1 nL droplets onto a substrate from which immobilisation of anti-tag antibody and other proteins was allowed to take place (Fig. 2). This resulted in an array of 4×6 protein spots with a pitch of 500 μm . Spot diameters are variable and depend on the type of protein, type of substrate, and printing buffer composition and viscosity. In between printing runs the print head was cleaned by ultrasonic treatment for 10 minutes in a 0.12 M NaOH/1% (v/v) Triton X-100 cleaning solution.



Fig. 2. The Topspot/E (left) and the formation of droplets from the print head (right).

Three different, commercially obtained, types of glass substrates were used. Antibody arrays of α -DIG, α -FL, α -TxR, and α -DNP were prepared on these very types of substrate as follows:

1. UltraStick slides (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA): 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES)-modified glass consisting of a monolayer functionalized with primary amino groups useful for adsorption of proteins. Printing was performed using different concentrations of human IgG, anti-DIG antibody and FL-labelled mouse IgG in PBS. Immediately after arraying, the slides were placed in a humidity chamber and incubated at room temperature for 30 min in order to allow protein adsorption to proceed. Care was taken to prevent any drying of the spotted droplets. After incubation, the slides were flushed extensively with washing solution (10% (w/v) BSA in Phosphate Buffered Saline (PBS)) and arrays were kept covered with fresh washing solution for 10 minutes. Usage of this high protein containing washing solution is essential in order to prevent the smearing of the surplus IgG that had not adsorbed in the first step. Slides containing human IgG spots were incubated with FL-labelled anti-human IgG. Finally, the slides were rinsed quickly with PBS and MilliQ before being dried under a gentle stream of nitrogen gas. After completion of the procedure, the arrays containing the FL-labelled IgGs were observed by fluorescence microscopy employing an inverted Olympus IX51 microscope equipped with a mercury arc in combination with an Olympus U-MWB2 filter. Images were taken with a digital ColorViewII CCD camera (Soft Imaging Systems, Münster, Germany).
2. SL HCX slides (XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf, Germany): contain an attached layer of N-hydroxysuccinimide-activated carboxylated hydrogel (<5 μ m thick), attached to borosilicate glass, that can be used for covalent coupling of proteins. Printing was done with different concentrations of anti-DIG and anti-FL antibody in PBS. Directly after printing the array was incubated for 4 h in a humidity chamber at room temperature. After immobilization, any residual activated groups on the slide surface were quenched by reaction for 10 min with ethanolamine (1 M, pH 8.0) at room temperature. After quenching, the slides were rinsed quickly with MilliQ and, finally, the slides were dried by applying a gentle stream of nitrogen gas.
3. FAST™ 16 slides (Whatman Nederland BV, 's-Hertogenbosch, The Netherlands): on a standard microscope slide are positioned two rows of eight pads (5x5 mm) of an 11 μ m thick microporous (0.2 μ m pore size) nitrocellulose film for irreversible adsorption of proteins. Arrays of different concentrations and combinations of anti-DIG, anti-FL, anti-TxR, and anti-DNP antibodies were spotted on FAST16 slides. Printing buffer was 5 mM borate buffer, pH 8.8. Immediately after printing the slides were put in an incubator at 37 °C for 3 hours. No blocking step was used.

2.5 Amplicon detection assay

Incubations were performed in a dedicated slide holder with varying amounts (0.5-2 μ L) (0.2% w/v) of colloidal carbon nanoparticles with immobilised neutravidin (Fig. 3a) and varying amounts (25, 50 or 75 μ L) of incubation buffer (100 mM borate, 1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween20, 0.02% (w/v) NaN₃, pH 8.8). Following the incubation, positive spots could be easily detected (Fig. 3b) when amplicons were sandwiched between anti-tag antibodies and (black) carbon-neutravidin particles as shown Fig. 3b,c. Control spots (no antibody printed) were used as negative controls. Arrays were recorded by conventional flatbed scanning using an Epson 3200 Photo scanner (Seiko Epson, Nagano, Japan). The

Pixel Grey Volume of positive spots were obtained using image analysis software (TotalLab, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Microsoft Excel and SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) were used for subsequent data analysis and visualisation of the results.

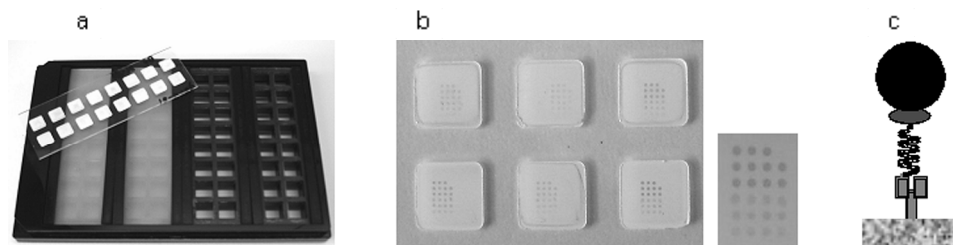


Fig. 3. Overview of antibody microarray tools and the test layout: a) holder for 4 slides with incubation chamber set-up (16 per slide); b) example of six membranes with 24 spot arrays; c) drawing of part of the nitrocellulose membrane with anti-tag antibody, 2-tagged amplicon and neutravidin-coated carbon nanoparticle (not to scale).

3. Results and discussion

3.1 Antibody microarray printing and quality

One of the advantages of non-contact as compared to contact (pin based and other) printing methods is the inherently lower risk of damaging the substrate surface, which is especially relevant in the case of more fragile structures. This added property is expected to benefit the quality, functionality and reproducibility of the fabricated microarrays.

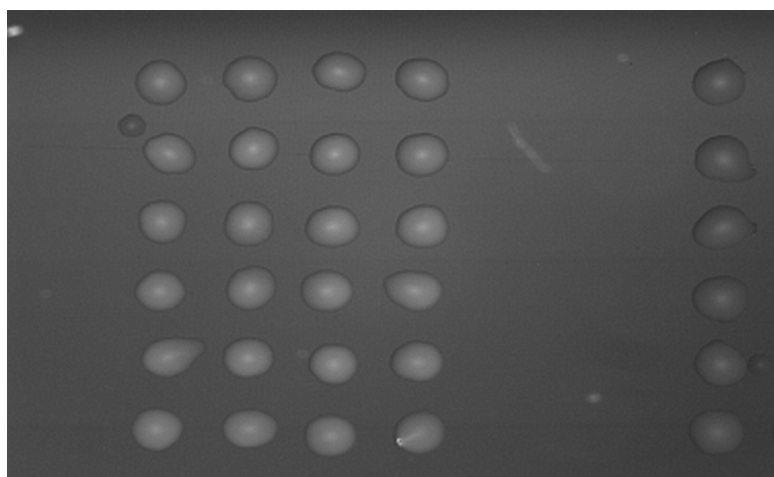


Fig. 4. Droplet microarray obtained after printing of 40% (v/v) glycerol/water onto bare unmodified glass as observed by light microscopy.

Unmodified, clean glass has a very hydrophilic nature leading to a tendency for droplets to spread out on the surface and, as a result, to touch each other and to coalesce. This can be overcome by using higher viscosity printing media, for example, 40% (v/v) glycerol in water. Printing of this solution onto bare glass delivers a nice regular droplet array as shown by the light microscopic image of Fig. 4.

UltraStick slides, on the other hand, are useful substrates for printing of low viscosity solutions, even pure water, with no drop coalescence occurring and thereby yielding a proper array structure. The same is valid, to some lesser degree, for the SL HCX slides.

Interestingly, IgG, BSA and other proteins (e.g., fosforylase B, cytochrome C, streptavidin and neutravidin) tend to adsorb spontaneously onto the UltraStick slide surface. This adsorption is rather strong stemming from the observation that ultrasonic treatment (for 20 min) and long soaking (for up to 2 days) in detergent solution (5% Tween-20 in PBS) did not lead to a significant extent of protein desorption.

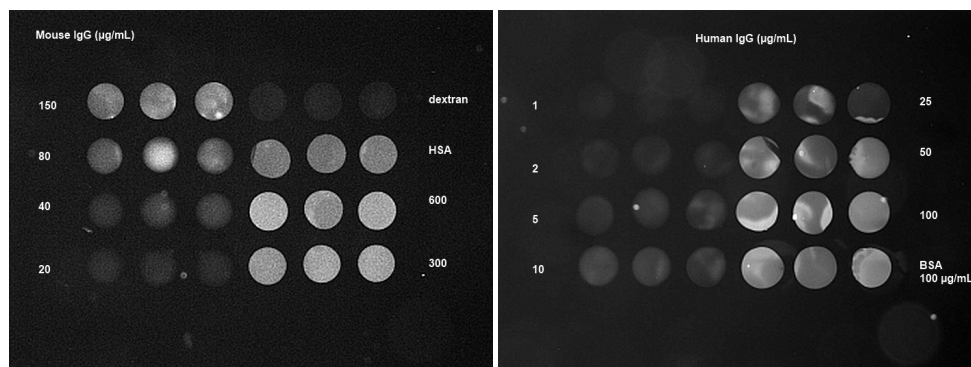


Fig. 5. Fluorescence micrographs of antibody microarrays obtained after printing (in triplicate) of different antibody concentrations on UltraStick slides. Left panel: fluorescein-labelled Mouse IgG; Right panel: array obtained after printing with human IgG and consecutive incubation of the printed array with fluorescein-labelled goat anti-human IgG. Fluorescein-labelled HSA, BSA and dextran were used as references.

The fluorescence images obtained with arrays of fluorescein-labelled mouse IgG are shown in Fig. 5, left panel. Spot fluorescence intensity increased with increasing printing concentration, in the range from 20 to 300 $\mu\text{g/mL}$.

However, immobilised protein already appeared to be present after printing and incubation at much lower printing concentrations (down to 1 $\mu\text{g/mL}$). This was deduced from an amplified detection test in which mouse IgG arrays were incubated with fluorescein-labelled detecting antibody (anti-mouse IgG) (Fig. 5, right panel).

The reproducibility of printing on the UltraStick slides, as judged by fluorescence microscopy on a large number of arrays, seemed to be low. A lot of variation was seen in brightness and brightness pattern when comparing spots.

3.2 Amplicon detection assay

3.2.1 Introduction

A series of experiments was performed with *Bacillus cereus* amplicons to evaluate the signal on three types of microscope slides: UltraStick slides, SL HCX slides and nitrocellulose-coated FAST16 slides.

On nitrocellulose FAST16 slides the detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* 16S rRNA amplicons was optimised for critical parameters such as stirring speed, incubation volume and time, amount of carbon suspension, amount of antibody printed and amount of PCR product added. On the same slides incubations were performed to detect several antibiotic resistance genes from *Salmonella* spp. The specific amplicons were discriminated by using various tags and the antibodies to those tags were spotted in a distinguishing pattern.

3.2.2 Choice of target substrate

A comparison was made between the final yields obtained with UltraStick slides (APTES surface), XanTec slides (pre-activated hydrogel coating) and Whatman FAST16 slides (coated with nitrocellulose). Different amounts of tagged amplicons of *B. cereus* were mixed with various volumes of 0.2% (w/v) colloidal carbon nanoparticles-neutravidin conjugate in a total volume of 70 μL and incubated at room temperature for 7.5 min to several hours. Initial results indicated that approximately 0.5 to 2 μL of PCR material, 1 μL carbon conjugate and incubation for 15 min to 1 hour is sufficient to obtain significant results by flatbed scanning and image analysis (Fig. 6). Although these results with UltraStick seemed fine in first instance, they were not very reproducible and the response faded very soon after incubation.

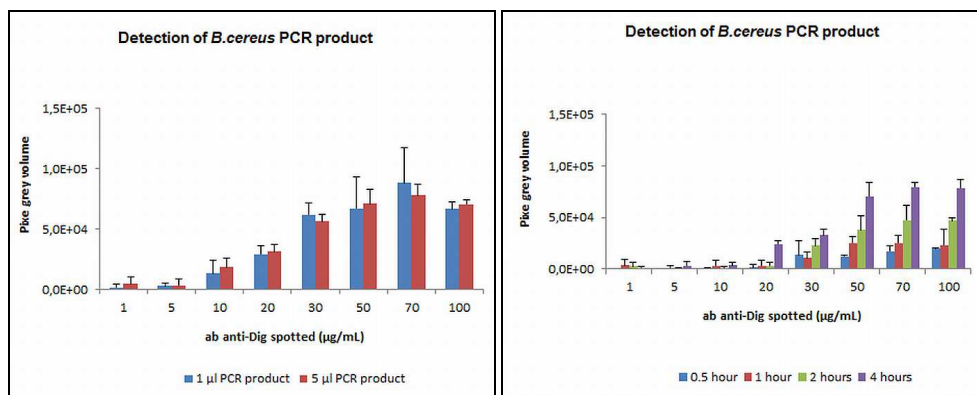


Fig. 6. Antibody microarray with serial dilutions of printed antibodies on UltraStick target. Left panel: influence of amount of amplicon added and antibody concentration, 1 μL carbon conjugate, 4 hours incubation time; Right panel influence of antibody concentration and incubation time, 1 μL of carbon conjugate and 1 μL of amplicon.

The SL HCX hydrogel slides did not deliver much signal in the amplicon detection assay even when larger printing concentrations of IgG (up to 4000 $\mu\text{g/mL}$) were applied during

the preliminary step of array fabrication. Spots became increasingly visible in the concentration range of 400 up to 3000 $\mu\text{g/mL}$, but even then the response remained modest.

The results with the activated hydrogel SL HCX slides were very disappointing, since it was expected that due to its larger loading capacity and presumed lower non-specific binding, the use of such a gel layer could be advantageous compared to a planar sensor surface. Unfortunately, it was not possible to assess the level of porosity of the gel layer and, therefore, it cannot be excluded that it may have limited accessibility for carbon nanoparticles ($\varnothing$ 100-200 nm). This is supported by our report of a restricted accessibility of sensor hydrogel surfaces toward latex beads (Besselink et al. 2004) that have a size comparable to that of the carbon nanoparticles used in the present study.

Results with Whatman FAST16 slides were promising (Fig. 3b). This was a little bit unexpected considering its behaviour during antibody printing. The hydrophilic coating on the FAST16 slides showed very fast absorption and migration of the liquid from spotted droplets always leading to an extensive overlap of fluid area between neighbouring spots. Nevertheless, in the end, well defined spots were obtained with the colloidal carbon/amplicon test. Apparently, adsorption of antibody (proteins) to the nitrocellulose substrate is an instantaneous process. FAST16 slides were used in all further experiments.

3.2.3 Single - analyte detection using the antibody microarray

Increasing the stirring speed from 100 to 500 min^{-1} revealed that the influence of stirring speed on the final signal is only marginal, at least for the speeds applied (Fig. 7). The stirring speed of 300 min^{-1} was used in all further experiments. It is shown here that the response is increasing with increasing antibody concentration up to a concentration of 333 $\mu\text{g/mL}$.

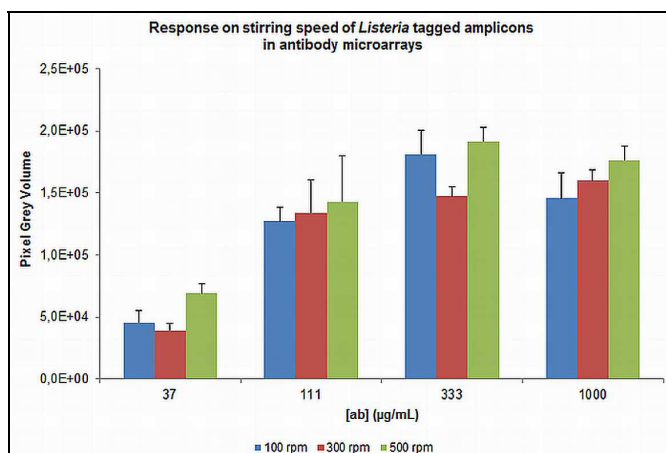


Fig. 7. Influence of stirring speed on pixel grey level, shown for different antibody concentrations, 1 μL of carbon-neutravidin conjugate, 1 μL of DIG-tagged *Listeria* amplicons, 25 μL total incubation volume and 30 min incubation time.

A series of incubation times of 7.5 to 60 min revealed that 30 min was sufficient to statistically discriminate between different spots if 1 μL of amplicon was added (Fig. 8). As

measured with the Bioanalyzer this volume corresponded to 31.5 ng DNA in the *Listeria monocytogenes* amplicon solution and to 41 ng in the *Listeria* spp. amplicon solution.

In another experiment the incubation buffer amount varied from 25, 50 to 75 μL , which revealed that 25 μL is enough for a good and reproducible response, although 75 μL is advised by the supplier and, indeed, more convenient. In addition, nitrocellulose pads were better wetted with 75 μL as compared to 25 μL total volume.

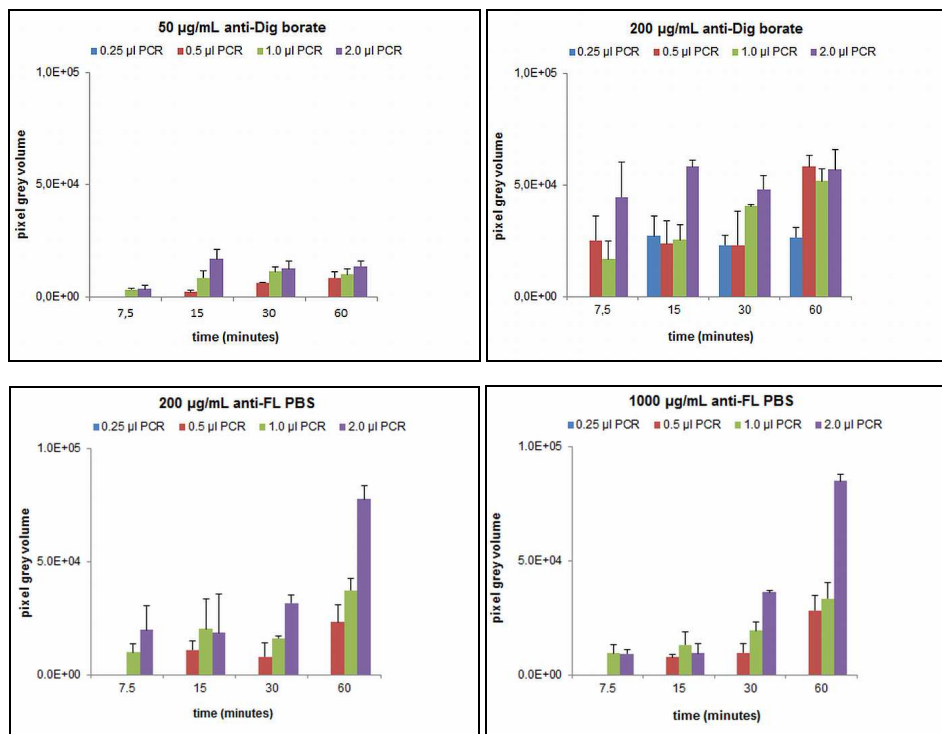


Fig. 8. Influence of incubation time and amount of added amplicon *Listeria monocytogenes* with DIG as label and *Listeria* spp. with FL as label. Two concentrations of antibody were spotted with two different printing buffers.

The amount of amplicon added varied from 0.5, 1 to 2 μL , where 1 μL was sufficient to give a good signal, corresponding to an amount of 20-300 fmol sample DNA with similar concentrations of DNA in both samples (31.5 vs. 41 ng DNA/ μL for *Listeria monocytogenes* amplicon solution and the *Listeria* spp., respectively). Increasing the concentration of the printed antibody showed an optimum for 333 $\mu\text{g/mL}$ for this combination of labelled amplicon and antibody.

A summary of the influence of buffer volume, antibody concentration and incubation time is shown in Fig. 9 for digoxigenin and in Fig. 10 for fluorescein as a tag. In the case of the anti-DIG antibody signal intensity increased upon printing more antibody molecules per spot up to a concentration of 333 $\mu\text{g/mL}$. For the influence of the anti-FL antibody concentration no

clear conclusions could be drawn. In addition, the total incubation volume was not of much influence, which was similar in the anti-DIG incubations. Whereas in the incubations with the anti-DIG antibody the signal intensity was higher in the 30 minutes as compared to the 10 minutes incubation, no differences could be seen in the case of the anti-FL antibody.

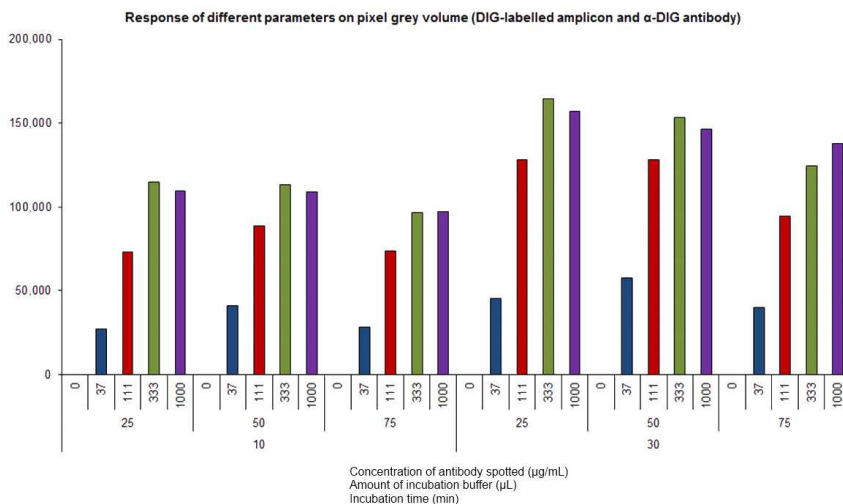


Fig. 9. Influence of the α -DIG antibody concentration (37, 111, 333, or 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), incubation time (10 or 30 min) and volume (25, 50 or 75 μL from left to right) using 1 μL of the amplicon of *L. monocytogenes* labelled with biotin and DIG, 1 μL of carbon-neutravidin conjugate, a stirring speed of 300 min^{-1} , and two incubation times: 10 min or 30 min.

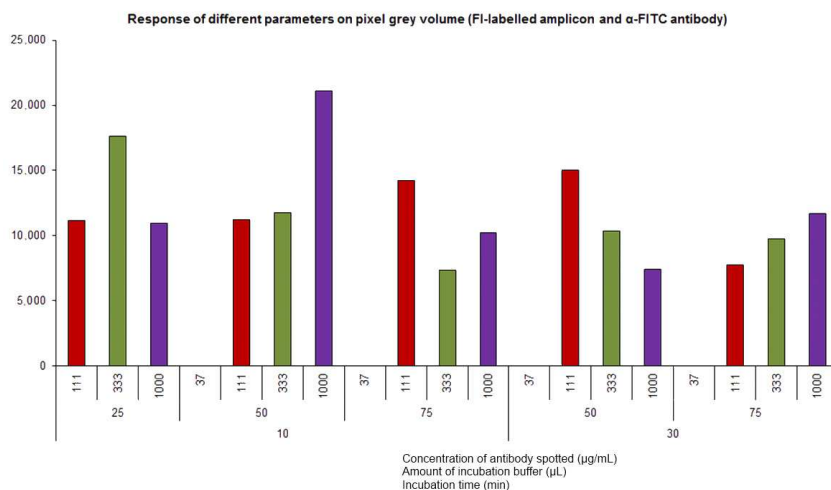


Fig. 10. Influence of the α -FL antibody concentration (37, 111, 333, or 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$); conditions as described under Figure 9 except for the amplicon: 1 μL of the amplicon of *Listeria* 16S RNA labelled with biotin and fluorescein.

Obviously, optimisation of a microarray immunoassay is dependent on the particular antibodies used and, hence, should be a compromise to enable acceptable sensitivity of all targets involved.

In addition, only PBS was used as a printing buffer, since from the preceding and other (not shown) experiments it was concluded that the results in PBS and in 100 mM borate pH8.8 were very similar. Since commercial antibodies are often shipped in or lyophilized from PBS it was decided to use this buffer in all further experiments.

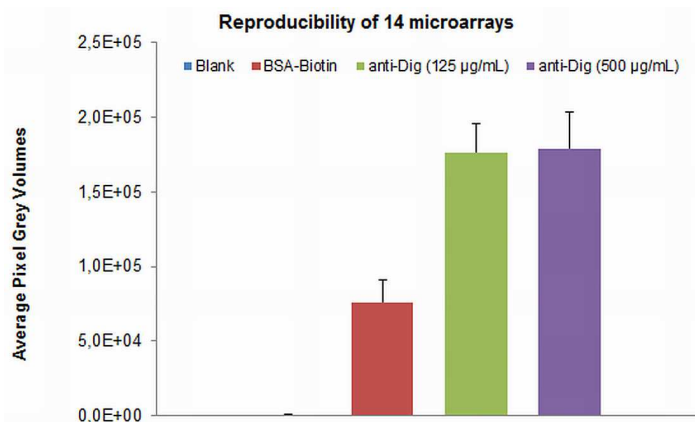


Fig. 11. Reproducibility of a FAST16 slide microarray with 1 μL of a *L. monocytogenes* amplicon using biotin and DIG as the tags, 14 arrays with 9 spots each of BSA-biotin, α -DIG 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, α -DIG 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1 μL of carbon conjugate. The total volume was 25 μL and samples were incubated for 30 min at a stirring speed of 300 min^{-1} .

The reproducibility of the assay using the above-mentioned optimized parameters was evaluated using 14 individual microarrays with nine spots each of BSA-biotin (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), α -DIG (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and α -DIG (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Amplicons used were 1 μL of the DIG-labelled *L. monocytogenes* type, 1 μL of the carbon-conjugate suspension in a total volume of 25 μL . Incubation time was 30 min. Blanks were evaluated using empty spots. Results are shown in Fig. 11. An intra-assay standard error of less than 10% was achieved and an inter-assay standard error of less than 20% was calculated. These results clearly show the reproducibility of the test.

Optimisation of several parameters in the three-analyte approach was performed using the amplified products of *S. typhimurium* antibiotic resistance genes (Table 1). Serial dilutions of α -TxR, α -DIG or α -DNP antibody (1000, 500, 250, 125, 62.5 or 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were printed. Judged from a fixed amount of carbon-neutravidin conjugate (1 μL) and serial dilutions of amplicon (0.125, 0.5, 1, or 2 μL), 1 μL of each of the amplicons proved to be optimal for a good response (Fig. 12), although 0.125 μL could be positively scored in all cases as well. Based on a fixed amount of amplicon (i.e., 1 μL) and serial dilutions of carbon-neutravidin conjugate (0.5, 1, 2, 4 μL) the optimal amount of the carbon-neutravidin conjugate suspension was 1-2 μL at antibody concentrations of 125-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig 12).

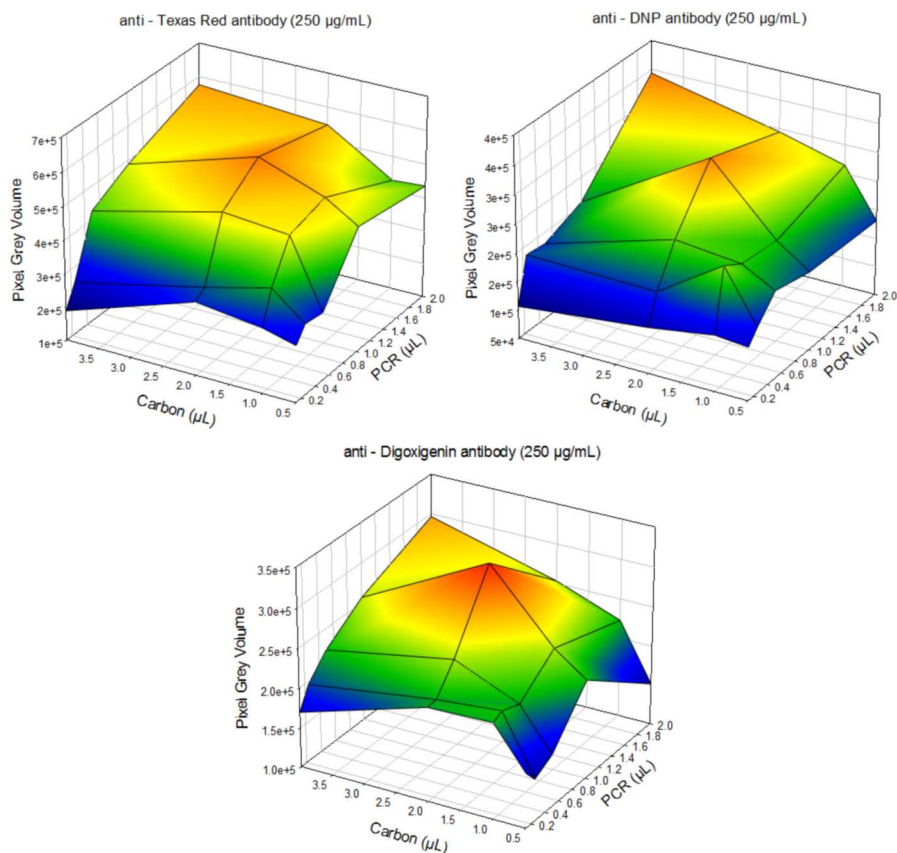


Fig. 12. Contour plots of the influence of addition of amount of amplicon and carbon-neutravidin conjugate. Initial results of individual additions of the tagged amplicons of some of the *Salmonella* antibiotic resistance genes. Shown here are the products tagged with texas red (left upper panel), dinitrophenol (right upper panel) and digoxigenin (lower panel).

3.2.4 Three - analyte detection using the antibody microarray

The response of the addition of a mixture of the individually amplified and labelled antibiotic resistance genes is shown in Fig. 13. No quantification of the DNA content of the amplicons was made, and 0.5 μL of each amplicon was added to each well. Serial dilutions of antibodies printed showed a concentration-dependent response for every amplicon-antibody pair. The total volume was 25 μL and the samples were incubated for 30 min, however, in this case 2 μL of the carbon conjugate suspension was used.

Signals with the anti-DNP antibodies were twice as high as those with the other anti-tag antibodies and the optimal antibody concentration appeared to be 125 to 250 $\mu\text{g/mL}$.

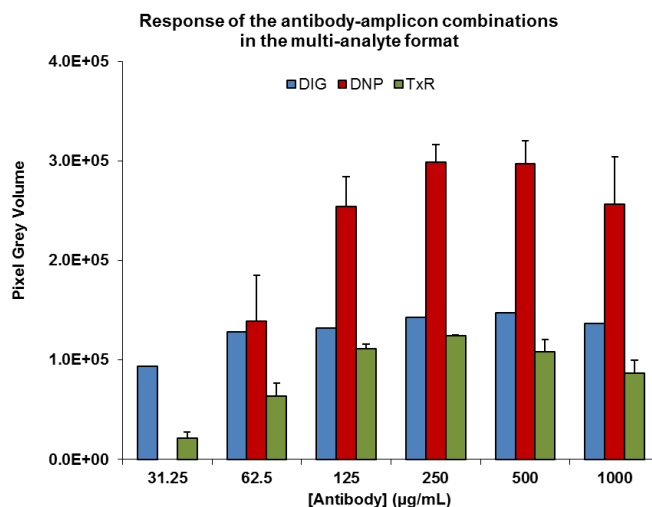


Fig. 13. Response of the multi-analyte format when serial dilutions of the three antibodies were spotted. Incubation was done with addition of 0.5 µL of each of the *Salmonella* amplicons of the antibiotic resistance genes, 2 µL of carbon conjugate suspension in 25 µL of incubation volume. Incubation time was 30 min.

Tagged amplicons added			Pixel Grey Volume		
Dig	DNP	TxR	α-Dig	α-DNP	α-TxR
-	-	-	0	0	0
+	+	+	1.3x10 ⁵	2.5x10 ⁵	1.1x10 ⁵
+	-	-	1.6x10 ⁵	0	0
-	+	-	0	3.4x10 ⁵	0
-	-	+	0	0	1.5x10 ⁵
+	+	-	1.7x10 ⁵	3.0x10 ⁵	0
+	-	+	1.6x10 ⁵	0	1.5x10 ⁵
-	+	+	0	3.2x10 ⁵	1.1x10 ⁵

Table 2. Specificity in the three-analyte test (PGV average of 2 tests).

To study whether the simultaneous presence of various targets could be detected in the microarray an experiment was done in which the amplicons, each having a specific DNP, DIG, or TxR tag, were incubated in different combinations. Fixed amounts of anti-tag antibodies were used (125 µg/mL for each of the antibodies). The results are presented in Table 2. In all cases the presence of a particular amplicon resulted in a high-intensity spot with PGV > 1x10⁵. In the absence of a particular amplicon no PGV was detected. Hence, all scores correctly indicated the composition of the various samples.

The most optimal parameters in this format are summarised in Table 3. With minimal volume of 1 µL of amplicon (containing 20 to 30 fmol DNA after amplification), a printing

volume of 1 nL containing 125-250 pg of antibody (absolute amount) and low-cost resources it is possible to discriminate between three antibiotic resistance genes from *Salmonella* spp.

Stirring speed	300 min ⁻¹
Incubation time	30 min
Volume	25 to 50 µL
Antibody spotted	125-250 µg mL ⁻¹
Carbon nanoparticles	2 µL
PCR amplicon (20 to 30 fmol; 20 to 300 nmol L ⁻¹)	1 µL

Table 3. Most optimal parameters in the 3-analyte format.

3.3 Costs

Assuming the end-user obtains printed antibody microarrays several costs have to be taken into account. Kits for DNA extraction should be purchased, although recent advances allow for direct PCR on samples if very robust polymerases are being used. Furthermore, some hard- and software is obligatory. These consist of a thermocycler, a personal computer with flatbed scanner or CCD camera and image analysis software. The price of the chemicals (conjugate, PCR reagents) is less than 1 euro per slide. However, one should realize that applications as outlined above, when applied in resource-poor settings, at least need the availability of electricity.

4. Conclusions and future research

Carbon nanoparticles with adsorbed neutravidin are suitable as label in nitrocellulose-based antibody microarrays. The versatility has been shown using different types of microorganisms. The format is generic; the only discriminating factor is the sequence of the primers used in the amplification step and the use of the discriminating tag/antibody combination. Although much more space is available on the nitrocellulose pads (5x5 mm) we used 4x6 arrays with spots of about 200 µm in diameter to study the applicability of the carbon nanoparticles. Unfortunately, there is a paucity in tags and/or their corresponding antibodies that can be used to discriminate between all kinds of food pathogens. Increasing the availability of label/antibody combinations will be a significant improvement in the multi-analyte character of the microarray test procedure as described here.

The best surface for the microarrays as developed in this study is the FAST16 slide with 16 nitrocellulose membranes. We did not have to block the membranes in advance, as is generally done (Jonkheijm et al. 2008). Nevertheless, this one-step procedure resulted in a complete absence of background signal (Fig. 11).

The sensitivity of the proposed microarray procedure with carbon nanoparticles can be improved when a fusion product of neutravidin and enzyme is adsorbed onto the nanoparticles. To this end, neutravidin - alkaline phosphatase and - horseradish peroxidase products are commercially available. Carbon nanoparticles can be labelled with these protein fusion products and specific interaction of these conjugates with biotin-labelled targets results in the presence of a large number of enzyme molecules at the spot. A short, additional incubation step with a precipitating substrate (10 min) substantially increases the

signal due to the formation of a precipitable dye on the spot. Preliminary experiments in our laboratory indicate that the sensitivity (PGV) can be increased by a factor 5 to 10.

Nowadays, various nanoparticles are used in diagnostics, i.e. quantum dots, dye-doped silica, noble metals, and magnetic particles as reviewed (Gomez-Hens et al. 2008). Lönnberg and Carlsson were the first to combine carbon nanoparticles with flatbed scanning (Lönnberg & Carlsson 2001). Some other authors also mentioned the use of flatbed scanning using gold nanoparticles (Han et al. 2003; Sun et al. 2007; Taton et al. 2000) or enzyme (Petersen et al. 2007). Inexpensive flatbed scanners and CCD-based detectors open new opportunities to develop microarray applications, even for low-facility laboratories and under field conditions (Rasooly & Herold 2008). Even a visual read-out of the signal is possible when coloured nanoparticles are being used as is valid for the carbon nanoparticles in this study. On the other hand, battery-powered hand-held microarray readers for evaluation of the signal are readily available as well. Since shaking can even be omitted (results not shown) the method can easily be made available to resource-poor settings.

Antibody microarrays are especially applicable when intermediate numbers of samples have to be assayed, application at point of care/need is required, when costs play an important role and highly trained personnel is not available. The presented procedure with signal generation by carbon nanoparticles meets these characteristics.

5. Acknowledgement

The generous gift of *Salmonella* template from Dr A.H.A.M. van Hoek and Dr H.J.M. Aarts (RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre, The Netherlands) is gratefully acknowledged.

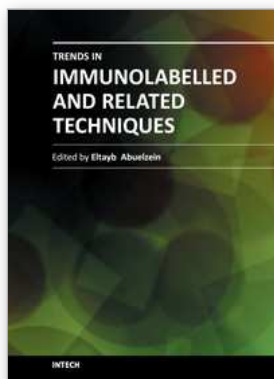
6. References

- Aldus, C.F., et al. (2003). Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 95, No. 2, (August 2003), pp, 380-389, ISSN 1364-5072
- Askar, M., et al. (2011). Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O104, Germany, May 2011. *Eurosurveillance*, Vol. 16, No. 22, (May 2011), pp, pii=19883, ISSN 1560-7917
- Baeumner, A.J. (2004). Nanosensors identify pathogens in food. *Food Technology*, Vol. 58, No. 8, (August 2004), pp, 51-55, ISSN 0015-6639
- Besselink, G.A.J., et al. (2004). Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen. *Analytical Biochemistry*, Vol. 333, No. 1, (October 2004), pp, 165-173, ISSN 0003-2697
- Blazkova, M., et al. (2009). Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in food. *European Food Research and Technology*, Vol. 229, No. 6, (October 2009), pp, 867-874, ISSN 1438-2377
- Blazkova, M., et al. (2011). Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 26, No. 6, (February 2011), pp, 2828-2834, ISSN 0956-5663

- Capps, K.L., et al. (2004). Validation of three rapid screening methods for detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in foods: Interlaboratory study. *Journal AOAC International*, Vol. 87, No. 1, (January 2004), pp, 68-77, ISSN 1060-3271
- Chen, M.L. & Tsen, H.Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 92, No. 5, (May 2002), pp, 912-919, ISSN 1365-2672
- Corstjens, P., et al. (2001). Use of up-converting phosphor reporters in lateral-flow assays to detect specific nucleic acid sequences: A rapid, sensitive DNA test to identify human papillomavirus type 16 infection. *Clinical Chemistry*, Vol. 47, No. 10, (October 1, 2001), pp, 1885-1893, ISSN 0009-9147
- D'Agostino, M., et al. (2004). A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 8, (August 2004), pp, 1646-1655, ISSN 0362-028X
- de Heij, B., et al. (2004). Highly parallel dispensing of chemical and biological reagents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 378, No. 1, (August 2004), pp, 119-122, ISSN 1618-2642
- Dieterle, F. & Marrer, E. (2008). New technologies around biomarkers and their interplay with drug development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 390, No. 1, (January 2008), pp, 141-154, ISSN 1618-2642
- Frank, C., et al. (2011). Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Eurosurveillance*, Vol. 16, No. 21, (May 2011), pp, pii=19878, ISSN 1560-7917
- Glynn, B., et al. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 59, No. 2, (May 2006), pp, 126-139, ISSN 1471-0307
- Gomez-Hens, A., et al. (2008). Nanostructures as analytical tools in bioassays. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 5, (May 2008), pp, 394-406, ISSN 0165-9936
- Gordon, J. & Michel, G. (2008). Analytical sensitivity limits for lateral flow immunoassays. *Clinical Chemistry*, Vol. 54, No. 7, (July 2008), pp, 1250-1251, ISSN 0009-9147
- Han, A., et al. (2003). Detection of analyte binding to microarrays using gold nanoparticle labels and a desktop scanner. *Lab on a Chip*, Vol. 3, No. 4, (September 2003), pp, 329-332, ISSN 1473-0197
- Hartmann, M., et al. (2009). Protein microarrays for diagnostic assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 393, No. 5, (March 2009), pp, 1407-1416, ISSN 1618-2642
- Herman, L.M.F., et al. (1995). A multiplex PCR method for the identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in dairy samples. *Journal of Food Protection*, Vol. 58, No. 8, (August 1995), pp, 867-872, ISSN 0362-028X
- Jonkheijm, P., et al. (2008). Chemical strategies for generating protein biochips. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 47, No. 50, (December 2008), pp, 9618-9647, ISSN 1521-3773
- Kalogianni, D.P., et al. (2011). Carbon nano-strings as reporters in lateral flow devices for DNA sensing by hybridization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 400, No. 4, (May 2011), pp, 1145-1152, ISSN 1618-2642

- Koets, M., et al. (2006). A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. *Journal of Environmental Monitoring*, Vol. 8, No. 9, (July 2006), pp, 942-946, ISSN 1464-0325
- Koets, M., et al. (2009). Rapid DNA multi-analyte immunoassay on a magneto-resistance biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 24, No. 7, (March 2009), pp, 1893-1898, ISSN 0956-5663
- Koets, M., et al. (2011). Rapid one-step assays for on-site monitoring of mouse and rat urinary allergens. *Journal of Environmental Monitoring*, Vol. 13, No. 12, (November 2011), pp, 3475-3480, ISSN 1464-0325
- Kostrzynska, M. & Bachand, A. (2006). Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 52, No. 1, (January 2006), pp, 1-8, ISSN 0008-4166
- Kozwicz, D., et al. (2000). Development of a novel, rapid integrated *Cryptosporidium parvum* detection assay. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 7, (July 1, 2000), pp, 2711-2717, ISSN 0099-2240
- Lonnberg, M. & Carlsson, J. (2001). Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner. *Analytical Biochemistry*, Vol. 293, No. 2, (May 2001), pp, 224-231, ISSN 0003-2697
- Lonnberg, M., et al. (2008). Ultra-sensitive immunochromatographic assay for quantitative determination of erythropoietin. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 339, No. 2, (December 2008), pp, 236-244, ISSN 0022-1759
- Mandal, P.K., et al. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *American Journal of Food Technology*, Vol. 6, No. 2, (July, 2010), pp, 87-102., ISSN 1557-4571
- Mens, P.F., et al. (2008). Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium* spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 61, No. 4, (May 2008), pp, 421-427, ISSN 0732-8893
- Noguera, P., et al. (2011). Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 399, No. 2, (October 2010), pp, 831-838, ISSN 1618-2642
- Petersen, J., et al. (2007). Detection of mutations in the [beta]-globin gene by colorimetric staining of DNA microarrays visualized by a flatbed scanner. *Analytical Biochemistry*, Vol. 360, No. 1, (January 2007), pp, 169-171, ISSN 0003-2697
- Posthuma-Trumpie, G.A., et al. (2008). On the development of a competitive Lateral Flow ImmunoAssay for progesterone: Influence of coating conjugates and buffer components. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 392, No. 6, (November 2008), pp, 1215-1223, ISSN 1618-2642
- Posthuma-Trumpie, G.A., et al. (2012). Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 402, No. 2, (January 2012), pp, 593-600, ISSN 1618-2642
- Rasooly, A. & Herold, K.E. (2008). Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol. 5, No. 4, (August 2008), pp, 531-550, ISSN 1535-3141

- Sun, Y., et al. (2007). Label-free detection of biomolecules on microarrays using surface-colloid interaction. *Analytical Biochemistry*, Vol. 361, No. 2, (February 2007), pp, 244-252, ISSN 0003-2697
- Taton, T.A., et al. (2000). Scanometric DNA Array Detection with nanoparticle probes. *Science*, Vol. 289, No. 5485, (September 2000), pp, 1757-1760, ISSN 00368075
- Timlin, J.A. (2006). Scanning microarrays: Current methods and future directions, In: *Methods in Enzymology*, O. Alan Kimmel and Brian, (Ed), 79-98, Academic Press, ISBN 978-0-12-182816-5, Amsterdam, The Netherlands
- van Amerongen, A., et al. (1993). Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods: Quantitative computer image analysis of results. *Journal of Biotechnology*, Vol. 30, No. 2, (August 1993), pp, 185-195, ISSN 0168-1656
- van Amerongen, A., et al. (1994). Quantitative computer image analysis of a human chorionic gonadotropin colloidal carbon dipstick assay. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 229, No. 1-2, (September 1994), pp, 67-75, ISSN 0009-8981
- van Amerongen, A. & Koets, M. (2005). Simple and rapid bacterial protein and DNA diagnostic methods based on signal generation with colloidal carbon particles, In: *Rapid Methods for Biological and Chemical Contaminants in Food and Feed*, A. van Amerongen, D. Barug, M. Lauwaars, (Ed), 105-126, Wageningen Academic Publishers, ISBN 9076998531, Wageningen
- van Dam, G.J., et al. (2004). Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 12, (December 1, 2004), pp, 5458-5461, ISSN 0095-1137
- van Doorn, A.W.J., et al. (1987). Immunodetermination using non-metallic labels. International Patent Number: 0321008 B1, European Union
- van Doorn, A.W.J., et al. (1996). Method for determining the presence of analyte using a stable colloidal carbon sol. International Patent Number: 5,529,901, United States of America
- van Doorn, A.W.J., et al. (1997). Stable aqueous carbon sol composition for determining analyte. International Patent Number: 5641689, United States of America
- van Hoek, A.H.A.M., et al. (2005). Detection of antibiotic resistance genes in different *Salmonella* serovars by oligonucleotide microarray analysis. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 62, No. 1, (July 2005), pp, 13-23, ISSN 0167-7012
- Venkatasubbarao, S. (2004). Microarrays - status and prospects. *Trends in Biotechnology*, Vol. 22, No. 12, (December 2004), pp, 630-637, ISSN 0167-7799
- Volokhov, D., et al. (2002). Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 12, (December 2002), pp, 4720-4728, ISSN 0095-1137
- Wang, J., et al. (2006). A disposable microfluidic cassette for DNA amplification and detection. *Lab on a Chip*, Vol. 6, No. 1, (December 2005), pp, 46 - 53, ISSN 1473-0197



Trends in Immunolabelled and Related Techniques

Edited by Dr. Eltayb Abuelzein

ISBN 978-953-51-0570-1

Hard cover, 360 pages

Publisher InTech

Published online 27, April, 2012

Published in print edition April, 2012

The book is coined to provide a professional insight into the different trends of immunoassay and related techniques. It encompasses 22 chapters which are grouped into two sections. The first section consists of articles dealing with emerging uni-and-multiplex immunolabelled methods employed in the various areas of research. The second section includes review articles which introduce the researchers to some immunolabelled techniques which are of vital significance such as the use of the conjugates of the *Staphylococcus aureus* protein "A" and the *Streptococcus* Spps. protein "G" in immunolabelled assay systems, the use of bead-based assays and an overview on the laboratory assay systems. The book provides technological innovations that are expected to provide an efficient channel for developments in immunolabelled and related techniques. It is also most useful for researchers and post-graduate students, in all fields, where immunolabelled techniques are applicable.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Aart van Amerongen, Geert A.J. Besselink, Martina Blazkova, Geertruida A. Posthuma-Trumpie, Marjo Koets and Brigit Beelen-Thomissen (2012). Carbon Nanoparticles as Detection Label for Diagnostic Antibody Microarrays, Trends in Immunolabelled and Related Techniques, Dr. Eltayb Abuelzein (Ed.), ISBN: 978-953-51-0570-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-immunolabelled-and-related-techniques/carbon-nanoparticles-as-detection-label-for-protein-microarrays>

INTECH
open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE RODU *Cronobacter*

BARBORA JAVŮRKOVÁ, MARTINA
BLAŽKOVÁ, LADISLAV FUKAL
a PAVEL RAUCH

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Pavel.Rauch@vscht.cz

Došlo 3.2.11, přijato 23.2.11.

Klíčová slova: *Cronobacter*, *Enterobacter sakazakii*,
ELISA, enzymová imunoanalýza, LFIA, imunochromato-
grafie

Úvod

Patogenní mikroorganismy rodu *Cronobacter* (kronobakter) představují velké zdravotní riziko, zvláště pro kojence a seniory. Mikrobiologický přehled této problematiky přehledně zpracovaly Demnerová a Pazlarová¹.

Vzhledem k nebezpečnosti kronobakterů je nezbytné mít k dispozici vhodné metody jejich detekce². Vedle klasických kultivačních technik^{2–4} se postupně prosazují rychlé metody založené na biochemických a molekulárně-biologických principech^{5–7}.

Biochemické detekční postupy využívají nejčastěji enzymové metody založené na použití chromogenních a fluorescenčních substrátů. Mezi chromogenní substráty patří např. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glukopyranosid⁸ a představitelem fluorescenčních substrátů jsou např. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glukopyranosid^{9–11} nebo methylumbelliferyl- α -D-glukosid¹². Enzymové metody využívající uvedené substráty byly ověřeny v rozsáhlé studii¹³. Hledání nových možností v této oblasti pokračuje¹⁴.

Molekulárně biologických principů využívají modifikované metody polymerázové řetězové reakce^{15–17}, které se poslední dobou uplatňují stále častěji. Významnou roli hraje pulsní gelová elektroforéza (PFGE, pulsed field gel electrophoresis), která umožňuje analýzu velkého množství DNA fragmentů z celého bakteriálního genomu. PFGE analýza je poněkud zdlouhavá, trvá 2–3 dny, ale je považována za vysoký standard v subtypizaci bakterií^{18–22}.

Avšak ani použitím rychlých metod se nevyhneme kultivačnímu kroku, který musí umožnit pomnožení třeba jediné buňky mikroorganismu v analyzovaném vzorku o několik řádů^{23,24}.

Cílem této práce bylo pokusit se vypracovat rychlé a specifické detekční postupy založené na imunochemickém principu. Imunochemické testy jsou velmi oblíbené. Jedná se o poměrně jednoduché postupy detekce, které nevyžadují téměř žádné zkušenosti pracovníka. Elegant-

ním a jednoduchým příkladem je použití techniky tzv. dipstiku, plastové tyčinky, na jejímž povrchu je imobilizována protilátka²⁵. Výhodou imunometod je rychlost detekce a nízká cena analýzy. Vyvinuli jsme metody enzymové imunoanalýzy a imunochromatografické detekce kronobakterů.

Experimentální část

Materiál

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA dodala citrát-fosfátový pufr, dimethylsulfoxid, denaturovaný ethanol, hovězí sérový albumin a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Lachema Brno, ČR poskytla ostatní běžné chemikálie, Penta Chrudim chlorid draselný, chlorid sodný a peroxid vodíku, Fluka Chemie AG, Švýcarsko dodala Triton Tx-100 a Tween-20, Oxoid, ČR poskytl Trypton soya broth.

Nanočástice uhlíku²⁶, Spezial Schwartz 4, o velikosti 40 nm dodala Degussa AG, SRN.

Králičí polyklonální protilátky (AbCS) proti mrtvým buňkám *Cronobacter sakazakii* Cb03 (ATCC 29544) a prasečí polyklonální protilátky proti králičím značené peroxidasou (SwAR-Px) připravila fa Sevapharma a.s., ČR. Neznačené prasečí polyklonální protilátky proti králičím dodala fa Nordic Immunology, Nizozemí.

Mikrotitrační destičky – MaxiSorp (Nunc-ImmunoTM Plates) dodal Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc., Dánsko.

Souprava pro značení protilátek peroxidasou EZ-LinkTM Plus Activated Peroxidase Kit (Pierce).

Metody

Příprava vzorků

Pro experimenty byly použity sbírkové bakteriální kmeny rodu *Cronobacter*, jejichž identita byla ověřena klasickými mikrobiologickými metodami detekce kronobakterů²⁷. Bakterie byly kultivovány 18 h při teplotě 37 °C v kultivačním médiu Trypton soya broth. Získaná bakteriální suspenze byla těsně před jednotlivými experimenty ředěna v poměru 1:1 příslušným pufrům.

Enzymová imunoanalýza

Příprava konjugátu protilátky s peroxidasou

Konjugát (AbCS-HRP) protilátky AbCS s peroxidasou (HRP) byl připraven pomocí komerční soupravy EZ-LinkTM Plus Activated Peroxidase Kit. Protilátka AbCS (1 mg) reagovala s aktivovanou peroxidasou (1 mg HRP, která je dodána s komerční soupravou) v prostředí 0,2M karbonát-bikarbonátového pufru pH 9,4. Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 10 μ l redukčního roztoku 5M NaCNBH₃ pro stabilizaci kovalentní vazby. Po 15 min inkubaci při laboratorní teplotě byla nezreagovaná peroxidasa inhibována 20 μ l 3M ethanolaminu (pH 9,0). Připravený konjugát (AbCS-HRP) byl uskladněn v lednici při teplotě 4 °C.

Postup ELISA

Do jamek mikrotitrační destičky bylo imobilizováno po 100 μl specifické protilátky AbCS o různé koncentraci (0, 1, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$). K ředění byl použit 0,05M karbonát-bikarbonátový pufr, pH 9,6. Imobilizace probíhala přes noc při teplotě 4 °C v lednici. Nenavázaná protilátka byla vymyta pomocí automatické promývačky 4krát 300 μl 0,01M roztoku PBS, pH 7,4 obsahujícím 0,05 % Tween (PBST). Následně byla do jamek aplikována suspenze buněk (100 $\mu\text{l/jamku}$) ředěná v poměru 1:1 v 0,01M PBST s 2% přídavkem želatiny. Inkubace, při které docházelo k interakci mezi vzorkem a imobilizovanými protilátkami, probíhala při 37 °C, po dobu 1,5 h. Nezreagované imuno-reaktanty byly vymyty 4krát 300 μl 0,01M PBST. Poté byl aplikován konjugát (100 $\mu\text{l/jamku}$) specifické protilátky s peroxidasou (AbCS-HRP) ředěný (200 $\times$, 400 $\times$, 600 $\times$ a 1200 $\times$) v 0,01M roztoku PBST s 2% přídavkem sušeného mléka. Reakce probíhala 2 h při 37 °C a nenavázaný konjugát byl vymyt 5krát 300 μl 0,01M PBST. Poté bylo přidáno do každé jamky 100 μl substrátu 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB, 0,1 mg) a enzymová reakce probíhala 10 min při laboratorní teplotě. K zastavení reakce bylo použito 50 μl 2M kyseliny sírové. Absorbance vzniklého žlutého zbarvení byla měřena při 450 nm.

Vyhodnocení metody ELISA

Průměrné hodnoty naměřených absorbancí byly vynešeny do grafu proti dekadickému logaritmu počtu buněk na 1 ml (KTJ ml^{-1}). Těmito body byla proložena sigmoidní křivka, kterou lze popsat čtyřparametrovou funkcí:

$$A = C + (D - C) / (1 + e^{-2(\alpha + \beta \cdot x)})$$

kde A je absorbance při 450 nm, C spodní asymptota křivky, D horní asymptota křivky, α posun lineární části křivky v systému souřadnic, β směrnice lineární části křivky, x dekadický logaritmus KTJ ml^{-1} .

Parametry této regresní funkce byly vypočítávány pomocí aplikace Řešitel v programu Excel.

Imunochromatografická detekce *kronobakterů*

Příprava nitrocelulózové membrány

Nitrocelulózová membrána (AE 100, Whatman) o rozměrech 10,5 $\times$ 5 cm byla vyztužena podložkou vyrobenou z polyesteru (ARcare® 7823, Adhesives Research, Irská republika). Pomocí přístroje Linomat 5 (Camag, Švýcarsko) byly na membránu aplikovány imunoreaktanty v úzkých linkách v přesně určených vzdálenostech od počátku membrány. Ve vzdálenosti 2,7 cm od začátku membrány byla na testovací linii imobilizována protilátka AbCS (1 ng μl^{-1}). Ve vzdálenosti 3 cm od okraje bylo na kontrolní linii imobilizováno 0,5 ng μl^{-1} prasečí proti králičí protilátky (SwAR). Pro imobilizaci byly všechny imunoreagencie ředěny v 5mM borátovém pufru. Následovala inkubace přes noc při 37 °C. Membrána byla nastříhána na proužky (šířka 5 mm) a uchovávána v suchu a temnu při laboratorní teplotě.

Příprava konjugátu protilátka-uhlíkové nanočástice

Protilátka AbCS byla rozpuštěna v 5mM borátovém pufru, pH 8,6. AbCS (350 μg) bylo po malých dávkách a za stálého míchání smícháno s 1 ml 0,2% suspenze koloidních nanočástic uhlíku (o rozměrech 40 nm), která byla před použitím 15 min homogenizována ultrazvukem. Reagencie byly inkubovány přes noc za stálého míchání při 4 °C. Takto připravený konjugát byl třikrát promyt v promývacím pufru (5mM borátový pufr, 1% BSA, 0,02% NaN_3 , pH 8,6). Během každého promytí byl konjugát nejprve 10 s homogenizován. Následovala centrifugace při 13 500 g, při 10 °C po dobu 15 min. Získaný supernatant byl rozmíchán v 1 ml promývacího pufru. Na závěr byl konjugát resuspendován ve skladovacím pufru (0,1M borátový pufr, 1% (w/v) BSA, 0,02% (v/v) NaN_3 , pH 8,6). Připravený konjugát uhlíku s AbCS (AbCS-C) byl uchováván v tmavé nádobě při 4 °C.

Sestavení testu

50 μl reakčního pufru (0,2M borátový pufr, 1% (w/v) sušené mléko, 0,04% (v/v) NaN_3 , pH 8,6), 50 μl buněčné kultury a 3 μl konjugátu uhlíkatých částic s protilátkou AbCS bylo smícháno a aplikováno na spodní okraj membrány. Membrány byly pouze přilepeny ke stojánku a vzliňání bylo urychlováno pomocí filtračního papíru²⁸. Do 15 min byl odečten výsledek.

Výsledky a diskuse

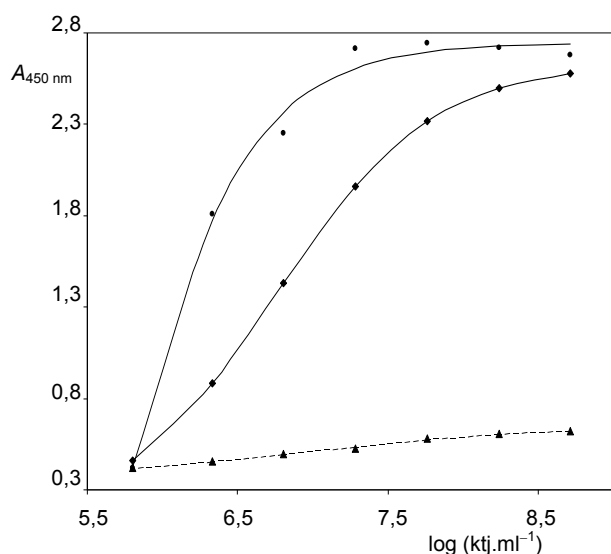
K sestavení nových imunochemických metod byl používán kmen *Cronobacter sakazakii* (Cb44) a nikoliv kmen, kterým bylo imunizováno. K ověření interakce s jinými bakteriemi byl používán zástupce rodu *Enterobacter* kmen *Enterobacter cloacae* (Eb 22).

Enzymová imunoanalýza

Ačkoliv enzymová imunoanalýza je rozšířenou metodou detekce patogenních mikroorganismů, je zajímavé, že až dosud byla pro *kronobaktery* popsána pouze ve formátu nepřímé kompetitivní detekce²⁹. V naší práci se nám nejvíce osvědčil formát nekompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA) (cit.³⁰).

Nejprve byly stanoveny optimální podmínky pro metodu ELISA. Bylo třeba zjistit optimální koncentraci imobilizované protilátky, koncentraci konjugátu, inkubační doby, teploty a složení pufrů potřebných k ředění buněk a konjugátu.

Na mikrotitrační destičku byla imobilizována protilátka AbCS. Byly testovány různé kombinace koncentrací této protilátky (0–8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a různého ředění konjugátu AbCS-HRP (200 $\times$, 400 $\times$, 600 $\times$, a 1200 $\times$). Byla měřena absorbance vzniklého žlutého produktu při 450 nm. Z naměřených hodnot absorbance byly určeny optimální koncentrace potahu protilátky a konjugátu pro další měření. K ředění buněk *kronobakterů* byly použity pufrы 0,01M



Obr. 1. Závislost absorbance na koncentraci mikroorganismů (kolonie tvořících jednotek, KTJ), ● *Cronobacter sakazakii* (Cb44), ◆ *Cronobacter malonaticus* (Cb02), ▲ *Enterobacter aerogenes* (Eb21)

PBST a 0,01M PBS s 0,1% Tritonem s různými přísadkami želatiny, sušeného mléka a hovězího sérového albuminu (2%, 1% a 0,5%). Jako nejvhodnější se ukázal pufr 0,01M PBST s 1% přísadkou želatiny.

Při výběru vhodného složení pufru pro interakci konjugátu byly testovány stejné pufrы jako pro ředění buněk. Byl vybrán 0,01M PBST s 1% přísadkou želatiny, protože

v porovnání s přísadkou hovězího sérového albuminu a sušeného mléka byla změněna vyšší výsledná absorbance. Výrazně se zlepšila absorbance kmene Cb44 (*Cronobacter sakazakii*) a snížila interakce s enterobaktery (Eb 22, *Enterobacter cloacae*). Se vzrůstající dobou inkubace (30 min, 60 min, 90 min a 120 min) byl pozorován mírný nárůst absorbance. Pro další experimenty byla zvolena délka inkubace 2 h.

Teplota měla výrazný vliv na inkubaci buněk. Byly testovány teploty 37 °C, 30 °C a laboratorní teplota. Při teplotě 37 °C byla naměřena nejvyšší absorbance, a proto byla tato teplota používána v dalších experimentech. Obdobně byla teplota 37 °C zvolena jako optimální pro inkubaci konjugátu AbCS-HRP.

V tab. I jsou shrnuty optimální koncentrace reaktantů používané pro detekci kronobakterů. Pro testování specifity protilátky byly připraveny z naměřených dat pro jednotlivé kmeny kronobakterů a enterobakterů kalibrační křivky. Jako příklad jsou uvedeny na obr. 1. tyto závislosti pro *Cronobacter sakazakii* (Cb44), *Cronobacter malonaticus* (Cb02) a *Enterobacter aerogenes* (Eb21). Protilátka AbCS nejlépe interagovala s kmeny kronobakterů, proti nimž byla připravena (*Cronobacter sakazakii* ATCC 29544, Cb03). Ostatní druhy kronobakterů interagovaly s protilátkou rovněž velmi dobře. Kmeny enterobakterů interagovaly významně méně než kronobaktery a jsou tedy od kronobakterů odlišitelné (viz tab. II).

Imunochromatografická detekce

Pro imunochromatografickou detekci (ID) byl vybrán přímý nekompetitivní formát. Byly použity králičí protilát-

Tabulka I

Vybrané (optimální) podmínky pro enzymovou imunoanalýzu (ELISA)

Parametr	Vybrané podmínky	
Typ mikrotitrační destičky	MaxiSorp Nunc-Immuno™ Plates (Thermo Fisher Scientific, Inc., Dánsko)	
Koncentrace imobilizovaných protilátek	2 µg ml ⁻¹	
Ředění konjugátu	400×	
Složení pufrů	pro ředění buněk	pro ředění konjugátu protilátky s HRP
	0,01M PBS	0,01M PBS
	0,05%Tw	0,05%Tw
	1% želatina	0,5% želatina
Podmínky inkubace	II. inkubace ^a	III. inkubace ^b
Teplota inkubace	37 °C	37 °C
Doba inkubace	1,5 h	2 h

^a II. inkubace – interakce bakteriálních buněk s imobilizovanou protilátkou, ^b III. inkubace – interakce konjugátu protilátky s křenovou peroxidasou s bakteriálními buňkami

Tabulka II
Průměrné hodnoty maximálních absorbancí dosažené metodou ELISA pro různé mikroorganismy

Analyzovaná bakterie ^a	Absorbance
<i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>n</i> = 6	2,89 ± 0,24
Ostatní druhy <i>Cronobacter</i> , <i>n</i> = 9	2,62 ± 0,38
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>n</i> = 10	0,62 ± 0,14

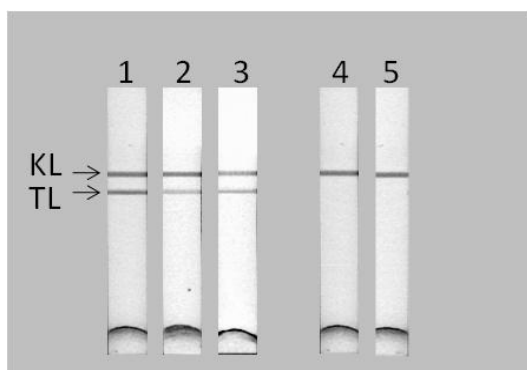
^a *n* – počet testovaných kmenů

ky připravené proti *Cronobacter sakazakii* (AbCS) a konjugáty uhlíkových částic se specifickými protilátkami (AbCS-C). Vzorek *kronobakterů* byl aplikován na nitrocelulosovou membránu s imobilizovanými protilátkami AbCS (testovací linie). Spolu se vzorkem se na membránu dostává konjugát specifických protilátek s koloidními uhlíkatými částicemi (AbCS-C). Na kontrolní linii je nanášena prasečí protilátka připravená proti králičí protilátce (SwAR). Během vztlínání vzorku membránou dochází k interakci buněk *kronobakterů* s protilátkou konjugovanou k uhlíkové částici. Při průchodu přes zónu s imobilizovanou protilátkou je celý imunokomplex zachycen a dochází ke vzniku „sendviče“. Přebytečný konjugát AbCS-C postupuje dále membránou až ke kontrolní linii. Uhlíkové částice umožní vizualizaci výsledku testu. Při

Tabulka III
Výsledky vypracovaných metod enzymové imunoanalýzy (ELISA) a imunochromatografické detekce (ID) při testování sbírkových kmenů (*n* = 6) ^c

Sbírkový kmen	ELISA ^a	ID ^b
CB 02 <i>Cronobacter malonaticus</i>	+	+
CB 03 <i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+
CB 21 <i>Cronobacter sakazakii</i>	+	–
CB 22 <i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+
CB 31 <i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+/-
CB 39 <i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+
CB 44 <i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+
CB 49 <i>Cronobacter malonaticus</i>	+	–
CB 53 <i>Cronobacter turicensis</i>	+	+/-
CB 54 <i>Cronobacter muytjensii</i>	+	+/-
CB 55 <i>Cronobacter muytjensii</i>	+	+
CB 56 <i>Cronobacter dublinensis</i>	+	–
CB 57 <i>Cronobacter dublinensis</i>	+	+
CB 58 <i>Cronobacter dublinensis</i>	+	+/-
CB 59 <i>Cronobacter genomospecies 1</i>	+	+
EB 20 <i>Enterobacter cloacae</i>	–	–
EB 21 <i>Enterobacter aerogenes</i>	–	–
EB 22 <i>Enterobacter cloacae</i>	–	-/+
EB 23 <i>Enterobacter gergoviae</i>	–	-/+
EB 24 <i>Enterobacter cowanii</i>	–	–
EB 26 <i>Enterobacter cancerogenus</i>	–	-/+
EB 32 <i>Enterobacter helveticus</i>	–	–
EB 36 <i>Enterobacter hormaechei</i>	–	–
EB 38 <i>Enterobacter pulveris</i>	–	-/+
EB 45 <i>Enterobacter turicensis</i>	–	–

^a ELISA: + absorbance > 1,5; – absorbance < 0,8; ^b ID: + silná linka v testovací zóně; +/- slabá linka v testovací zóně; – žádná linka v testovací zóně. ^c *n* – počet testovaných vzorků



Obr. 2. Specifita vyvinuté imunochromatografické detekce (ID). 1 – *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (Cb03), 2 – *Cronobacter malonaticus* (Cb02), 3 – *Cronobacter sakazakii* (Cb44), 4 – *Enterobacter cloacae* (Eb20), 5 – *Bacillus cereus*, KL – kontrolní linie, TL – testovací linie

aplikaci pozitivního vzorku (vzorek obsahující buňky kronobakterů) dojde ke vzniku dvou černých linek – testovací i kontrolní linie, pokud byl vzorek negativní, zbarví se pouze kontrolní linie (obr. 2). Pokud nedojde ke vzniku žádné barevné linky, svědčí to o nesprávném provedení detekce.

Výběr vhodných podmínek detekce

Byly testovány různé podmínky pro sestavení a provedení testu. V první řadě byl hledán vhodný typ membrány a vyztužovací podložky. Pro aplikace se nejlépe osvědčila nitrocelulosaová membrána firmy Whatman, typ AE 100 (velikost pórů 10 μm). Optimální tlak pro nástřik imunoreagencií na membránu byl 400 kPa a nejvhodnější vzdálenost linií imobilizovaných imunoreagencií byla 2,7 (testovací linie) a 3 cm od počátku membrány (kontrolní linie).

Bylo optimalizováno složení reakčního pufru. Byl sledován vliv pH pufru, byly testovány přísady různých látek, např. ethanol, glukosa, sušené mléko, methanol, sacharosa, Triton Tx-100, Tween 20, BSA, PEG a želatina. Byly sledovány i různě velké přísady jednotlivých činidel; jako nejvhodnější byl pro další experimenty vybrán 0,2M borátový pufr s 1% přísadkou sušeného mléka. Toto složení dobře snižovalo nespecifické interakce, i když rychlost vztlínání reagentů membránou byla nižší.

Na připravené membrány byly aplikovány všechny testované kmeny, viz tab. III. Metodou ID bylo určeno z 15 vzorků kronobakterů pouze 8 jednoznačně pozitivně, ve čtyřech případech byla odezva slabě pozitivní a ve třech případech byl výsledek negativní. Z 10 vzorků enterobakterů 4 poskytovaly slabě pozitivní výsledek. Je zřejmé, že kvalita/avidita použité protilátky není pro tento formát postačující.

Imunodetekce vybraných sbírkových kmenů

Vyvinuté metody detekce kronobakterů, založené na použití protilátky AbCS byly ověřovány na vzorcích ostat-

ních kronobakterů a enterobakterů (tab. III). Z výsledků uvedených v tab. III je zřejmé, že všechny testované vzorky byly správně určeny metodou ELISA. Metoda ID v některých případech nebyla schopna spolehlivě určit ani kronobaktery, ani enterobaktery. Je to pravděpodobně způsobeno nedostatečnou specifitou protilátky, která se neprojeví při odlišném uspořádání reakčního formátu v technice ELISA.

Závěr

Byly vypracovány dvě rychlé metody detekce kronobakterů, techniky ELISA a ID. Obě metody využívají polyklonální protilátky AbCS. Jako vhodnější formát se ukázala metoda ELISA, která umožňuje dobré odlišení kronobakterů od enterobakterů. Metoda ID je jednodušší a řádově rychlejší než ELISA. S použitou protilátkou však poskytovala u některých kmenů kronobakterů falešně negativní a u enterobakterů falešně pozitivní výsledky.

Autoři děkují Sandře Göselové za technickou asistenci a za finanční podporu Grantové agentury ČR projekt 525/09/1075, Národnímu výzkumnému centru projekt 2B06048, Výzkumnému záměru MSM 6046137305 a práce byla také financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/2011).

LITERATURA

1. Demnerová K., Pazlarová J.: Chem. Listy 103, 641 (2009).
2. Blažková M., Fukal L., Rauch P.: Chem. Listy 104, 1138 (2010).
3. Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B. D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 1442 (2008).
4. Lehner A., Stephan R.: J. Food Prot. 67, 2850 (2004).
5. Hochel I.: Chem. Listy 103, 814 (2009).
6. Blažková M., Javůrková B., Fukal L., Rauch P.: Biosens. Bioelectron. 26, 2828 (2011).
7. Proudly I., Bougle D., Leclercq R., Vergnaud M.: J. Appl. Microbiol. 105, 550 (2008).
8. Iversen C., Waddington M., On S. L., Forsythe S.: J. Clin. Microbiol. 42, 5368 (2004).
9. Muijtens H. L., van der Ros-van de Repe J., van Druuten H. A. M.: J. Clin. Microbiol. 20, 684 (1984).
10. Iversen C., Druggan P., Forsythe S.: Int. J. Food Microbiol. 96, 133 (2004).
11. Kandhai M. C., Reij M. W., van Puyvelde K., Guillaume-Gentil O., Beumer R. R., van Schothorst M.: J. Food Prot. 67, 1207 (2004).
12. Oh S. W., Kang D. H.: Appl. Environ. Microbiol. 70, 5692 (2004).
13. Cawthorn D.-M., Botha S., Witthuhn R. C.: Int. J. Food Microbiol. 127, 129 (2008).
14. Iversen C., Waddington M., On S. L., Forsythe S.: J.

- Clin. Microbiol. 42, 5368 (2004).
15. Kang S. E., Nam Y. S., Hong K. W.: J. Microbiol. Biotechnol. 17, 516 (2007).
 16. Blažková M., Koets M., Rauch P., Van Amerongen A.: Eur. Food Res. Technol. 229, 867 (2009).
 17. Krasccsenicsova K., Trncikova T., Kaclikova E.: Food Anal. Meth. 1, 85 (2008).
 18. Mullane N. R., Whyte P., Wall P. G., Quinn T., Fanning S.: J. Food Microb. 116, 73 (2007).
 19. Healy B., Mullane N., Collin V., Mailler S., Iversen C., Chatellier S., Storrs M., Fanning S.: J. Food Prot. 71, 1372 (2008).
 20. Molloy C., Cagney C., O'Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G.: Int. J. Food Microbiol. 136, 198 (2009).
 21. Baumgartner A., Grand M., Liniger M., Iversen C.: Int. J. Food Microbiol. 136, 189 (2009).
 22. El-Sharoud W. M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C., Fanning S., Healy B.: BMC Microbiol. 9, 24 (2009).
 23. Al-Holy M. A., Lin M., Al-Qadin H. M., Rasco B. A.: Food Microbiol. 25, 22 (2008).
 24. Shaker R. R., Osaili T. M., Abu Al-Hasan A. S., Ay-yash M. M., Forsythe S. J.: J. Food Sci. 73, M354 (2008).
 25. Blažková M., Karamonová L., Greifová M., Fukal L., Hoza I., Rauch P., Wyatt G. M.: Eur. Food Res. Technol. 223, 821 (2006).
 26. Blažková M., Mičková-Holubová B., Rauch P., Fukal L.: Biosens. Bioelectron. 25, 753 (2009).
 27. ČSN P ISO/TS 22964: Mléko a mléčné výrobky - Průkaz *Enterobacter sakazakii* (říjen 2006).
 28. Blažková M., Rauch P., Fukal L.: Biosens. Bioelectron. 25, 2122 (2010).
 29. Hochel I., Škvor J.: Czech J. Food Sci. 27, S2-66 (2009).
 30. Karamonová L., Blažková M., Fukal L., Rauch P., Greifová M., Horáková K., Tomáška M., Roubal P., Brett G. M., Wyatt G. M.: Food Agric. Immunol. 15, 167 (2003).

M. Blažková, B. Javůrková, L. Fukal, and P. Rauch (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Immunochemical Detections of Genus *Cronobacter***

Both immunochemical methods, sandwich ELISA and immunochromatographic detection, for detection of genus *Cronobacter*, have been developed. Rabbit polyclonal antibodies against dead cells of *Cronobacter sakazakii* Cb03 (ATCC 29544) were used. In tests of bacteria cultures from microbial collection, the ELISA distinguished between all assessed *Cronobacter* and *Enterobacter* strains. The immunochromatographic technique provided false negative results for 20 % of *Cronobacter* strains, and 40 % false positive results for *Enterobacter* strains.



Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*

Martina Blažková, Barbora Javůrková, Ladislav Fukal, Pavel Rauch*

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2010

Received in revised form

17 September 2010

Accepted 2 October 2010

Available online 18 December 2010

Keywords:

Immunochromatographic test

Rapid detection

Food-borne pathogen

Cronobacter spp.

Enterobacter sakazakii

Infant formula

ABSTRACT

Members of the genus *Cronobacter* are opportunistic pathogens formerly known as *Enterobacter sakazakii*, which induce severe meningitis and sepsis in neonates and infants, with a high fatality rate. In this work, a simple and rapid immunochromatographic strip test for the detection of this pathogen was developed. Following the shortened bacteria cultivation and isolation of DNA, a specific gene sequence targeting 16S rRNA from *Cronobacter* spp. was amplified by PCR using 5'-end labelled specific primers. The PCR product, amplicon labelled with digoxigenin on one side and biotin on the other side, was directly added to the immunochromatographic strip test, composed of nitrocellulose membrane with bound antibody against digoxigenin in the test line. The visualization was mediated by colloidal carbon conjugated to neutravidin, and the appearance of grey/black line was indicative of the presence of specific amplicon. Colour intensity of the test line in pathogen-positive assay was visually distinguishable from that of negative sample within 10 min. The visual detection limit of PCR product was 8 ng. The specificity of the developed method was confirmed by standard microbiological techniques. Whole detection procedure with the incorporated immunostrip was applied to analysis of infant formulae samples, contaminated with less than 10 cells of *Cronobacter* spp. per 10 g. The results from immunochromatographic test indicated the absolute agreement with those from standard microbiological methods. Moreover, the developed procedure considerably reduced the total analysis time to 16 h whereas the reference microbiological method needs 6–7 days.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Detection of pathogens is of great importance for health and safety reasons. The food industry and clinical, water, and environmental areas are of principle interest in pathogen detection (Heyduk and Heyduk, 2010; Lazcka et al., 2007). The development of new methods for rapid, simple and inexpensive detection, suitable mainly for small laboratory or for field testing, has progressed greatly in recent years (Litos et al., 2009; Skottrup et al., 2008; Torres-Chavolla and Alocilja, 2009). The goal of reducing the time of the detection has been a major driving force behind the development of a variety of biosensors for detecting pathogens (Lazcka et al., 2007; Nayak et al., 2009). Currently, the most commonly used methods for pathogen detection involve, instead of traditional methods, different newly developed biosensors based on: electrochemical impedance spectroscopy (Nandakumar et al., 2008), fluorescent bio-barcode DNA assay (D. Zhang et al., 2009), gold nanoparticles-based chemiluminescent system (Qi et al., 2009), electrochemical detection (Miranda-Castro et al., 2009; Pöhlman et al., 2009), surface plasmon resonance (Piliarik et al., 2009), immunomagnetic-resistance sensor (Koets et al., 2009), nanopar-

ticle based sensor (Sanvicens et al., 2009), matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (Liu et al., 2008), quartz crystal microbalance (Poitras and Tufenkji, 2009), electrochemical immunoassay (X. Zhang et al., 2009), light scattering sensor (Banada et al., 2007), aptamers technology (Lee et al., 2009), and rarely simple biosensors with visual detection of DNA (Litos et al., 2009), or whole microorganisms (Gas et al., 2010; Won-Bo et al., 2007).

Cronobacter is a recently proposed genus consisting of six genomospecies that encompass the organisms previously identified as *Enterobacter sakazakii* (Iversen et al., 2008). This opportunistic pathogen is known to cause serious infections in infants, particularly neonates. Although food-borne infections caused by this pathogen are not common, this pathogen has a 40–80% mortality rate in infected infants (Lampel and Chen, 2009). For this reason, international risk management measures were taken such as the revision of a Codex Alimentarius guideline and the implementation of specific food-safety criteria in the European Community (Anonymous, 2007). The need for rapid, sensitive and specific methods for detection of *Cronobacter* spp. is evident.

The traditional microbiological cultivation techniques for identification of *Cronobacter* (*E. sakazakii*) are laborious and time-consuming; it generally require steps of enrichment and confirmation that take 6–7 days to complete (Anonymous, 2006; Seo and Brackett, 2005). Recently, a number of biosensor techniques

* Corresponding author. Tel.: +420 220443076; fax: +420 220445167.
E-mail addresses: pavel.rauch@vscht.cz, rauchp@vscht.cz (P. Rauch).

for rapid detection of this pathogen have been reported, including fluorescence in situ hybridization (Almeida et al., 2009), infrared spectroscopy (Lin et al., 2009), DNA microarray (Wang et al., 2009), and multiplexed bead-based mesofluidic system (Jin et al., 2009).

These techniques require sophisticated equipment and highly trained personnel, hence increasing the analysis cost. Rapid detection techniques should provide reliable, user-friendly, and inexpensive detection with improved or equivalent sensitivity and reproducibility of culture-based tests (Torres-Chavolla and Alocilja, 2009).

With the demand for overall speed and simplicity, nucleic acid detection by using immunochromatographic strip test (named also “lateral flow device”) could be a more suitable technique (Posthuma-Trumpie et al., 2009). This technology was first introduced in the 1980s. Its success has been based on a combination of low cost and simplicity that allows untrained personnel to undertake immunoassay in extra-laboratory environments without additional equipment. It combines thin-layer chromatography with conventional bioaffinity interaction (antigen–antibody, avidin–biotin, complementary parts of two oligonucleotides) using bioreactant-functionalized coloured particles as a detector and other bioaffinity partner immobilized as a capture probe in a test zone of the strip. The assay avoids the multiple incubation and washing steps performed in most immunoassays. With a very user-friendly format including short testing-times and long-term stability, these tests are anticipated for use in on-site testing by untrained personnel. Although qualitative tests are realized by visually observing the colour change of the test zone, quantitative data may be obtained by recording the optical responses with a portable strip reader. Design of immunochromatographic strip test is currently used for a broad range of applications where rapid antigen detection is required, especially for some analytes in clinical medicine, drugs of abuse, hapten contaminants of food and environment, and microbial contaminants (Posthuma-Trumpie et al., 2009). Expanding the domain of this technology to pathogens' nucleic acid detection, several recent reports have described detection of PCR amplicon or product of isothermal amplification in flow with functionalized nanoparticles on the strip. In the design of these strip tests, a variety of capture and detection schemes were used (Andrade and Lightner, 2009; Blažková et al., 2009a; Dineva et al., 2005; Fong et al., 2000; Kozwicz et al., 2000; Mao et al., 2009; Mens et al., 2008; Soo et al., 2006). To our best knowledge, any use of this technique for *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) detection has not been published up to now.

The main objective of this study was to develop a rapid and specific nucleic acid test for detection of *Cronobacter* spp. The designed assay was based on immunochromatographic test (ICT) of PCR product on a membrane strip. Performance of the optimized PCR–ICT procedure was compared with conventional PCR combined with gel electrophoresis and currently used microbiological cultivation methods.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Various types of nitrocellulose membranes were supplied by Whatman GmbH, Germany (AE 100, AE 98, Immunopore FP, Immunopore RP), by Millipore Ltd., Czech Republic (HiFlow Plus HF 135, HiFlow Plus HFB180, HiFlow Plus 090), and by Sartorius Stedim Biotech S.A., France (Unisart 140). Vinyl backing ARcare® 7823 was from Adhesives Research Inc. (USA), sample pad GFSP and the absorbent pad CFSP from Millipore Corp. (USA).

NeutrAvidin Biotin-Binding Protein (neutravidin) was purchased from Pierce Biotechnology (USA) and Biotin-SP-conjugated

AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (biotin–protein) from Jackson ImmunoResearch (UK). Polyclonal anti-digoxigenin antibody was obtained from Roche Applied Science (Germany). Specific primers Esakf: 5′-GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG-3′ and Esakr: 5′-ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG-3′ according to Lehner et al. (2004) were synthesized and labelled on 5′-end with biotin and digoxigenin, respectively, by HVD Biotech Vertriebs GmbH (Vienna, Austria). FastStart Taq DNA Polymerase was from Roche Applied Science, Germany, and Taq Polymerase from Promega, UK. Nucleotide mix (dNTP) was purchased from HVD Biotech Vertriebs GmbH (Vienna, Austria).

Bovine serum albumin (BSA), Tween 20, and other common chemicals were of the highest purity available and purchased from Sigma–Aldrich Inc. (USA). Carbon nanoparticles (Spezial Schwartz 4, Degussa AG, Germany) were kindly provided by the Agrotechnology & Food Sciences Group (Wageningen University and Research Centre, The Netherlands) as a dry powder (particles of amorphous shape with average size of 120 nm).

2.2. Preparation of carbon–neutravidin conjugate

As detection reagent for strip test, we used carbon nanoparticles functionalized with neutravidin. The procedure, based on physical adsorption of protein on particle surface, was carried out as described previously (Blažková et al., 2009b) with minor modifications. A colloidal carbon suspension was prepared as a stock at 1% (w/v) in demineralised water. The colloidal carbon stock suspension was diluted five times with coupling buffer (5 mM borate buffer, pH 8.8) to give a concentration of 0.2% (w/v). The suspension was sonicated for 10 min on ice using a Sonic 1 (Polsonic, Poland).

Subsequently, the neutravidin dissolved in the coupling buffer was added, with a simultaneous gentle stirring, to the diluted colloidal carbon suspension to a concentration of 350 µg of protein per mL. The pH was readjusted to pH 8.8 and the suspension was incubated by end-over-end mixing at 4 °C overnight. Particles of carbon–neutravidin conjugate were washed three times using centrifugation at 13,500 × g for 15 min in a 5 mM borate buffer, pH 8.8, containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.02% (w/v) Na₂S₂O₃. Conjugate was stored in a 100 mM borate buffer, pH 8.8 (containing 1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) Na₂S₂O₃) as a 0.2% (w/v) carbon suspension at 4 °C in the dark.

2.3. Microbial cultures and cultivation conditions

Control strains of microorganisms were obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM) and Czech National Collection of Type Cultures (CNCCT): *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (CNCCT 5739), *C. sakazakii* ATCC 12868 (CCM 1902), *Enterobacter cloacae* ATCC 10699 (CCM 1903).

Most isolates of *Cronobacter* spp. and other *Enterobacteriaceae* used for determination of reliability of developed method were kindly donated by Dr. Carol Iversen (University College Dublin), and other isolates were originally prepared from different retail sources in the Czech Republic.

Cultures of *Cronobacter* and other bacteria were maintained on Petri plates of Brain Heart Infusion Agar (Oxoid, UK) at 4 °C. Prior to experiments cultures were grown in Lauryl Sulfate Broth (Oxoid, UK) at 37 °C for 12 h.

2.4. Identification of bacterial strains

All isolates were identified based on colony morphology, typical growth on TSA agar (Trypticase Soy Agar, Oxoid, UK) and ESIA agar (*E. sakazakii* isolation agar, AES Laboratoire, France) according to ISO/TS 22964:2006 (Anonymous, 2006), as well as by biochemical characterization using ID 32E test system (bioMérieux, France).

2.5. Preparation of contaminated samples

The following five different kinds of dried infant formula, free of *Cronobacter* spp., were obtained from drugstores in Czech Republic, two samples of different production batches from each kind of formula: BEBA 1 Premium (Nestlé, Czech Republic), HIPPI 1 BIO (Hipp, Austria), Nutrilon 1 (Nutricia, Czech Republic), Humana 1 (Humana GmbH, Germany), Sunar complex 1 (HERO, Czech Republic).

Artificially contaminated samples were prepared by the following procedure. The sample (10 g) was mixed with 90 mL of cultivation medium Lauryl Sulfate Broth (Oxoid, UK) and was cultivated for 12 h at 37 °C while shaking. Each sample was cultivated four times in parallel; two of them were artificially contaminated with less than 10 cells of *C. sakazakii* ATCC 29544 (CNCTC 5739), before the start of cultivation. As a control, each prepared sample was cultivated and confirmed in accordance to official microbiological method (Anonymous, 2006).

2.6. DNA extraction

The DNA extraction from all samples of interest was performed by a GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma–Aldrich, USA), using the gram negative bacterial protocol.

2.7. Amplification of genetic material

A specific sequence (929 bp) targeting 16S rRNA gene from *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) was amplified by PCR using 5′-end labelled specific primers: Esakf labelled with biotin, Esakr with digoxigenin. The reaction mixture contained 2.5 µL of FastStart Taq DNA Polymerase buffer (500 mM Tris–HCl, 100 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3), 1.25 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL of dNTP (nucleotide mix, each at a concentration of 10 mM), 1.25 µL of forward primer (Esakf, 1 µM), 1.25 µL of reverse primer (Esakr, 1 µM), 0.2 µL (5 U per µL) of FastStart Taq DNA Polymerase, 2 µL of sample DNA and nuclease free water (Fermentas International Inc., Canada) to a final reaction volume of 25 µL. The PCR was performed in the TGradient Thermocycler (Biometra, Germany) with the following steps: an initial denaturation at 95 °C for 4 min, 30 cycles each having a denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 66 °C for 60 s and elongation at 72 °C for 90 s with a final extension at 72 °C for 5 min. The product (ds-amplicon containing one end labelled with biotin and the other end labelled with digoxigenin) is produced only if corresponding template sequence of *Cronobacter* spp. is present in DNA sample.

2.8. Agarose gel electrophoresis

The products of PCR (3 µL aliquot) were mixed with 2 µL loading dye solution (Fermentas International Inc., Canada) and were analyzed by electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel (containing ethidium bromide 0.1 mg mL^{−1}) in TBE buffer (0.45 M Tris–Borate, 0.01 M EDTA, pH 8.3). After 90 min, DNA bands were visualized by UV light and their size was compared to a known GeneRuler DNA Ladder Mix 100–10,000 bp (Fermentas International Inc., Canada) to determine the approximate number of base pairs of the amplicon.

2.9. Preparation of immunochromatographic strip test (ICT)

The strips were constructed as follows: firstly, nitrocellulose membrane sheet was cut to the desired size (20 cm × 2.5 cm) and pasted to a vinyl backing. Immunoreagents were diluted in 5 mM borate buffer, pH 8.8, and immobilized on nitrocellulose membranes by spraying (1 µL per strip) using a Linomat V (CAMAG, Switzerland). As a test line, anti-digoxigenin antibody (50 ng µL^{−1})

was applied, and as a control line, the biotin–protein conjugate (5 ng µL^{−1}) was jetted on each membrane. Subsequently, the membrane sheet was dried at 37 °C for 2 h and cut into test strips (0.5 cm × 2.5 cm) using a programmable strip cutter (Economic Cutter ZQ2000, Shanghai Kinbio Tech Co., China). A sample pad was cut in sections of 1 cm × 0.5 cm and pasted to the beginning of the strip and an absorbent pad was cut in sections of 1 cm × 2 cm and pasted to the far end of the strip. Immunochromatographic strip tests prepared in such way were stored in sealed bags under dry conditions at laboratory temperature until used.

2.10. Detection of genetic material by ICT

The ICT was dipped into the reaction mixture containing 3 µL of the PCR product, 1 µL of carbon–neutravidin conjugate, and 96 µL of the running buffer (0.1 M borate buffer, pH 8.8, 1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN₃). After 10 min the results were evaluated visually. Three repetitions were performed for each experiment.

2.11. The influence of the concentration of PCR product on test line intensity

DNA was extracted from the control strain of microorganism *C. sakazakii* ATCC 29544 after its cultivation for 12 h. Following amplification, PCR product was purified using PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen Corp., Canada) according to the manufacturer's "PCR purification protocol". Purified PCR product was quantified by measuring absorbances in UV wavelengths using Nanophotometer (Implen GmbH, Germany). Series of the diluted purified PCR products, ranging from 0.125 to 120 ng per 3 µL, were analyzed by the optimized immunostrip. The test line intensity was evaluated visually. Additionally, the test line colour intensity was quantified using grey scale densitometry after the strip was fully air-dried. Greyscale digital scanned images of the strips were recorded using the Epson Perfection V700 Photo Scanner (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan), and the intensity of the test lines was quantified using the TotalLab TL100 software (Nonlinear USA Inc., NC, USA). Mean values of pixel grey volumes were plotted against the logarithm of amount of PCR product through a four-parameter logistic equation (Rodbard, 1974).

3. Results and discussion

The complete detection procedure described here for *Cronobacter* spp. includes the bacteria enrichment and detection of DNA. Assays of nucleic acid testing usually consist of three basic steps: extraction of nucleic acids, amplification mediated by PCR, and amplicon detection. Typical PCR results are detected by gel electrophoresis alone or in combination with blotting and probing. One objective of this study was to eliminate the use of electrophoresis in PCR product analysis and replace it with an immunochromatographic strip test (ICT) which could offer a more rapid, simple and cost-effective alternative to this highly complex and instrument-dependent method. The detection platform that we used in ICT design has been modified from some variations of published lateral flow devices to allow detecting specific gene sequence of *Cronobacter* spp.

3.1. Detection principle of ICT

A nucleic acid isolated from analyzed pathogenic bacteria was amplified using PCR with two tagged primers specific to *Cronobacter*; forward primer was labelled with biotin, reverse primer with

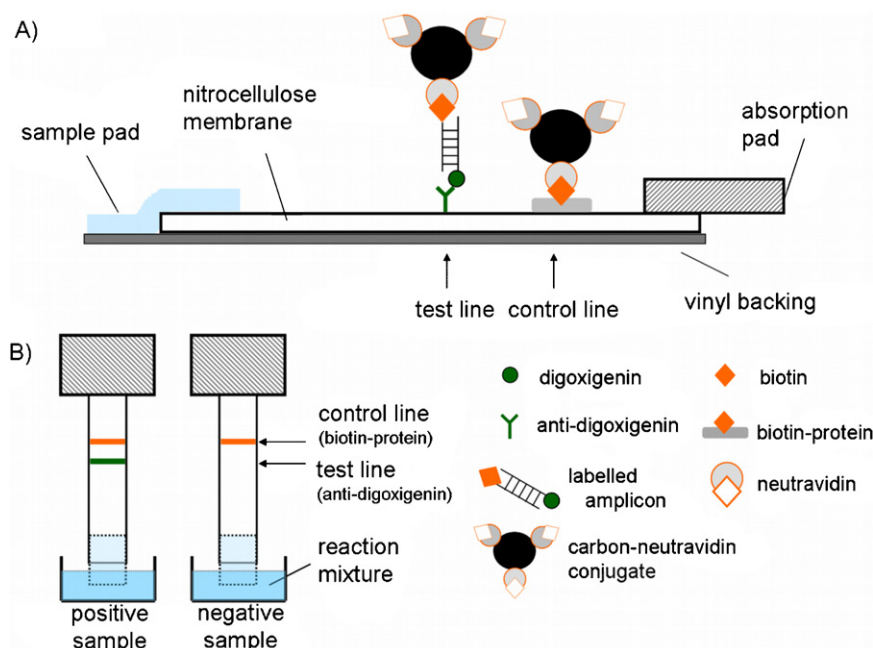


Fig. 1. Schematic diagram of immunochromatographic strip test (ICT). Panel A: schematic side view of ICT and its detection principle. Panel B: schematic front view of ICT; symbols used for ICT components.

digoxigenin. The presence of target sequence allows annealing of the primers to the (single-stranded) DNA template. The polymerase binds to the primer–template hybrid and elongation step begins. At this step, the DNA polymerase synthesizes a new DNA strand complementary to the DNA template strand limited/defined by both tagged primers at the ends. Thus, the prepared part of DNA (ds-amplicon) contained one end labelled with biotin and the other end labelled with digoxigenin. To detect this amplicon, the PCR product was applied on the ICT in the mixture with the neutravidin labelled by carbon particles. In the test procedure, this mixture moved along the membrane strip. One side of amplicon labelled with biotin interacted with the carbon–neutravidin conjugate. The opposite side of amplicon (labelled by digoxigenin) was captured in the test zone of the strip by anti-digoxigenin antibody, resulting in the visible black/grey line (test line). The response is directly proportional to the amount of analyte (PCR product). The excess of carbon–neutravidin conjugate is captured in the control zone forming a visible line. The schematic view of the developed test is shown in Fig. 1. PCR product from samples containing *Cronobacter* was demonstrated by the appearance of two grey/black lines. The PCR product prepared from samples without *Cronobacter* template DNA showed only one grey/black line (control line).

3.2. Optimization of ICT conditions

Most of the components necessary for the ICT construction as well as the experimental conditions have a key influence on both the performance and final sensitivity of the test.

Firstly, the proper type of a used membrane was selected. The material (its physical and chemical attributes), the membrane is made from, has significant influence on its capillary flow properties. The capillary flow properties in turn affect assay sensitivity, assay specificity, and test line consistency. With respect to our previous experiences (Blažková et al., 2009a), 8 types of nitrocellulose membranes obtained from three producers were tested. Very good results were achieved using membranes AE 98, AE100, Immuno-pore FP, and HiFlow Plus HF 135. The best shape and the highest

intensity of lines were shown in AE 98 and this membrane was used for further experiments.

Secondly, the composition of the assay buffer was determined. Phosphate buffer and borate buffer were tested. Blocking agents such as BSA (0.1–5%), gelatine (0.1–1%), polyethylene glycol (0.01–2%), and their combinations, with and without surfactant Tween 20 (0.01–0.5%) and Triton X-100 (0.1–5%) were tested to avoid non-specific interaction and to further improve the test performance. These factors affected mainly the character of reactant flow, level of background colour, sharpness, and intensity of the test line.

Thirdly, checkerboard titration experiments were carried out. Several amounts of anti-digoxigenin antibody immobilized on the membrane (25–200 ng per strip) against different amounts of the carbon–neutravidin conjugate (0.5–5 μ L per strip) were investigated in assays of solutions containing PCR product prepared from control strain. As a negative control, assay buffer and no template PCR mixture were run. From these preliminary development studies, the optimized conditions for the ICT were chosen by visual evaluation of strips as a compromise among a good colour perception of lines, good test detectability, minimum immunoreagent consumption, and rapid test performance. The complete specifications of optimized conditions for the assay are included in the procedure description presented in Sections 2.9 and 2.10.

To validate the specificity of the ICT, the PCR product from standard microbial cultures was analyzed using the ICT and the agarose gel electrophoresis, separately. The results of both methods were compared. Fig. 2 demonstrates interpretation of ICT and electrophoresis results in the recognition of *C. sakazakii* and *E. cloacae* from the model microbial samples. It is clearly visible that PCR product detected by the ICT corresponds with its bp number to the specific gene sequence targeting 16S rRNA. Moreover, the ICT procedure is more rapid and did not use any device and dangerous compounds.

The stability of the ICT was examined after 6 months storage in vacuum-sealed bag at room temperature. The performance of the ICT proved stable over that period (see Table S1 in Supplementary Material).

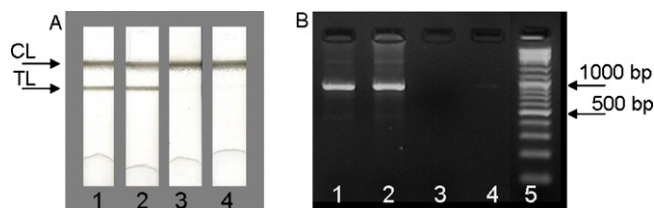


Fig. 2. Typical results of PCR product detection by immunochromatographic strip test (panel A) and agarose gel electrophoresis (panel B). PCR products of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (lane 1), *Cronobacter sakazakii* ATCC 12868 (lane 2), and *Enterobacter cloacae* ATCC 10699 (lane 3). The negative control (lane 4) was a primer control (PCR product without template DNA). DNA size standard mix 100–10,000 bp (lane 5). TL, test line specific to all species from genus *Cronobacter*. CL, control line.

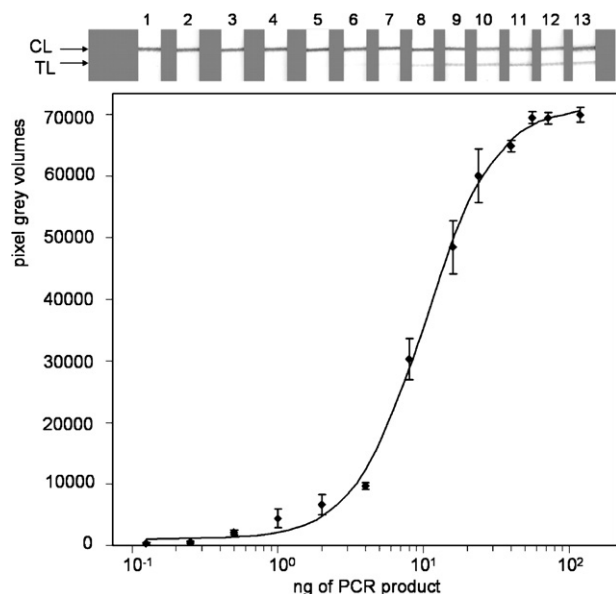


Fig. 3. The colour intensity evaluation of the immunochromatographic strip test line. The upper panel shows the photo of strips. The lower panel shows the results of the immunochromatographic strip test evaluated by the calculated pixel grey volumes after flatbed scanning and image analysis. Each point represents the mean of 3 values $\pm$ standard deviation. The analyzed solution on strips 1–13 contained 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 40, 56, 72, and 120 ng of PCR product.

3.3. The detectability of the developed ICT

The relationship between the amount of the target amplicon and the test line intensity was investigated visually. Under the optimized experimental conditions, a series of diluted PCR product were applied to the developed test (the range 0.125–120 ng per strip). For direct comparison of detectability, 3 μ L aliquots of the same PCR product samples were analyzed by gel electrophoresis. As low as 8 ng of target DNA was visually detectable with the strip (Fig. 3, upper part) whereas 24 ng was detected by electrophoresis (Table 1).

Table 1

Comparison of some parameters of methods used for detection of *Cronobacter* spp.

Method	Time needed for detection of <10 cells of <i>Cronobacter</i> spp.	Demands for instrumentation	Potential for semiquantitative assay of specific DNA sequence
Cultivation + PCR + ICT	16 h ^a	Low	Yes LOD ^b = 8 ng
Cultivation + PCR + electrophoresis	18 h ^a	Higher	Yes LOD ^b = 24 ng
Reference microbiological method ^c	6–7 days	Very low	No

^a Sum of duration for bacteria cultivation, DNA extraction, amplification and detection.

^b Visual limit of detection.

^c ISO/TS 22964:2006.

In order to investigate instrumentally the dependence of the test line intensity on the PCR product amount and verify the visual detectability, intensities of the strip test line were analyzed by flatbed scanning, and pixel grey volumes were calculated with TotalLab image analysis software. The intensity value was plotted as a function of the amount of PCR product (Fig. 3, the lower panel). The dependence was very well fitted as a sigmoid curve. The upper plateau was reached at about 120 ng of PCR product. The 50% intercept related to the midpoint of the curve was 10.2 ± 1.4 ng. However, in the ICT approach, the sensitivity is not the major concern, because all the samples have to be precultivated and amplified by PCR. The bacteria enrichment duration and the PCR procedure used in this study provided production of more than 120 ng of PCR product per 3 μ L in all experiments with positive results, presented in Sections 3.5 and 3.6.

To determine the reproducibility of the strip test, samples of 8 and 24 ng of PCR product were assayed each on six strips. Densitometric analysis of the test lines gave CVs of 9.7% and 7.3%, respectively, for the colour intensity values.

3.4. Comparison of ICT and gel electrophoresis

From performed experiments (Sections 3.2 and 3.3) and procedure parameters of both detection techniques it can be assumed that the ICT provides following advantages over gel electrophoresis in detection of PCR product: (i) the test takes only 10 min compared to hours required for electrophoresis, (ii) it does not require instrumentation, (iii) it does not require well skilled technician in performing the test and interpreting the results, (iv) it uses no dangerous compounds, while ethidium bromide is used in electrophoresis, (v) the strip test has three times better detectability, (vi) it allows also confirmation of the correct amplicon by two different bioreceptors binding specifically both labels occurring exclusively in correct amplicon, as opposed to electrophoresis that only recognized the approximate size of amplicon. Moreover, it is necessary to validate the ICT in additional experiment as shown below.

3.5. Validation of ICT by testing microbial strains

The PCR primers used in this assay were selected for being very specific for *Cronobacter* spp. (Cawthorn et al., 2008; Lehner et al., 2004). Nevertheless, we evaluated the developed ICT specificity by testing a range of PCR products obtained from a variety of verified bacterial strains which include *Cronobacter* spp. and other food relevant microorganisms. Considering above mentioned facts about the ICT detectability the enrichment phase of bacteria detection including immunostrip was shortened to 12 h in all next experiments. As presented in Table 2, all of tested strains were identified in accordance with the results of standard microbiological methods (plating the strains on the chromogenic agar ESIA, and by the biochemical test ID 32E). All *Cronobacter* strains gave positive results. No detectable reactivity occurred with any of other (non-*Cronobacter*) members from the family of *Enterobacteriaceae*.

Table 2

The results obtained from immunochromatographic strip test and conventional microbiological methods for the identification of *Cronobacter* spp. and their differentiation from some other members of *Enterobacteriaceae*.

No.	Strain	Identification	Results			No.	Strain	Identification	Results		
			ICT	B	E				ICT	B	E
CB 01	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	CB 46	<i>C. turicensis</i>		+	+	+
CB 02	<i>Cronobacter</i> sp.		+	+	+	CB 47	<i>C. muytjensii</i>	CDC 3523-75	+	+	+
CB 03	<i>C. sakazakii</i>	ATCC 29544	+	+	+	CB 48	<i>C. muytjensii</i>	ATCC 51329	+	+	+
CB 04	<i>C. sakazakii</i>	CCM 1902	+	+	+	CB 49	<i>C. dublinensis</i>		+	+	+ ¹
CB 05	<i>Cronobacter</i> sp.	CCM 3460	+	+	+	CB 50	<i>C. dublinensis</i>		+	+	+
CB 06	<i>Cronobacter</i> sp.	CCM 3479	+	+	+	CB 51	<i>C. genomosp.1</i>	NCTC 9529	+	+	+
CB 30	<i>C. sakazakii</i>	ATCC 12868	+	+	+	EB 20	<i>E. cloacae</i>	ATCC 10699	–	–	–
CB 31	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 21	<i>E. aerogenes</i>	CCM 2531	–	–	–
CB 32	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 22	<i>E. cloacae</i>	CCM 2320	–	–	–
CB 33	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 23	<i>E. gergoviae</i>	CCM 3459	–	–	–
CB 34	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 24	<i>E. cowanii</i>	CCM 7015	–	–	–
CB 35	<i>C. sakazakii</i>	CDC 996-77	+	+	+	EB 25	<i>E. amnigenus</i>	ATCC 33072	–	–	–
CB 36	<i>C. sakazakii</i>	CDC 9369-75	+	+	+	EB 26	<i>E. cancerogenus</i>	ATCC 33241	–	–	–
CB 37	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 30	<i>E. cloacae</i>		–	–	–
CB 38	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 31	<i>E. helveticus</i>		–	–	–
CB 39	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 32	<i>E. helveticus</i>		–	–	–
CB 40	<i>C. sakazakii</i>	CDC 3128-77	+	+	+	EB 33	<i>E. hormaechei</i>		–	–	–
CB 41	<i>C. sakazakii</i>		+	+	+	EB 34	<i>E. hormaechei</i>		–	–	–
CB 42	<i>C. malonaticus</i>		+	+	+	EB 35	<i>E. pulveris</i>		–	–	–/+ ²
CB 43	<i>C. malonaticus</i>		+	+	+	EB 36	<i>E. pulveris</i>		–	–	–
CB 44	<i>C. malonaticus</i>	CDC 1058-77	+	+	+	EB 37	<i>E. turicensis</i>		–	–	–/+ ²
CB 45	<i>C. malonaticus</i>		+	+	+	EB 38	<i>Enterobacter</i> sp.		–	–	–

ATCC – American Type Culture Collection. NCTC – UK National Collection of Type Cultures. CCM – Czech Collection of Microorganisms. CDC – Centers for Disease Control and Prevention (USA). CB 01–CB 06, EB 20–EB 26: strains from Czech Collection of Microorganisms (CCM). CB 30–CB 51, EB 30–EB 38: strains kindly donated by Dr. Carol Iversen (University College Dublin). ICT – results obtained by immunochromatographic strip: (+) positive result; (–) negative result. B – results obtained by biochemical test ID 32E: (+) positive result (strain was identified as *Enterobacter sakazakii*); (–) negative result (strain was identified as other member of *Enterobacteriaceae* family). E – growth on chromogenic agar ESIA: (+) positive result (blue coloured colonies); (–) negative result (white colonies); (+¹) different characteristics of colonies, but blue coloured; (–/+²) presence of both, blue- and white- coloured colonies on ESIA.

3.6. Detection of genus *Cronobacter* in spiked samples

Generally, there is the lack of studies where natural pathogen samples are detected by biosensors. The aim of our work was to develop the prototype of an ICT utilizable for testing spiked food samples. According to the zero tolerance limits of *Cronobacter* cells given by Commission Regulation No. 1441/2007 (Anonymous, 2007), the important significance has the ability of the test to detect less than 10 *Cronobacter* cells in 10 g of powdered infant milk formulae.

To verify the possibility of the application of the developed ICT, we prepared 10 samples, artificially contaminated with less than 10 cells of *Cronobacter* spp. The prepared samples were analyzed by the integrated enrichment–extraction–amplification–detection procedure including ICT and by the reference microbiological analysis according to ISO/TS 22964:2006 including ID 32E confirmation. Both methods showed the same results (data not shown); all artificially contaminated samples were determined as positive. The possible influence of different kinds of samples on bacterial growth conditions and for the DNA extraction extent was not observed. The negative controls (samples of infant formulas without inoculation) did not provide any false positive results.

Using the developed ICT less than 10 cells of *Cronobacter* spp. were detected within 16 h (12 h for cultivation and 4 h for DNA isolation, PCR and ICT). On the other hand, the detection and confirmation of this pathogen by ISO/TS 22964:2006 takes 6–7 days (Table 1).

4. Conclusions

We have successfully demonstrated that the approach of using the combination of nucleic acid amplification and an immunochromatographic based detection principle can offer distinct advantages in terms of sensitivity, specificity, and speed for genus *Cronobacter* detection. After enrichment of bacterial sample, the developed procedure consists of an isolation of template DNA,

a PCR amplification step of specific sequences and the detection of amplified product by the developed ICT. The ICT, with immobilized antibody against digoxigenin on nitrocellulose membrane, bound amplified product labelled by digoxigenin, if *Cronobacter* was present in sample. Colloidal carbon nanoparticles as a tracer provide visual evidence of the presence of genus *Cronobacter* within 10 min. The ICT is simple, easy to perform, allowing for non-specialized personnel application in the final detection of bacteria presence without requirement for intensive labour and any device. The developed procedure allows detection of less than 10 bacterial cells in samples of dried infant formula. Moreover, the incorporation of the ICT into whole detection procedure resulted into the shortest known method of the *Cronobacter* detection in food samples. Although further improvement might be required (mainly concerning shorter duration of bacteria enrichment), and more extensive validation of ICT might be asked, the results demonstrated that the analysis of PCR product using ICT has a potential to be a useful tool for a rapid and easy-to-use detection of genus *Cronobacter*.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Grant Agency (project no. 525/09/1075), Ministry of Education of Czech Republic (projects nos. MSM 6046137305 and 2B06048), and Specific University Research (MSMT No. 21/2010). Authors are thankful to Dr. Carol Iversen from University College Dublin for providing bacterial strains used in this study, Dipl. Ing. Kristýna Myšáková for technical assistance in laboratory, and Dr. G. Wyatt formerly of IFR Norwich, UK, for language improvement.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2010.10.001.

References

- Almeida, C., Azevedo, N.F., Iversen, C., Fanning, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J., 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2925–2930.
- Andrade, T.P.D., Lightner, D.V., 2009. *J. Fish Dis.* 32, 911–924.
- Anonymous, 2006. ISO/TS 22964 (2006). Milk and Milk Products – Detection of *Enterobacter sakazakii*.
- Anonymous, 2007. The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 Amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs.
- Banada, P.P., Huff, K., Bae, E., Rajwa, B., Robinson, J.P., Hirleman, E.D., Bhunia, A.K., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1664–1671.
- Blažková, M., Koets, M., Rauch, P., van Amerongen, A., 2009a. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 867–874.
- Blažková, M., Mičková-Holubová, B., Rauch, P., Fukal, L., 2009b. *Biosens. Bioelectron.* 25, 753–758.
- Cawthorn, D.-M., Botha, S., Witthuhn, R.C., 2008. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 129–138.
- Dineva, M.A., Candotti, D., Fletcher-Brown, F., Allain, J.P., Lee, H., 2005. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4015–4021.
- Fong, W.K., Modrusan, Z., McNevin, J.P., Marostenmaki, J., Zin, B., Bekkaoui, F., 2000. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2525–2529.
- Gas, F., Baus, B., Pinto, L., Compere, C., Tanchou, V., Quéméneur, E., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1235–1239.
- Heyduk, E., Heyduk, T., 2010. *Anal. Biochem.* 396, 298–303.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2008. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1442–1447.
- Jin, S.Q., Yin, B.C., Ye, B.C., 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6647–6654.
- Koets, M., van der Wijk, T., van Eemeren, J.T.W.M., van Amerongen, A., Prins, M.W.J., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1893–1898.
- Kozwicz, D., Johansen, K.A., Landau, K., Roehl, C.A., Woronoff, S., Roehl, P.A., 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2711–2717.
- Lampel, K.A., Chen, Y., 2009. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 178–184.
- Lazcka, O., Del Campo, F.J., Munoz, F.X., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1205–1217.
- Lee, H.-J., Kim, B.C., Kim, K.-W., Kim, J., Oh, M.-K., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3550–3555.
- Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R., 2004. *BMC Microbiol.* 4, 43, doi:10.1186/1471-2180-r4-43.
- Lin, M.S., Al-Holy, M., Al-Quadri, H., Kong, F., Rasco, B.A., Setiady, D., 2009. *J. Food Saf.* 29, 531–545.
- Litos, I.K., Ioannou, P.C., Christopoulos, T.K., Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3135–3139.
- Liu, J.C., Tsai, P.J., Lee, Y.C., Chen, Y.C., 2008. *Anal. Chem.* 80, 5425–5432.
- Mao, X., Ma, Y., Zhang, A., Zhang, L., Zeng, L., Liu, G., 2009. *Anal. Chem.* 81, 1660–1668.
- Mens, P.F., van Amerongen, A., Sawa, P., Kager, P.A., Schalling, H.D.F.H., 2008. *Parasitology* 138, 412–427.
- Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2390–2396.
- Nandakumar, V., La Belle, J.T., Reed, J., Shah, M., Cochran, D., Joshi, L., Alford, T.L., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1039–1042.
- Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S., Chakravorty, D., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 25, 661–667.
- Piliarik, M., Párová, L., Homola, J., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1399–1404.
- Pöhlman, C., Humenik, M., Sprinzl, M., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3383–3386.
- Poitras, C., Tufenkji, N., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2137–2142.
- Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., van Amerongen, A., 2009. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 569–582.
- Qi, Y., Li, B., Zhang, Z., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3581–3586.
- Rodbard, D., 1974. *Clin. Chem.* 20, 1255–1270.
- Sanvicens, N., Pastells, C., Pascual, N., Marco, M.-P., 2009. *Trends Anal. Chem.* 28, 1243–1252.
- Seo, K.H., Brackett, R.E., 2005. *J. Food Prot.* 68, 55–64.
- Skottrup, P.D., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 24, 339–348.
- Soo, P.-C., Horng, Y.-T., Hsueh, P.-R., Shen, B.-J., Wang, J.-Y., Tu, H.-H., Wei, J.-R., Hsieh, S.-C., Huang, C.-C., Lai, H.-C., 2006. *J. Microbiol. Meth.* 66, 440–448.
- Torres-Chavolla, E., Alocilja, E.C., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3175–3182.
- Wang, M., Cao, B.Y., Gao, Q.L., Sun, Y.M., Liu, P., Feng, L., Wang, L., 2009. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3178–3184.
- Won-Bo, S., Choi, J.-G., Kim, J.-Y., Yang, Z.-Y., Lee, K.-H., Kim, M.-G., Ha, S.-D., Kim, K.-S., Kim, K.-Y., Kim, C.-H., Ha, K.-S., Eremin, S.A., Chung, D.-H., 2007. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1152–1161.
- Zhang, D., Carr, D.J., Alocilja, E.C., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1377–1381.
- Zhang, X., Geng, P., Liu, H., Teng, Y., Liu, Y., Wang, Q., Zhang, W., Jin, L., Jiang, L., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2155–2159.

Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk

Barbora Javůrková · Martina Blažková ·
Ladislav Fukal · Pavel Rauch

Received: 7 January 2012 / Revised: 10 February 2012 / Accepted: 17 February 2012 / Published online: 7 March 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Rapid and specific detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula milk (IFM) is of great importance for health and safety reasons. In the present study, two rapid and specific methods, the immunochromatographic strip (ICT) and the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), were tested for the detection of *Cronobacter* spp. in IFM. IFM samples spiked by *Cronobacter* spp. were correctly detected as positive by both methods. These results were verified by the classical cultivation microbiological method (ISO/TS 22964:2006). All three methods were used for the analyses of 13 IFM samples from a local market with identical results. Only one IFM sample was found to be positive. Both tested methods considerably reduced the total detection time, to 24 h (ICT) and 46 h (MALDI-TOF MS), whereas the reference ISO/TS 22964:2006 method needs 140 h.

Keywords *Cronobacter* · Food-borne pathogen · Milk · Rapid detection · MALDI-TOF MS · Immunostrip

Introduction

Cronobacter is a recently proposed genus consisting of seven genomospecies and three subspecies that encompass the organisms formerly referred as *Enterobacter sakazakii* [1, 2]. *Cronobacter* spp. are considered emerging food-borne pathogens that have been known to cause serious

infections in infants, mainly neonates. Although the food-borne infections caused by these pathogens are not common, these pathogens have a 40–80% fatality rate in infected infants [3, 4].

Cronobacter is ubiquitous in nature and has been isolated from various food sources [5–7]. Its primary reservoir is still unknown, but plant material is believed to be the likely source [8]. The organism has been isolated from powdered milk, cheese products, and in dairy plants, this suggests that *Cronobacter* is a robust contaminant of milk [9, 10]. *Cronobacter* spp. have been found mainly in powdered infant milk formula (IFM), which is the most dangerous, with respect to neonates [11]. This is a reason why a Codex Alimentarius guideline was revised and zero tolerance limits for genus *Cronobacter* in powder infant formula was established [12].

The traditional microbiological detection of *Cronobacter* cells needs one week to complete [13, 14]. Thus, it is necessary to look for rapid, simple and reliable methods for detection of this pathogen. Several rapid techniques were developed [3], including mass spectrometry [15], and immunoassay [16]. The newly developed procedures seem to fulfil the criteria, but still have various shortcomings.

The objective of this study was to test the suitability of immunochromatographic strip (ICT) and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for these purposes.

Materials and methods

IFM samples used in this study

Samples of IFM were collected from supermarket chains in the Czech Republic.

B. Javůrková · M. Blažková · L. Fukal · P. Rauch (✉)
Department of Biochemistry and Microbiology,
Institute of Chemical Technology, Technická 5,
166 28 Prague, Czech Republic
e-mail: pavel.rauch@vscht.cz

Spiked samples were prepared as follows:

1. One sample free of added *Cronobacter* spp. was divided into several aliquots. Each one was spiked with different *Cronobacter* spp. Decimal dilutions of overnight cultures (12 h) of different *Cronobacter* spp. were prepared. Aliquots (1 mL) of the cultures containing <10 cells were inoculated into flasks containing 10 g of IFM with 90 mL of peptone water (BPW, Sigma-Aldrich, Germany).
2. Different samples of IFM were spiked only by *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544. Decimal dilutions of an overnight culture *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 were prepared. Aliquots (1 mL) of the cultures containing 10^7 cells (positive control 1, PC1) and <10 cells (positive control 2, PC2) were inoculated into flasks containing 10 g of IFM with 90 mL of peptone water.

Cronobacter detection in the IFM samples according to the standard ISO/TS 22964:2006

IFM samples were analysed according to ISO/TS 22964:2006 [13], see Table 1. The pre-enrichment medium, 90 mL of buffered peptone water was inoculated with 10 g of the IFM and incubated at 37 °C for 20 h. The culture (100 µL) obtained by the pre-enrichment was inoculated to 10 mL of selective enrichment medium modified Lauryl Sulphate Tryptose Broth (mLST, Oxoid LTD., Basingstoke, UK) and was incubated at 44 °C for 24 h. Suspect colonies were inoculated to a chromogenic agar *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA™, AES Laboratoire CHEMUNEX, Ker Lann, France) and incubated at 44 °C for 24 h. Typical colonies were selected from the chromogenic agar and plated to the Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid LTD., Basingstoke, UK) at 25 °C for 48 h. Isolates producing a yellow pigment were biochemically characterized (24 h) using the identification system ID 32 E (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France).

Cronobacter detection in the IFM samples by the immunochromatographic test

A sample of IFM (10 g) was mixed with mLST (90 mL) and cultivated at 37 °C for 20 h, see Table 1. An aliquot (1 mL) of the prepared suspension was used for DNA isolation performed by a GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), using the Gram-negative bacterial protocol. The isolated DNA was used for genus *Cronobacter*-specific PCR with labelled primers. The obtained amplicons (part of original *Cronobacter* DNA) were applied on the ICT in the mixture

with the carbon–neutravidin conjugate. In the test procedure, this mixture moved along the ICT strip. Presence of amplicon, that is, *Cronobacter* DNA, in the sample has been visible as a black line on the ICT strip [16]. The results were obtained for each sample in three separate analyses. The visual detection limit of amplicon was 8 ng.

Cronobacter detection in the food samples by the MALDI-TOF MS

A sample of IFM (10 g) was mixed with mLST (90 mL) and cultivated at 37 °C for 20 h, see Table 1. One loop full of prepared culture was streaked on ESIA™ plates (AES Laboratoire, France) and incubated 24 h at 44 °C. A small amount of bacteria obtained from this culture was deposited on MTP 384 (Bruker Daltonics) target polished steel in duplicate and allowed to dry at room temperature. The dried sample was overlaid with 1 µL of matrix consisting of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid, and allowed to co-crystallize with each sample [17]. The data were obtained for each sample in three separate analyses.

MALDI-TOF MS analysis was performed on Biflex IV MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Spectra were recorded by Flex Control software (Bruker Daltonics) in linear positive mode at an accelerated voltage of 19 kV in the range from 2,000 to 20,000 Da. Ribosomal proteins are detected under these conditions [15]. Bruker Bacterial Test Standard (*E. coli* DH5alpha peptide and protein profile plus additional proteins) was used for external calibration. For the identification, MALDI BioTyper™ system (Bruker Daltonics) software was used. Biotyper with its software is very useful accessory for MALDI-TOF. Thus, it is possible to use database containing peaks for identification of many microorganisms that are included, or create own superspectra and add to the Biotyper database.

Results and discussion

A specific food-safety criterion in the European Community is the zero tolerance limit for *Cronobacter* cells in IFM [12]. To fulfil this demand, it is necessary to start the detection procedure by using the pre-enrichment step. Then, all scientific effort is focused on the time of detection [14]. In this work, we compared the official microbiological ISO/TS method with ICT and MALDI-TOF MS. While the microbiological method is based on a series of biochemical tests, the ICT technique assessed the specific part of DNA and the MALDI-TOF detected specific ribosomal proteins of *Cronobacter* spp.

Table 1 ISO procedure, immunochromatographic test and MALDI-TOF mass spectrometry protocols used for the detection of *Cronobacter* spp. in the samples of infant formula milk

ISO ^a procedure	ICT ^b	MALDI-TOF ^c
10 g IFM ^d 90 mL BPW ^e ↓ 20 h, 37 °C 100 µL culture 10 mL mLST ^f ↓ 24 h, 44 °C ESIA ^g ↓ 24 h, 44 °C TSA ⁱ ↓ 48 h, 25 °C colony ↓ biochemical characterization ↓ 24 h results	10 g IFM ^d 90 mL mLST ^f ↓ 20 h, 37 °C 1 mL ↓ DNA isolation ↓ 2 h DNA ↓ PCR ^h , ICT ^b ↓ 2 h results	10 g IFM ^d 90 mL mLST ^f ↓ 20 h, 37 °C ESIA ^g ↓ 24 h, 44 °C colony ↓ MS ^c ↓ 2 h results

^a ISO ISO/TS 22964:2006^b ICT immunochromatographic test^c MALDI-TOF matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry^d IFM infant formula milk^e BPW buffered peptone water^f mLST modified lauryl sulphate tryptose broth^g ESIA chromogenic agar *Enterobacter sakazakii* isolation agar^h PCR polymerase chain reactionⁱ TSA tryptone soya agar

Detection of *Cronobacter* spp. in spiked IFM samples

To compare specificity and limit of detection of the detection methods used, we prepared samples of IFM spiked with low concentrations (<10 cells) of all currently known members of genus *Cronobacter* (Table 2). This series of experiments was set up to demonstrate the ability of the methods used (ISO, ICT and MS) to detect small amounts of *Cronobacter* cells in IFM samples, to verify the specificity of the methods, and their capability to reveal the presence of all *Cronobacter* species. Nine parallels of IFM were prepared. Seven parallels were inoculated each with one member of genus *Cronobacter*: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*,

C. universalis, *C. condiment* and *C. muytjensii*; one parallel by *Enterobacter cloacae*, and one was processed without artificial inoculation. A non-spiked IFM sample and a sample spiked by *E. cloacae* served as controls. All prepared IFM samples were analysed by official ISO/TS 22964:2006 method, ICT method, and MALDI-TOF MS. *Cronobacter* spp. were correctly detected in all analysed spiked IFM samples (Table 2). That means that all methods tested can detect all 7 till now known species of *Cronobacter*. Those species have different biochemical behaviour with possible different following health impacts [2].

The time schedule and duration of the detection procedures used are shown in Table 1.

Table 2 Analysis of infant formula milk samples spiked with <10 cells of *Cronobacter* spp. tested by ISO procedure, immunochromatographic test and MALDI-TOF mass spectrometry

Strain used for inoculation	Results		
	ISO ^a	ICT ^b	MALDI-TOF ^c
Without inoculation	–	–	–
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	+	+	+
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	+	+	+
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	+	+	+
<i>C. turicensis</i> DSM 18703	+	+	+
<i>C. dublinensis</i> lactaridi	+	+	+
<i>C. universalis</i> NCTC 9529	+	+	+
<i>C. condimenti</i> NTU 1330	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	–	–	–

^a ISO ISO/TS 22964:2006^b ICT immunochromatographic test^c MALDI-TOF matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry**Table 3** Detection of genus *Cronobacter* in real samples of infant formula milk including artificially contaminated parallels with *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544

No.	Real samples ^f			Real samples spiked by			
	ISO ^a	ICT ^b	MT ^c	PC1 ^d		PC2 ^e	
				ICT ^b	MT ^c	ICT ^b	MT ^c
1	–	–	–	+	+	+	+
2	–	–	–	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	–	–	–	+	+	+	+
5	–	–	–	+	+	+	+
6	–	–	–	+	+	+	+
7	–	–	–	+	+	+	+
8	–	–	–	+	+	+	+
9	–	–	–	+	+	+	+
10	–	–	–	+	+	+	+
11	–	–	–	+	+	+	+
12	–	–	–	+	+	+	+
13	–	–	–	+	+	+	+

^a ISO ISO/TS 22964:2006^b ICT immunochromatographic test^c MT matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry^d PC1 sample containing 10⁷ cfu (positive control 1)^e PC2 sample containing <10 cfu (positive control 2)^f Real sample without inoculation

Detection of genus *Cronobacter* in real IFM samples

Successful detection of all spiked samples of IFM allowed us to analyse samples of IFM from the local market (Table 3). In this study, a total of 13 samples were assessed for the content of *Cronobacter* spp. by official microbiological method ISO/TS, ICT and MALDI-TOF MS. Contamination by *Cronobacter* spp. was found and declared only in one sample. A positive response was obtained by all three methods used. All IFM samples with negative results were furthermore

spiked with two different concentrations (PC1, 10⁷ cell and PC2, <10 cells) of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544. The higher number of cells (PC1) serves as a control that all methods are working by right way. The methods tested must be able to detect the lower number of cells (PC2). All samples spiked by this way were correctly detected by all three methods.

The results we obtained fit the findings made by other authors. The occurrence of *Cronobacter* spp. in milk and milk products is rare [18–21], but with respect to dangerousness of this pathogen is necessary to monitor it.

Table 4 Comparison of ISO procedure, immunochromatographic test and MALDI-TOF mass spectrometry

Items	ISO ^a	ICT ^b	MALDI-TOF ^c
Duration of micro-organism cultivation (h)	116	20	44
Total time of detection (h)	140	24	46
LOD ^d	<10 cells	<10 cells	<10 cells
Requirement of pure culture	Yes	No	Yes
Specificity	Genus <i>Cronobacter</i>	Genus <i>Cronobacter</i>	Genus <i>Cronobacter</i>
Required laboratory equipment	None	Thermocycler	MALDI-TOF MS, MALDI BioTyper™ system
Requirement of well trained personnel	Important	Less important	Less important
Labour costs per 100 tests (in €)	1,500	270	450

^a ISO ISO/TS 22964:2006^b ICT immunochromatographic test^c MALDI-TOF matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry^d LOD limit of detection

Evaluation of methods for *Cronobacter* detection

Rapid, sensitive, specific, and low cost detection of pathogens in food samples is of great interest [22, 23]. Therefore, we compared all parameters of methods used for genus *Cronobacter* detection (Table 4).

The initial cultivation of micro-organisms takes, in the case of ISO/TS, ICT and MALDI-TOF MS, 20 h (Table 1). Then, the ISO/TS identification needs further cultivations, and the results are obtained within 140 h. Also the MALDI-TOF MS technique needs another 24 h cultivation step and then the results are obtained within 2 h. The ICT procedure is the most rapid and it is finished, after DNA isolation and PCR, in 4 h. Table 4 shows that both tested methods, ICT and MALDI-TOF MS, reduced the total analysis time of the analysis in comparison with microbiological ISO/TS detection. While the official method ISO/TS needs 140 h to finish detection, evaluation of *Cronobacter* by ICT only 24 h and by MALDI-TOF MS takes 46 h.

All tested method must be able to detect <10 *Cronobacter* cells in the analysed IFM sample (Table 4).

The specificity of *Cronobacter* detection is illustrated in Table 2. Both tested methods, ICT and MALDI-TOF MS gave the same results as the official ISO/TS method.

The results shown in Table 4 suggest that the ICT is the simplest, easy to perform, allowing non-specialized personnel to use the application without a requirement for intensive labour and it needs as a device only thermocycler. The final detection is simple due to visual estimation.

Conclusions

We have successfully demonstrated the use of two methods, ICT and MALDI-TOF MS, for the rapid and specific

detection of genus *Cronobacter* in IFM. The most rapid and simple detection was achieved by the ICT technique. The total duration of the assay is 24 h, even though the procedure is accompanied by a DNA isolation step. MALDI-TOF MS detection takes more time (46 h), due to the necessity to perform two cultivation steps of IFM sample. Thus, both methods considerably reduced the total analysis time, fulfil the demands on microbiological criteria for IFM samples and have a potential to be a rapid and inexpensive detection of genus *Cronobacter* in the laboratory.

Acknowledgments This work was supported by the Czech Grant Agency (project No. 525/09/1075), by Ministry of Education of Czech Republic (projects no. MSM 6046137305) and by Specific University Research (MSMT No. 21/2011). Authors are thankful to Dr. C. Iversen from University College Dublin and to Prof. S. Forsythe from Nottingham Trent University for providing bacterial strains used in this study.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Iversen C, Forsythe SJ (2004) Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol 21:771–777
- Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, Levican A, Figueras MJ, Forsythe SJ (2011) *Cronobacter condimentii* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. Int J Syst Evol Microbiol doi:10.1099/ijs.0.032292-0 (in press)
- Lampel KA, Chen Y (2009) Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. Int J Food Microbiol 136:179–184
- Liu Y, Gao Q, Zhang X, Hou Y, Yang J, Huang X (2006) PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. Mol Cell Probes 20:11–17

5. Baumgartner A, Grand M, Liniger M, Iversen C (2009) Detection and frequency of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *Int J Food Microbiol* 136:189–192
6. Friedemann M (2007) *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol* 116:1–10
7. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR (2005) *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104:1–34
8. Lehner A (2009) Highlighting environmental reservoir aspects for *Cronobacter* spp. Oral presentation at the 1st International Meeting on *Cronobacter*. O'Reilly Hall, University College Dublin, Ireland 22nd–23rd January 2009
9. Forsythe SJ (2005) *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern Child Nutr* 1:44–50
10. Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RB (2006) A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. *J Food Prot* 69:315–322
11. Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsdottir O (1989) Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powder milk. *J Clin Microbiol* 27:2054–2056
12. Anonymous (2007) The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs
13. Anonymous (2006) ISO/TS 22964 (2006) Milk and milk products—detection of *Enterobacter sakazakii*
14. Seo KH, Brackett RE (2005) Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Prot* 68:59–63
15. Fenselau C, Demirev PA (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 20:157–171
16. Blažková M, Javůrková B, Fukal L, Rauch P (2011) Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosens Bioelectron* 26:2828–2834
17. Anonymous (2011) Application Note # MT-80, <http://www.maldiviotyper.com/pdf/MT-80-3-ident-eBook.pdf>, downloaded 9.11.2011
18. Baumgartner A, Niederhauser I (2010) Occurrence of *Cronobacter* spp. in raw milk. *J Consum Prot Food Saf* 5:253
19. Kandhai MC, Reij MW, Gorris LGM, Guillaume-Gentil O, van Schothorst M (2004) Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* 363:39–40
20. Kandhai MC, Heuvelink AE, Reij MW, Beumer RR, Dijk R, van Tilburg JHH, van Schothorst M, Gorris LGM (2010) A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in the Netherlands between 2001 and 2005. *Food Control* 21:1127–1136
21. Reich F, König R, von Wiese W, Klein G (2010) Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int J Food Microbiol* 140:214–217
22. Martinez-Blanch JF, Sanchez G, Garay E, Aznar R (2011) Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR. *Eur Food Res Technol* 232:951–955
23. Shukla S, Bang J, Heu S, Kim M (2011) Development of immunoliposome-based assay for the detection of *Salmonella* Typhimurium. *Eur Food Res Technol*. doi:10.1007/s00217-011-1606-6 (in press)



Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole

Martina Blažková, Pavel Rauch, Ladislav Fukal*

Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2009

Received in revised form 15 February 2010

Accepted 16 February 2010

Available online 24 February 2010

Keywords:

Immunoassay test

Thiabendazole

Carbon particle

Fruit juice

Food analysis

ABSTRACT

There is increased interest in the investigation and implementation of rapid screening methods for detection of pesticide residues. This study reports development of an immunoassay test for thiabendazole detection based on indirect competitive principle using carbon particles as a label. Nitrocellulose membrane strip was coated with a thiabendazole-protein conjugate in the defined test zone. In flow of an antibody-carbon complex and thiabendazole along the strip, the intensity of black colour formed in the test line reflected the thiabendazole concentration and semi-quantitative estimation could be carried out visually. The optimized test was accomplished within 10 min and the visual detection limit was achieved 0.25 ng mL^{-1} of standard sample. Moreover, immunoassay was evaluated quantitatively using scanning densitometry. Based on standard curve, the detection limit of the proposed test was as low as $0.08 \pm 0.03 \text{ ng mL}^{-1}$ with an IC_{50} value of $0.60 \pm 0.08 \text{ ng mL}^{-1}$ and a linear working range of $0.11\text{--}4.13 \text{ ng mL}^{-1}$. Results of testing precision, stability, and specificity demonstrated that the assay provided a reliable performance.

This immunoassay was applied to analysis of spiked fruit juices in range of $0.05\text{--}5 \text{ mg L}^{-1}$. Matrix interferences were avoided by simple dilution of samples. Both visual and instrumental evaluations indicated a good agreement with results obtained by ELISA. Recoveries from juices were from 81.9 to 123.6% and relative standard deviations ranged from 9.9 to 19.3%. The developed strip offers potential as a useful rapid and simple method for screening of thiabendazole in fruit juices at levels far below the maximum residue limits.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of pesticides provides benefits in providing a supply of high-quality crops, but their incorrect application can leave harmful residues, which involve a potential risk for human health. Thiabendazole (2-(4'-thiazolyl)benzimidazole) is one of the most commonly used fungicides to control postharvest decay caused by fungi in various fruits and vegetables. The persistence of thiabendazole residues in agricultural products destined to human consumption is important problem. Several studies have been performed to demonstrate residues in edible parts of raw fruits (García-Reyes et al., 2006; Ito et al., 2003; Veneziano et al., 2004; Zamora et al., 2004) and in fruit juices (Gilbert-López et al., 2007; Romero-González et al., 2008; Tadeo et al., 2004; Young et al., 2001b). To protect consumers from risks related to thiabendazole in food, European Union legislation has established maximum residue limits (MRLs) for raw fruit and vegetables. The MRLs range from 0.05 to 15 mg kg^{-1} , depending on the crop (Anonymous, 2008). For fruits like oranges, apples, pears and bananas, the MRL is 5 mg kg^{-1} . Due to the absence of legal threshold values for processed products

such as juices, they have been normally considered as the MRLs stated for raw fruits.

The most frequently used method for thiabendazole analysis is high performance liquid chromatography (HPLC) with UV, fluorescence or mass spectrometric detection (Albero et al., 2004; Gilbert-López et al., 2007; Wu et al., 2009; Young et al., 2001a). Although highly sensitive and reliable, they require well-equipped laboratories, trained personnel, and involve time-consuming sample preparation steps. In this context, there has been increased interest in the development and implementation of rapid screening methods, including immunoassays, for detection of pesticide residues. Several authors (Abad et al., 2001; Bushway, 1996) have reported monitoring of thiabendazole in fruit juices using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, for non-specialized laboratories, it can be difficult to perform labour intensive operations including repeated incubation and washing, and enzyme reaction for final signal generation in ELISA. Membrane strip-based immunoassays have also become increasingly practical tools in contaminant monitoring. Immunoassay performance relies on the migration of sample and antibody-particle conjugate along reagent-coated membrane strip where the corresponding affinity interactions take place. This technology can be considered as a miniaturized affinity chromatography with an antibody included in the flow matrix. The enhanced interaction

* Corresponding author. Tel.: +420 220445137; fax: +420 220445167.
E-mail address: fukal@vscht.cz (L. Fukal).

rate between reactants, the capturing of labelled antibody in a few tenths of a millimetre on the membrane and the easy-to-use test performance are features of the strip tests that make them valuable and even more competitive than the ELISA techniques. Unlike fluorescence or enzyme-detection systems, particle probes are more stable and easy to use. There are no needs for fussy operations as incubation, washing and enzymatic reactions during signal generation, which distinctly shorten the detection time. Especially, the results can be read directly by naked eyes, which ensure the convenience of assays (Posthuma-Trumpie et al., 2009). Recently, the application of strip tests has been shown to be useful technique for an assessment of pesticides and other low-molecular weight contaminants in food (Chen et al., 2008; Kolosova et al., 2008; Li et al., 2009; Lisa et al., 2009; Shi et al., 2008; Tang et al., 2009; Wang et al., 2007; Zhou et al., 2009). However, a reliable strip test for screening of thiabendazole has not been described.

The aim of this work was to develop a rapid and easy strip method for the detection of thiabendazole based on competitive immunoassay using colloidal carbon particles. Conditions of a designed strip procedure were optimized, and the characteristics of the proposed system were investigated. The application feasibility was tested in analyses of spiked juice samples. Semi-quantitative and quantitative strip results were compared with those obtained by ELISA. The several distinct advantages, such as simplicity and speed of performance, as well as sufficient sensitivity and acceptable reliability make it a potentially useful tool for screening of thiabendazole contamination in fruit juices.

2. Experimental

2.1. Immunoreagents, chemicals and materials

The rabbit anti-swine IgG antibody (RASw) as well as the swine anti-mouse IgG antibody (SwAM) was supplied from Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, The Netherlands). The mouse anti-thiabendazole monoclonal antibody as well as the thiabendazole hapten-ovalbumin conjugate (thiabendazole-OVA) was purchased from Centro de Apoyo a la Innovación, la Investigación y la Transferencia de Tecnología (Universidad Politécnica de Valencia, Spain). Producer indicated these immunoreagents as LIB-TN3C13 and OVA-TN3C, respectively (Abad et al., 2001). Horseradish peroxidase (HRP)-labelled swine anti-mouse IgG (SwAM, HRP/SwIgG = 1.81, concentration 8.9 mg mL^{-1}) was supplied by Seva Pharma (Prague, Czech Republic).

Standards of thiabendazole (98.5%, HPLC/DAD), 5-hydroxy-thiabendazole (99.5%, HPLC/DAD), albendazole (99%, HPLC/DAD), benzimidazole (99.5%, HPLC/DAD), fenbendazole (99.3%, HPLC/DAD), flubendazole (98.0%, HPLC/DAD), mebendazole (97.0%, HPLC/DAD), oxiabendazole (98.5%, HPLC/DAD) were from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Individual stock standard solutions containing 10 mg mL^{-1} of each compound were prepared by dissolving accurately weighted amounts in ethanol and stored in darkness at 4°C . Working standard solutions were freshly prepared by serial dilution in an assay buffer. Carbon nanoparticles (Spezial Schwartz 4, Degussa AG, Germany) were kindly provided from Agrotechnology & Food Sciences Group (Wageningen University and Research Centre, The Netherlands) as a dry powder (particles of amorphous shape with average size of 120 nm). Tween 20, *o*-phenylenediamine (OPD), bovine serum albumin (BSA), and other common chemicals (of the highest purity available) were purchased from Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, USA).

In optimization experiments aimed for selection of strip design, 13 types of nitrocellulose membrane obtained from three producers were tested. PRIMA 85, PRIMA 125, AE 98 FAST, AE 98, AE 99, Protran BA 83, Protran BA 85, Immunopore FP, and Immuno-

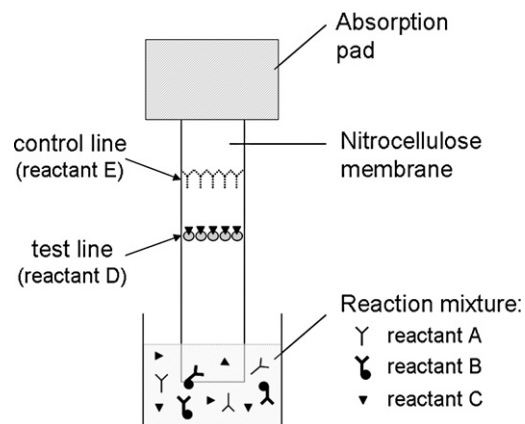


Fig. 1. Schematic illustration of the strip test design. Reactant A, mouse anti-thiabendazole antibody; reactant B, the conjugate of carbon particle with swine anti-mouse IgG antibody; reactant C, thiabendazole; reactant D, the thiabendazole-ovalbumin conjugate; reactant E, rabbit anti-swine IgG antibody.

pore RP were supplied from Whatman GmbH (Dassel, Germany); HiFlow Plus HF 135, HiFlow Plus HFB180, and HiFlow Plus 090 were from Millipore spol. s r.o. (Prague, Czech Republic); Unisart 140 was from Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne Cedex, France). Vinyl backing ARcare® 7823 was purchased from Adhesives Research Inc. (USA), and the absorbent pad CFSP from Millipore Corp. (USA).

2.2. Preparation of the antibody-carbon conjugate

The conjugate was prepared as described previously (Blažková et al., 2009) with gentle modification. Carbon nanoparticles were dispersed in 5 mM borate buffer (pH 8.8) by sonication for 20 min on the ice-water bath to obtain stable suspension (2 mg mL^{-1}). For conjugation, the swine anti-mouse IgG antibody (SwAM) diluted in 5 mM borate buffer (pH 8.8), was added slowly with gentle stirring to achieve a final protein concentration of $350 \mu\text{g mL}^{-1}$. This mixture was stirred gently at 4°C overnight. In the end, the suspension was washed three times by repeated centrifugation ($20,000 \times g$) at 10°C for 30 min with 5 mM borate buffer, pH 8.8 (containing 1% BSA and 0.02% NaN_3), and a final sediment was resuspended to the initial volume in washing buffer. Prepared stock suspension of the SwAM-carbon conjugate was stored at 4°C . Just before the use of stock suspension in the assay, it was diluted 10-fold with running buffer (0.1 M borate buffer, pH 8.8, containing 1% BSA, 0.05% Tween 20, and 0.02% NaN_3).

2.3. Immobilization of reagents on the strips

Linomat V (Camag AG, Switzerland) was used to dispense two lines on a nitrocellulose membrane sheet pasted to a vinyl backing ($20 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$). For the control line, rabbit anti-swine IgG antibody (RASw) at a concentration of 1 mg mL^{-1} (5 mM borate buffer, pH 8.8) was dispensed ($0.1 \mu\text{L}$ per 1 mm line). For the test line, a solution of thiabendazole-OVA at a concentration of $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (5 mM borate buffer, pH 8.8) was dispensed ($0.1 \mu\text{L}$ per 1 mm). After drying for 1 h at 37°C , the nitrocellulose membrane sheet was blocked with 1% BSA by incubation for 30 min, washed three times (5 mM borate buffer, pH 8.8), and then dried again at 37°C for 3 h. Subsequently, the membrane sheet was cut into test strips ($25 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) using a strip cutter (Economic Cutter ZQ2000, Shanghai Kinbio Tech Co. Ltd., Shanghai, China). Finally, an absorbent pad was cut in sections of $10 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ and pasted to the far end of the strip (Fig. 1). Strips prepared in such way were stored in sealed bags under dry conditions at laboratory temperature until used.

2.4. Strip assay

In a low-binding microplate well, 50 μL of thiabendazole standard solution diluted in 0.1 M borate buffer, pH 8.8 (or diluted sample) were mixed with 30 μL of the running buffer (0.1 M borate buffer, pH 8.8, containing 1% BSA, 0.05% Tween 20 and 0.02% NaN_3), 10 μL of SwAM-carbon conjugate, and 10 μL of anti-thiabendazole antibody diluted in the running buffer (0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The mixture was incubated for 30 s at room temperature. Then, the strip was put into the bottom of the microwell vertically and was taken out after 10 min. The assay results were interpreted as follows. The colour intensity of the test line was qualitatively estimated visually or quantitatively measured using scanning densitometry. In the visual assessment, samples producing the test line appearance of the same intensity as a negative control were considered to be negative (–). If the colour intensity of the test line was weaker than that of the negative control, the result was evaluated as weakly positive ($\pm$). When there was no band at the test line, the sample was positive (+). The control line is always visible above the test line assuring the assay was performed properly.

To obtain quantitative results, the dried test strips were scanned using an Epson Perfection V700 Photo Scanner (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan), and the test line intensities were converted to pixel grey volumes with a TotalLab TL100 software (Nonlinear USA Inc., NC, USA). A sigmoid standard curve was obtained by plotting the mean value of pixel grey volumes against the logarithm of thiabendazole concentrations through a four-parameter logistic equation:

$$y = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} + D \quad (1)$$

where A is the y -value of the upper asymptote; B is the curve slope at the inflection point; C is the analyte concentration giving 50% inhibition of the asymptotic maximum (IC_{50}); and D is the y -value of lower asymptote (Rodbard, 1974).

Cross-reactivities (%CR) were calculated as follows:

$$\%CR = \frac{\text{IC}_{50}(\text{thiabendazole})}{\text{IC}_{50}(\text{cross-reactant})} \times 100 \quad (2)$$

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA was performed according to the method of Abad et al. (2001), which was modified in following details. The anti-thiabendazole antibody was diluted in 0.1 M PBS, pH 7.4, containing 0.1% BSA; peroxidase-labelled anti-mouse immunoglobulins were from swine (SwAM-HRP); 96-well polystyrene microtitre plates Costar were from Corning Inc., USA (Cat. No. 9018); the used microplate washer was Columbus Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland); absorbance was measured with the microplate reader μQuant Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). Standards and samples were run in triplicate wells, and the mean absorbance values were processed. The data were mathematically fitted to a four-parameter logistic equation in the same way as in the strip test. Standard curve obtained was characterised by following parameters: the IC_{50} value of 0.4 ng mL^{-1} , the limit of detection (LOD) was 0.08 ng mL^{-1} , and the linear working range was from 0.2 to 9.7 ng mL^{-1} .

2.6. Juice samples

Fruit juices were commercial samples obtained from local supermarkets. For matrix effects and recovery studies, samples were used without any pretreatment. Juice samples containing thiabendazole (concentration range of 0.01–10,000 ng mL^{-1}) were prepared as follows: Thiabendazole-free samples were spiked with

a known amount of thiabendazole derived from stock solution. Juice samples were diluted with an appropriate assay buffer (0.1 M borate buffer, pH 8.8, or 0.1 M PBS, pH 7.4) before assaying in the strip test and ELISA, respectively. The pH value of diluted samples was checked and corrected if necessary.

3. Results and discussion

3.1. Principles of assay

An illustration of the immunostrip format is shown in Fig. 1. In designing the assay strip, the indirect competitive procedure was used. The secondary antibody was labelled with nanoparticles. Compared with the usual immunostrip technology based on the use of directly labelled primary antibody, this procedure has some advantages. It makes it possible to optimize a concentration of primary antibody in the assay more conveniently and minimize a consumption of this most expensive compound in the strip test.

Carbon particles were used as a label. Our preliminary results (Šmídová et al., 2009) indicated that these particles provided higher colour intensity on membrane, compared with colloidal gold particles. In the last years, the successful application of colloidal carbon in immunostrip construction has been described for analysis in medical, microbiological, and environmental area (Blažková et al., 2009; Koets et al., 2006; Lönnberg et al., 2008; Nauta et al., 2009; Rayev and Shmagel, 2008; Van Dam et al., 2004).

Performance of a strip-based assay relies on the migration of sample and an antibody-particle conjugate along a reagent-coated membrane strip where the corresponding affinity interactions take place. When mixed in a reaction mixture, the carbon-labelled secondary antibody binds the anti-thiabendazole antibody forming a detection complex. Dipping the strip into the reaction mixture causes the liquid moves upward by capillary action. If no thiabendazole is present in the sample, the detection complex binds to thiabendazole-OVA sprayed in the test line producing a black-colour line of maximal intensity. In contrast, if the sample contains thiabendazole, anti-thiabendazole antibodies in detection complex are neutralized proportionally to the concentration ratio of these two reagents. Consequently, the intensity of the black colour observed is reduced. Thus, the colour intensity of the test line inversely correlates with thiabendazole concentration in the sample. In the control line, a black colour appears independently on the presence of thiabendazole since the amount of the second antibody-carbon conjugate in assay is in excess. It is designed to monitor whether the antibody-carbon conjugate was passed over the test line and the result can be interpreted.

3.2. Optimization of immunostrip assay

The concentrations of immunoreagents and the type and composition of buffers were optimized to achieve a good sensitivity and reliability of the test. For this purpose, experiments similar to “checkerboard titration” were performed. The amount of anti-thiabendazole antibody and thiabendazole-OVA should be kept low enough to achieve good sensitivity, but must be sufficient to provide an acceptable signal. For further investigation of the assay the following value were chosen: concentration of anti-thiabendazole antibody in the reaction mixture was 30 ng mL^{-1} and amount of the thiabendazole-OVA conjugate dispensed per one strip was 25 ng. The complete specifications of optimized conditions for the assay are included in the procedure description presented in Sections 2.3 and 2.4. The type of nitrocellulose membrane was also selected to achieve a short time of the test without lowering sensitivity. The important criterion for membrane selection was also low level of their background colour intensity in assays of fruit juices. The most

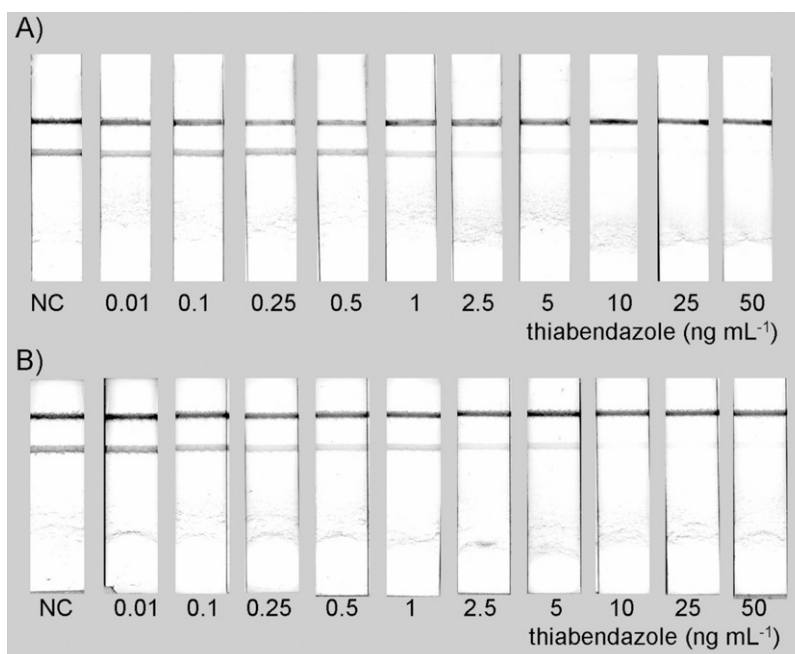


Fig. 2. Typical strip tests after assay procedure of standard solutions with different thiabendazole concentration. Thiabendazole standard solutions assayed were prepared in assay buffer (A); in assay buffer containing 1% orange juice (B). NC = negative control.

suitable membrane type for the thiabendazole test was found to be AE 98.

3.3. Visual assessment of assay sensitivity

Ten standard samples with thiabendazole concentrations in the range of 0.01–1000 ng mL⁻¹ and the negative control sample were assayed in triplicates by the optimized strip test (Fig. 2(A)). The black-colour intensity of the test line was interpreted visually by naked eyes. The visual limit of detection (LOD) of the assay was defined here as the minimum thiabendazole concentration forming the colour density of the test line significantly weaker than that in the assay of the negative control sample (it means the 100% agreement between result assessments of three repetitions of the same test by five observers). As shown in Fig. 2(A), the thiabendazole concentration of 0.25 ng mL⁻¹ caused a slight but visually distinguishable difference in the test line intensity compared to the negative control. Thus, 0.25 ng mL⁻¹ of thiabendazole was considered to be the visual LOD for the strip test. At concentrations of thiabendazole >10 ng mL⁻¹, the test line was invisible. It indicated this immunostrip allows to distinguish semi-quantitatively between three concentration intervals: <0.25 ng mL⁻¹; 0.25–10 ng mL⁻¹; and >10 ng mL⁻¹. The ability of the developed strip test to detect lower thiabendazole concentrations than the values of MRL for various kinds of fruits and vegetables, illustrated the potential of this technology for food analyses.

3.4. Standard curve

To obtain quantitative results and verify the visual LOD, colour intensities of the test lines from the assay of standard samples (Fig. 2(A)) were evaluated instrumentally by processing data of optical density from a scanner. The mean signal values were fitted to a sigmoid equation and displayed as the standard curve (Fig. 3). To express the assay sensitivity, the 50% inhibition (IC₅₀) value of 0.60 ± 0.08 ng mL⁻¹ was calculated and the linear working range of 0.11–4.13 ng mL⁻¹ was determined as the concentrations causing 20–80% inhibition of the maximal assay signal. The LOD calculated

using three times standard deviation of the mean blank signal was 0.08 ± 0.03 ng mL⁻¹. It can be summarized that sensitivity of the quantitative evaluation in the developed test is comparable with the ELISA used in this study.

3.5. Precision, specificity, and stability of the strip test

To evaluate the precision of the strip test, four standard samples with thiabendazole concentrations in the range of 0.1–3 ng mL⁻¹ were assayed. For the intra-day precision study, one run of analyses ($n = 6$) was performed with each sample in the same day. Similarly, one run of analyses ($n = 6$) was carried out with each sample daily in 5 consecutive days for the inter-day precision study. The intra- and inter-day relative standard deviations (R.S.D.) were calculated

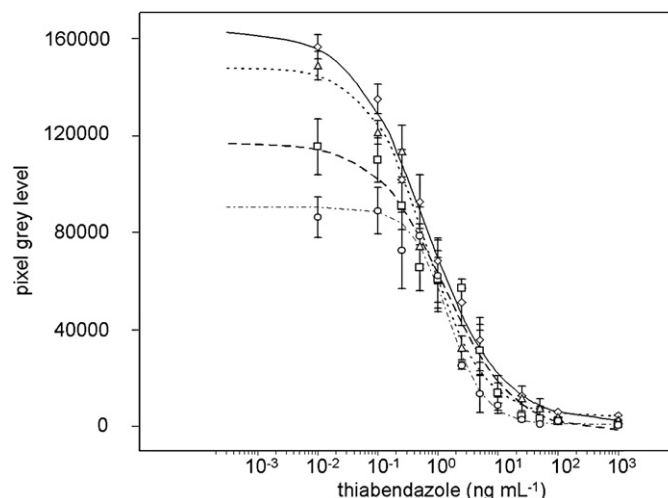


Fig. 3. Standard curves for thiabendazole in the optimized strip test. Standard curves obtained in assay buffer (◇), in orange juice 100-fold diluted (△), in orange juice 20-fold diluted (□), and in orange juice 10-fold diluted (○). The error bars correspond to the standard deviations of the data points ($n = 3$). The relative standard deviation of the blank sample signal was 4.2% in the curve measured in assay buffer.

Table 1

Intra- and inter-assay variations in the strip test.

Standard sample (ng mL ⁻¹)	Relative standard deviation (%)	
	Intra-day ^a	Inter-day ^b
0.1	10.7	15.4
0.25	8.0	10.3
1.0	8.4	9.1
3.0	9.8	14.0

^a The run of analyses ($n=6$) was performed with each sample in the same day.^b The run of analyses ($n=6$) was carried out daily in 5 consecutive days.

in the range of 8.0–10.7% and 9.1–15.4%, respectively (Table 1), indicating the acceptable variation.

To determine the selectivity of the developed strip test for thiabendazole, a study of cross-reactivity was carried out under the optimized conditions. Cross-reactants tested were 5-hydroxy-thiabendazole, benzimidazole and following pesticides: albendazole, fenbendazole, flubendazole, mebendazole, and oxiabendazole. Standard solution of each compound at concentration of 0.1 and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was applied into reactant mixture of the test procedure instead of thiabendazole, respectively. In all experiments with one of mentioned compounds, the intensity of black colour at the test line was nearly identical to that observed in the test with the negative control sample. It indicated that the presence of these pesticides in a test sample will not interfere with the detection of thiabendazole (cross-reactions were $<0.1\%$). Thus, the developed assay possesses of high specificity for thiabendazole.

The stability of the strip test was studied using the thiabendazole standard solution of 0.5 ng mL^{-1} and blank sample. Strip tests from the same batch, the running buffer, and immunoreactant solutions for reaction mixture were stored at 4 °C (strips under desiccated conditions). In the assay, the colour intensity of the test line retained its value after 60 days without a significant change. It demonstrated that the strip test was stable for at least 2 months.

The results of testing precision, stability, and specificity demonstrated that the developed strip assay provides a reliable performance comparable with other well-known immunoassays.

3.6. Evaluation of matrix effects

The possibility of analysing liquid samples or solid sample extracts without any clean-up is one of the most outstanding advantages of immunoassays over common used instrumental methods. However, immunochemical interactions are not completely free from interferences caused by unidentified compounds of the food matrices. Moreover, fruit juice matrix can be the cause of an intensive background colour generated on membrane during a strip test procedure. Consequently, it could interfere in results interpretation. Therefore, the influence of the selected juices on proposed assay should be determined prior to the application of the method to samples spiked with thiabendazole.

Accordingly, the influence of the juices of interest on the strip test performance was tested by comparing standard curves cre-

ated with thiabendazole in assay buffer and in juices diluted in assay buffer, respectively. Juices from oranges, apples, bananas, and pears were chosen as test samples. In experiments, the matrix of orange juice was shown as the most problematic. As demonstrated in Fig. 3, the maximum colour intensity of the test line was strongly reduced by orange juice diluted 10-fold or 20-fold. On the other side, 100-fold dilution provided a closely similar standard curve as measured in assay buffer, and assay strips are without intensive background colouring (Fig. 2(B)). Furthermore, analytical parameters were calculated for the standard curves measured in assay buffer and in individual juices after their 100-fold dilution, respectively. The data collected in Table 2 illustrated the fact the obtained curves are nearly identical. These results suggested that thiabendazole could be analyzed in 100-fold diluted juices directly without a need of clean-up.

3.7. Analysis of spiked samples

The recovery study of spiked juice samples was performed, to analyse the strip test accuracy and reproducibility and to compare results of the developed assay with ELISA (Table 3). Thiabendazole-free samples of the 100% fruit juices were spiked with thiabendazole at concentration range of 10–5000 ng mL^{-1} , and assayed by the strip test and ELISA after being 100-fold diluted in assay buffer. The highest spiking level represented the MRLs for thiabendazole in crops of interest. As the 100-fold dilution of juice samples reduced enough the matrix interferences (Table 2), a quantitative evaluations were performed using standard curve constructed in assay buffer.

In the visually assessed strip test, negative results (–) were obtained for non-spiked samples and for all juices spiked at level of 10 ng mL^{-1} . Weakly positive results ($\pm$) were obtained for samples spiked at concentrations of 50 and 500 ng mL^{-1} , while samples spiked at levels of 5000 ng mL^{-1} were evaluated as positive (+). All ELISA results were very close to the spiked levels. These experiments demonstrated the high correlation between visually assessed immunostrips and ELISA. Nevertheless, it is clear that some thiabendazole levels below MRL (between 1000 and 5000 ng mL^{-1}) might also be recognized as presumptively positive (+), in the first analysis of unknown sample by the visual evaluation. Then, the further testing of additionally diluted sample should provide the accurate assessment.

In the first quantitative analysis, samples with a high spiked concentration were recognized as requiring an additional dilution for repeated analysis (to fall in the linear working range of the standard curves in the strip assay or ELISA). In strip assays, the recovery of the spiked concentrations was satisfactory with all juice samples, as all data fell into the range of 81.9–123.6%. Method reproducibility was also acceptable, as relative standard deviation (R.S.D.) ranged from 9.9 to 19.3%, with exception of the lowest spiked level of 10 ng mL^{-1} (in orange and apple juices the response of this concentration was measured as $<\text{LOD}$). The comparison of experimental data from the quantitatively evaluated immunostrip and from the ELISA indi-

Table 2Parameters of thiabendazole standard curves created in different matrixes ($n=3$).

Type of matrix	IC ₅₀ $\pm$ S.D. ^{a,b} (ng mL ⁻¹)	Linear working range ^c (ng mL ⁻¹)	Limit of detection ^d $\pm$ S.D. ^b (ng mL ⁻¹)
Assay buffer	0.60 $\pm$ 0.08	0.11–4.13	0.08 $\pm$ 0.03
1% orange juice	0.61 $\pm$ 0.14	0.13–3.42	0.10 $\pm$ 0.05
1% apple juice	0.56 $\pm$ 0.15	0.12–3.59	0.09 $\pm$ 0.04
1% banana juice	0.42 $\pm$ 0.15	0.06–3.88	0.07 $\pm$ 0.04
1% pears juice	0.53 $\pm$ 0.12	0.10–3.70	0.07 $\pm$ 0.03

^a IC₅₀, the 50% intercept value of sigmoid curve.^b S.D., standard deviation.^c Expressed as the concentration range causing 20–80% inhibition of the asymptotic maximum.^d The analyte concentration corresponding to the mean value of blank signal reduced by 3 S.D.

Table 3Comparison of the immunostrip assay and ELISA in analysis of juice samples spiked by thiabendazole ($n = 5$).^a.

Juice samples	Spiked concentration (ng mL ⁻¹)	Immunostrip results							ELISA results ^b			
		Visual detection ^c					Mean ^{d,b} (ng mL ⁻¹)	Recovery ^d (%)	R.S.D. ^{d,e} (%)	Mean (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)	R.S.D. ^e (%)
Orange	0	—	—	—	—	—	<LOD ^f	—	—	<LOD ^f	—	—
	10	—	—	—	—	—	<LOD ^f	—	—	17	171.4	22.1
	50	±	±	±	±	±	56	112.9	19.2	47	94.2	18.3
	500	±	±	±	±	±	615	123.6	18.0	426	85.2	17.0
	5000	+	+	+	+	+	5450	109.1	14.4	4380	87.5	10.4
Apple	0	—	—	—	—	—	<LOD ^f	—	—	<LOD ^f	—	—
	10	—	—	—	—	—	<LOD ^f	—	—	13	130.4	16.4
	50	±	±	±	±	±	44	88.2	19.3	53	106.7	19.7
	500	±	±	±	±	±	498	99.5	10.4	464	92.8	14.1
	5000	+	+	+	+	+	4570	91.3	14.1	5590	111.8	14.8
Banana	0	—	—	—	—	—	<LOD ^f	—	—	<LOD ^f	—	—
	10	—	—	—	—	—	8.2	81.9	26.9	11	112.1	9.1
	50	±	±	±	±	±	61	121.0	10.6	55	110.2	7.1
	500	±	±	±	±	±	470	94.4	15.9	408	81.5	11.2
	5000	+	+	+	+	+	5640	112.7	18.3	4750	95.1	7.6
Pear	0	—	—	—	—	—	<LOD ^f	—	—	<LOD ^f	—	—
	10	—	—	—	—	—	11	111.4	25.7	9.7	97.0	16.9
	50	±	±	±	±	±	55	110.6	9.9	50	99.9	5.8
	500	±	±	±	±	±	590	118.1	9.9	529	105.8	9.8
	5000	+	+	+	+	+	5360	107.2	16.7	5560	111.1	8.3

^a Before an assay, all spiked samples were diluted 100-fold with assay buffer.^b In the first quantitative analysis, samples with a high spiked concentration were recognized as requiring an additional dilution for repeated analysis (to fall in the linear working range of the standard curves in the strip assay or ELISA).^c Visual assessment of the test line. The concentration intervals of semi-quantitative recognition are the 100-fold of the levels described in Section 3.3: (–) negative result (concentration <25 ng mL⁻¹); (+) positive result (concentration >1000 ng mL⁻¹); (±) weakly positive result (concentration in the range of 25–1000 ng mL⁻¹).^d Quantitative assessment of strip assay using scanning densitometry.^e R.S.D., relative standard deviation.^f LOD, limit of detection.

cated that good agreement was achieved between results of both methods.

The possibility of determining 50 ng mL⁻¹ of thiabendazole with acceptable accuracy and reproducibility in all juices tested demonstrated a good potential of the strip test for routine analysis.

4. Conclusions

This study successfully demonstrated the potential of using the colloidal carbon-based strip assay for the detection of thiabendazole in food analysis. Semi-quantitative visual evaluation of the developed immunostrip provided the detection limit of 0.25 ng mL⁻¹ in analysis of standard sample. The linear working range of standard curve for quantitative evaluation based on scanning densitometry was 0.11–4.13 ng mL⁻¹. When applied to the analysis of spiked fruit juices by the direct dilution method, without sample extraction or clean-up, the developed strip assay is able to determine thiabendazole concentration of 50 ng mL⁻¹ with acceptable accuracy and reproducibility. This concentration is far below the MRLs for thiabendazole in fruits of interest (5 mg kg⁻¹). The results of the strip performance investigation indicated that the method has advantages of high simplicity and speed of performance, as well as good sensitivity, selectivity and acceptable reliability. These characteristics make it a potentially useful tool for screening of thiabendazole in fruit juices rapidly by semi-quantitative or quantitative assay. Additional investigations would be needed to thoroughly evaluate this assay as fit-for-purpose. One such aspect is validation of the test using HPLC.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Grant Agency (project no. 525/07/0618), and by Ministry of Education of Czech Republic (project no. MSMT 6046137305).

Authors are thankful to Dr. Aart Van Amerongen from Wageningen University and Research Centre for providing carbon particles and to Bc. Pavla Pláčková for technical assistance in laboratory.

References

- Abad, A., Manclús, J.J., Moreno, M.J., Montoya, A., 2001. J. AOAC Int. 84, 156–161.
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Tadeo, J.L., 2004. J. AOAC Int. 87, 664–670.
- Anonymous, 2008. Commission Regulation (EC) No. 149/2008. Offic. J. Eur. Union L58, 1–398.
- Blažková, M., Mičková-Holubová, B., Rauch, P., Fukal, L., 2009. Biosens. Bioelectron. 25, 753–758.
- Bushway, R.J., 1996. J. Chromatogr. A 754, 431–435.
- Chen, Y., Wang, Z., Wang, Z., Tang, S., Zhu, Y., Xiao, X., 2008. J. Agric. Food Chem. 56, 2944–2952.
- García-Reyes, J.F., Llorent-Martínez, E.J., Ortega-Barrales, P., Molina-Díaz, A., 2006. Anal. Chim. Acta 557, 95–100.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Mezcua, M., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., 2007. J. Agric. Food Chem. 55, 10548–10556.
- Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takahashi, N., Nakazawa, H., 2003. J. Agric. Food Chem. 51, 861–866.
- Koets, M., Sander, I., Bogdanovic, J., Doekes, G., Van Amerongen, A., 2006. J. Environ. Monit. 8, 942–946.
- Kolosova, A.Y., Sibanda, L., Dumoulin, F., Lewis, J., Duveiller, E., Van Peteghem, C., De Saeger, S., 2008. Anal. Chim. Acta 616, 235–244.
- Li, D., Wei, S., Yang, H., Li, Y., Deng, A., 2009. Biosens. Bioelectron. 24, 2277–2280.
- Lisa, M., Chouhan, R.S., Vinayaka, A.C., Manonmani, H.K., Thakur, M.S., 2009. Biosens. Bioelectron. 25, 224–227.
- Lönnerberg, M., Drevin, M., Carlsson, J., 2008. J. Immunol. Methods 339, 236–244.
- Nauta, M.J., Van der Wal, F.J., Puterbaugh, F.F., Post, J., Van de Kastelee, J., Bolder, N.M., 2009. Int. J. Food Microbiol. 134, 216–222.
- Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., Van Amerongen, A., 2009. Anal. Bioanal. Chem. 393, 569–582.
- Rayev, M., Shmagel, K., 2008. J. Immunol. Methods 336, 9–15.
- Rodbard, D., 1974. Clin. Chem. 20, 1255–1270.
- Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., 2008. Talanta 76, 211–225.
- Shi, C., Zhao, S., Zhang, K., Hong, G., Zhu, Z., 2008. J. Environ. Sci. 20, 1392–1397.
- Šmídová, Z., Blažková, M., Rauch, P., Fukal, L., 2009. 34th Congress of the Federation of European Biochemical Societies, Prague, July 04–09; poster presentation.

- Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Gonzáles, L., 2004. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34, 165–175.
- Tang, D., Saucedo, J.C., Lin, Z., Ott, S., Basova, E., Goryacheva, I., Biselli, S., Lin, J., Niessner, R., Knopp, D., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 25, 514–518.
- Van Dam, G.J., Wichers, J.H., Falcao Ferreira, T.M., Ghati, D., Van Amerongen, A., Deelder, A.M., 2004. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5458–5461.
- Veneziano, A., Vacca, G., Arana, S., De Simone, F., Rastrelli, L., 2004. *Food Chem.* 87, 383–386.
- Wang, X., Li, K., Shi, D., Jin, X., Xiong, N., Peng, F., Peng, D., Bi, D., 2007. *J. Chromatogr. B* 847, 289–295.
- Wu, Q., Li, Y., Wang, C., Liu, Z., Zang, X., Zhou, X., Wang, Z., 2009. *Anal. Chim. Acta* 638, 139–145.
- Young, M.S., Phillips, D.J., Iraneta, P.C., Krol, J., 2001a. *J. AOAC Int.* 84, 556–561.
- Young, M.S., Early, M.F., Mallet, C.R., Krol, J., 2001b. *J. AOAC Int.* 84, 1608–1613.
- Zamora, T., Pozo, O.J., López, F.J., Hernández, F., 2004. *J. Chromatogr. A* 1045, 137–143.
- Zhou, Y., Pan, F.G., Li, Y.S., Zhang, Y.Y., Zhang, J.H., Lu, S.Y., Ren, H.L., Liu, Z.S., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2744–2747.



Immunochromatographic colloidal carbon-based assay for detection of methiocarb in surface water

Martina Blažková, Barbora Mičková-Holubová, Pavel Rauch, Ladislav Fukal*

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2009

Received in revised form 13 August 2009

Accepted 15 August 2009

Available online 22 August 2009

Keywords:

Immunochromatographic assay

Carbon particle

Methiocarb

Surface water

Environmental analysis

ABSTRACT

A simple and rapid immunochromatographic assay for a sensitive and inexpensive monitoring of methiocarb in surface water was developed using a binding inhibition format on a membrane strip. In the assay, detection reagent consisted of anti-methiocarb antibody and colloidal carbon-labelled secondary antibody. Methiocarb-ovalbumin conjugate was immobilized in a test line of the strip as a capture reagent. Colour intensity of the test line in methiocarb-positive assay was visually distinguishable from that of negative sample within 10 min. The optimized semi-quantitative method provided a visual detection limit of 0.5 ng mL^{-1} . Cross-reactions with other carbamate pesticides were not found ($<1\%$). Only a negligible matrix effect of surface water was recognized. In parallel analyses of spiked water samples, the assay results were in a good agreement with those of ELISA. The stability test indicated the strips could be used at least 2 months without change in performance. All characteristics of the visually evaluated assay mentioned above were verified by instrumental quantification of colour intensity in test lines. The developed immunochromatographic assay offers potential as a useful on-site screening tool for environmental analysis.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Although the use of pesticides has had a range of benefits, these compounds also can cause adverse environmental effects, including degradation of water quality. Monitoring the concentration of pesticides in surface water is important for maintaining aquatic health and eventually ensuring safe drinking water supplies.

Methiocarb [3,5-dimethyl-4-(methylthio) phenyl methylcarbamate] belongs to chemical class of N-methylcarbamate pesticides. As a broad-spectrum insecticide, molluscicide, acaricide, and bird repellent, it is commonly used in agriculture and household practice throughout the world. Therefore, contamination of water and agricultural products becomes imminent, and consequently, adverse health effects are possible in humans and animals. Due to its action as a potent acetylcholinesterase inhibitor and other toxic activity, methiocarb is considered to be highly hazardous according to WHO classification. Nevertheless, a more pressing concern is the toxicity to aquatic organisms. For some kinds of aquatic invertebrates, commonly used as bioindicators of water contamination in environment, values of LC_{50} or EC_{50} (acute) were found extremely low, in the range of $1.6\text{--}19 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Munn et al., 2006; Péry et al., 2004). U.S. Environmental Protection Agency declared

that the methiocarb value of an acute aquatic life benchmark for invertebrates is $3.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Anonymous, 2007).

The use of methiocarb, as well as all pesticides, has been regulated for a long time in many countries. However, unwanted amounts of certain pesticides still are found in environmental media and residues exceeding regulatory limits still sometimes occur in agricultural produce. Until now, European Union legislation has established maximum residue levels for food (Commission Regulations (EC) No. 149/2008) and drinking water (Council Directive 98/83/EC) but not for surface water. However, the European Commission introduced the Water Framework Directive (2000/60/EC) as an instrument to sustain and improve quality of environmental waters. The directive aims to achieve good chemical and ecological status for all waters by 2015. The backbone of the directive implementation is monitoring of chemical substances and values of LC_{50} or the acute life benchmark for aquatic invertebrates are important reference concentrations for assessing good ecological status of surface water. Although the total volume of methiocarb used is low relative to some other pesticides, it could have major impacts in localized areas if there is concentrated outdoor use. Then, pesticide concentration in runoff may approach or exceed LC_{50} value for aquatic organisms (Primus et al., 2001; Schäfer et al., 2007; Vecchia et al., 2008; Wilson et al., 2005). Despite recommendations for pesticide application in good agriculture practices, contamination of fruit food (Blasco et al., 2005; Schulze et al., 2002) and surface water with methiocarb has been reported in the last years (Anonymous, 2005; Borkovcova et al., 2004; Fytianos et al.,

* Corresponding author. Tel.: +420 220445137; fax: +420 220445167.
E-mail address: fukal@vscht.cz (L. Fukal).

2006; García de Llasera and Bernal-Gonzales, 2001; Primus et al., 2001). Therefore, developments of analytical methods that are fast, inexpensive and may be used on-site are needed.

Current methods applied to analyze pesticides in water samples are mainly based on high-performance liquid chromatography or gas chromatography coupled to various selective detectors. Such procedures are also described for methiocarb (Huertas-Pérez and García-Campaña, 2008; Rodrigues et al., 2007; Saraji and Esteki, 2008). Although highly sensitive and reliable, they are time-consuming, involve multiple steps in sample preparation and analysis, and require expensive equipment and skilled analysts.

Nowadays, with increasing development of immunoassays, these methods have been shown to be useful alternative for analysis of pesticides in environmental samples (Anand et al., 2007; Jiang et al., 2008; Krämer et al., 2007; Mauriz et al., 2007). Currently, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) carried out in a microtitre plate is the most common technique used for immunoassays. This technique has been successfully applied for the analysis of methiocarb (Abad et al., 1999; Mickova et al., 2003, 2005). However, for non-specialized laboratories and for field-use, it can be difficult to perform labour intensive operations including repeated incubation and washing, and enzyme reaction for final signal generation in ELISA. Immunosensors have also become increasingly practical tools in environmental monitoring (Marchesini et al., 2007). With the aim of real-time output, various kinds of immunosensors have been developed for pesticide analysis (Kim et al., 2007; Long et al., 2008; Zacco et al., 2007). In terms of field-use, these methods are often considered to be requiring expensive equipment and specialized personnel. With the demand for overall speed and simplicity, a lateral-flow immunochromatographic assay (ICA) could be a more suitable alternative (Posthuma-Trumpie et al., 2009). It combines several benefits including a user-friendly format, short assay time, and cost-effectiveness. These characteristics make it well suited for on-site screening. In the last years, several research groups have performed an ICA for some of pesticides (Gui et al., 2008; Kaur et al., 2007; Shi et al., 2008; Shim et al., 2006; Wang et al., 2005; Zhou et al., 2004; Zhu et al., 2008) and other environmental contaminants (Li et al., 2009; Zhou et al., 2009). In these works, the detection reagent was typically colloidal gold-labelled antibody. To our best knowledge, any use of ICA principles for methiocarb detection has not been published up to now.

In our previous studies, we described validation of the ELISA for control of methiocarb residues in some food samples (Mickova et al., 2003, 2005). Here we reported a development of ICA test for this pesticide using colloidal carbon nanoparticles as a label. The optimized test has been compared with ELISA results in analysis of spiked surface water samples.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

Standards of methiocarb (98.5%, HPLC/DAD), carbaryl (99%, HPLC/DAD), carbofuran (99.5%, HPLC/DAD), were from Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany. Aldicarb (99.9%, HPLC, Fluka), bendiocarb (99.5%, HPLC, Riedel-de Haën), ethiofencarb (99.0%, HPLC, Riedel-de Haën), fenoxycarb (99.6%, HPLC, Fluka), and methomyl (99.9%, HPLC, Fluka) were supplied by Sigma–Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Individual stock standard solutions containing 10 mg mL⁻¹ of each compound were prepared by dissolving accurately weighted amounts in ethanol and stored in darkness at 4 °C. Working standard solutions were freshly prepared by serial dilution in deionised water.

The mouse anti-methiocarb monoclonal antibody as well as the methiocarb hapten-ovalbumin conjugate (methiocarb-OVA) was purchased from Centro de Apoyo a la Innovación, la Inves-

tigación y la Transferencia de Tecnología (CTT), Universidad Politécnica de Valencia, Spain. Producer indicated these immunoreagents as LIB-MXNB31 and OVA-DPNH, respectively (Abad et al., 1998). Rabbit anti-swine antibody (RASw) as well as the swine anti-mouse antibody (SwAM) was obtained from Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands (product codes RASw/IgG(H+L)/7S and SwAM/IgG(H+L)/7S). Both antibodies were supplied as purified IgG fraction of polyclonal antiserum.

Carbon nanoparticles (Spezial Schwartz 4, Degussa AG, Germany) were kindly provided from Agrotechnology & Food Sciences Group (Wageningen University and Research Centre, The Netherlands) as a dry powder (particles of amorphous shape with average size of 120 nm). Bovine serum albumin (BSA), Tween 20, polyethylene glycol (PEG, MW 3350) and *o*-phenylenediamine (OPD) were purchased from Sigma–Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-labelled swine anti-mouse IgG (SwAM, HRP/SwIgG = 1.81, concentration 8.9 mg mL⁻¹) was obtained from Seva Pharma, Czech Republic.

Other common chemicals were of the highest purity available and purchased from Sigma–Aldrich. Deionised water for standards and buffer solutions was prepared on apparatus RO-TFM-5SV (Fresh Water Systems, Inc., Greenville, USA).

Whatman GmbH (Dassel, Germany) supplied various types of nitrocellulose membranes (PRIMA 80, PRIMA 125, AE 98 FAST, AE 98, AE 99, AE 100, FT 020, FT 060, Protran BA 79, Protran BA 83, and Protran BA 85) tested in strip assay. Vinyl backing ARcare® 7823 was from Adhesives Research Inc. (USA), and the absorbent pad CFSP from Millipore Corp. (USA). Ninety-six-well ELISA polystyrene microtitre plates Costar (catalogue no. 9018) were obtained from Corning Inc. (USA).

2.2. Water samples

Samples of surface water were collected from streams in low-land agricultural area of central part of Czech Republic. Freshly collected samples were filtered through nylon filter to remove suspended particulate matter and then stored in darkness at 4 °C until analysis.

Water samples containing methiocarb (concentration range of 0.01–1000 ng mL⁻¹) were prepared as follows: methiocarb-free samples, as verified by LC/MS analysis, were spiked with a known amount of methiocarb derived from stock solution and used immediately for analysis.

2.3. Labelling of swine anti-mouse antibody with carbon nanoparticles

Carbon nanoparticles bind proteins non-covalently without changing their bioactivity (Van Amerongen et al., 1993). The swine anti-mouse antibody was labelled with colloidal carbon nanoparticles according to the O'Keeffe et al. (2003) with gentle modification. A colloidal carbon suspension (carbon nanoparticles 2 mg mL⁻¹ of 5 mM borate buffer, pH 8.8) was sonicated for 10 min on ice using a Sonic 1 (Polsonic, Poland). Subsequently, with a simultaneous gentle stirring the SwAM was added to give a final protein concentration of 350 µg mL⁻¹. Then, this mixture was stirred gently at 4 °C overnight. In the end, the suspension was washed three times in a 5 mM borate buffer, pH 8.8 (containing 1% BSA and 0.02% NaN₃) using centrifugation (10 000 g, 15 min, 10 °C). Final sediment was resuspended to the initial volume. Prepared stock suspension of the SwAM-carbon conjugate was stored at 4 °C in the dark.

2.4. Preparation of immunochromatographic test strips

Each strip contained methiocarb-ovalbumin conjugate (methiocarb-OVA) and a rabbit anti-swine antibody immobi-

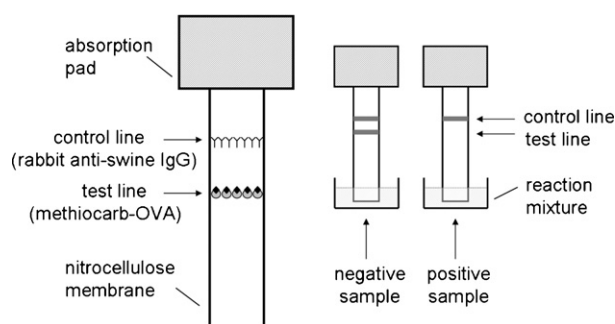


Fig. 1. Schematic diagram of the immunochromatographic strip test. Details are described in the text.

lized in a narrow lower zone and upper zone, respectively. A schematic representation is shown in Fig. 1. The strips were prepared as follows: firstly, nitrocellulose membrane sheet was cut to the desired size (20 cm $\times$ 2.5 cm) and pasted to a vinyl backing. Using the Linomat V (Camag AG, Switzerland) methiocarb-OVA and RASw solutions (5 mM borate buffer, pH 8.8) were separately dispensed (1 μ L per 5 mm) as the test and control lines (20 cm long) on this plastic-backed membrane. Subsequently, the membrane sheet was dried at 37 °C for 2 h and cut into test strips (25 mm $\times$ 5 mm) using a programmable strip cutter (Economic Cutter ZQ2000, Shanghai Kinbio Tech Co., Ltd., Shanghai, China). An absorbent pad was cut in sections of 10 mm $\times$ 20 mm and pasted to the far end of the strip (Fig. 1). Strips prepared in such way were stored in sealed bags under dry conditions at laboratory temperature until used.

2.5. Procedure of immunochromatographic assay (ICA)

In a well of an ELISA microplate, 50 μ L of methiocarb standard solution in deionised water (or water sample) was mixed with 30 μ L of the running buffer, 10 μ L of SwAM-carbon conjugate (stock suspension diluted with the running buffer), and 10 μ L of anti-methiocarb antibody (diluted in the running buffer). Subsequently, the membrane strip was dipped into this reactant mixture vertically (Fig. 1). After 10 min, test results were observed.

2.6. Detection and quantification using ICA

The colour intensity of test line could be assessed visually by naked eyes. Samples producing the test line appearance of the same intensity as a negative control were considered to be negative (–). If the colour intensity of the test line was weaker than that of the negative control, the result was evaluated as weakly positive ($\pm$). When there was no band at the test line, the sample was positive (+). For quantification of the colour intensity, greyscale densitometry was used after the strip was fully air-dried. Greyscale digital scanned images of the strips were recorded using the Epson Perfection V700 Photo Scanner (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan), and the intensity of the test lines quantified using the TotalLab TL100 software (Nonlinear USA Inc., NC, USA). Average values were calculated from quadruplicate runs for each methiocarb concentration using three measurements for each strip. Standard curves were obtained by plotting the mean intensity value against the logarithm of methiocarb concentration. Experimental points were fitted to a four-parameter logistic equation using the Microsoft Excel software (Microsoft Corp., USA).

2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA was performed as we described previously (Mickova et al., 2003). Briefly, the methiocarb-OVA conjugate solution in 0.05 M carbonate-hydrogen carbonate buffer, pH 9.6 (0.5 μ g mL^{–1},

100 μ L per well) was pipetted into wells of polystyrene microplate and left to incubate overnight at 4 °C. Then microplates were washed four times with 0.01 M PBS (phosphate-buffered saline), pH 7.4, and containing 0.05% Tween 20, by the use of a microplate washer (Columbus Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The aliquots (50 μ L per well) of methiocarb standard in deionised water or samples, and the anti-methiocarb antibody (0.06 μ g mL^{–1}), diluted in 0.02 M PBS, pH 7.4, containing 0.1% BSA (50 μ L per well) were pipetted to the microplate wells coated with the conjugate. Microplates were incubated for 2 h at laboratory temperature and then washed as described above. The second antibody conjugated with peroxidase (SwAM-HRP), diluted 1:2000 in 0.01 M PBS containing 0.05% Tween 20, was added, left to incubate for 1 h at laboratory temperature, and washed as described above. Then, the peroxidase substrate in reaction buffer (4.6 mM OPD in 0.1 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0, containing 0.1% of 30% H₂O₂) was added to each well (100 μ L per well). The enzyme reaction was stopped after 10 min by adding 2.5 M sulphuric acid (50 μ L per well), and the absorbance was measured with a microplate reader (μ Quant Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). Data from ELISA were processed using the Microsoft Excel software (Microsoft Corp., USA). Absorbance values from standards were mathematically fitted to a four-parameter logistic equation. Parameters of standard curve were the same as we described previously (Mickova et al., 2005): limit of detection (LOD) was 0.016 ng mL^{–1}, the working range of immunoassay was from 0.02 to 0.56 ng mL^{–1}, and the IC₅₀ value was 0.08 ng mL^{–1}.

3. Results and discussion

3.1. Development of ICA

A schematic description of the strip format is illustrated in Fig. 1. The assay was based on two coexistent phenomena: (1) capillary migration of reactants through a nitrocellulose strip followed by affinity capturing; (2) inhibition of immunochemical interaction between methiocarb immobilized in a test line and specific antibody, which was a part of a moving detection complex, by free methiocarb in a sample.

In designing the assay strip, three types of antibody (Ab) which differed in their specificity were used: primary Ab, the mouse anti-methiocarb antibody; secondary Ab, the swine anti-mouse antibody, which was labelled with colloidal carbon nanoparticles (SwAM-carbon conjugate); and tertiary Ab, the rabbit anti-swine Ab, which was immobilized in the control line of the strip. In arrangement of ICA, an unusual procedure was applied, which consisted in the indirect labelling of primary Ab with the aid of the labelled secondary Ab, instead of the use of directly labelled primary Ab. It made it possible to optimize a concentration of primary Ab more conveniently and minimize a consumption of primary Ab in the assay.

When mixed in a reaction mixture, the carbon-labelled secondary Ab bound the primary Ab forming the detection complex. In the assay, the reaction mixture migrated from the well through the strip into the absorbent pad. In the absence of methiocarb in the sample, the solution of the detection complex and the excess of labelled Ab moved upward across the strip. In the test line, detection complex was captured by immobilized methiocarb-OVA conjugate to form a visible black-colour line. However, in the presence of methiocarb in the sample, free methiocarb molecules bound to primary Ab, thereby inhibiting the interaction of the detection complex with the immobilized methiocarb. Thus, the colour intensity of the test line inversely correlated with methiocarb concentration in the sample.

The control line acted as a positive control to assure that the labelled secondary Ab migrated throughout the system. In the control zone, it was captured by immobilized tertiary Ab to form the visible control line. If intensive colour was not present in the line, the assay was considered as invalid.

3.2. Preliminary optimization of immunoreagent concentrations

Most of components necessary for the immunostrip construction as well as the experimental conditions have a key influence on both the performance and final sensitivity.

Firstly, in this experimental study the concentrations of reagents were preliminary optimized to satisfy the following assay criteria: good sensitivity, minimum immunoreagent consumption, and appearance of the test line with good colour intensity and sharpness (for negative sample).

Therefore, checkerboard titration experiments were carried out. Several amounts of methiocarb-OVA conjugate immobilized on the membrane (10–500 ng per strip) against different amounts of primary Ab (1–100 ng per strip) were investigated in assays of standard solutions containing methiocarb at concentrations of 0, 1.0, 10, and 100 ng mL⁻¹. The same experiments were performed for different concentrations of carbon-labelled secondary Ab.

Preliminary optimized concentrations of reagents were finally specified after the following optimization of other assay conditions.

3.3. Optimization of assay conditions

Subsequently, some other factors affecting strip test performance were also evaluated: the type of membrane, the type of running buffer, and the incubation time of reactant mixture before the strip is dipped inside.

Firstly, we tested eleven various types of nitrocellulose membrane. The type of membrane influenced flow time and sharpness of detection lines. Faster-flowing membranes reached endpoint more quickly but required higher reagent concentrations and provided lower sensitivity. Secondly, the composition of the running buffer markedly influenced flow rate, line intensity, and test sensitivity. Phosphate buffer and borate buffer of various pH values and ion concentrations were tested. Moreover, additives such as BSA (0.1–5%), gelatine (0.1–1%), polyethylene glycol (0.01–2%), sucrose (0.5–5%), and their combinations, with and without surfactant Tween 20 (0.01–0.5%) were tested to further improve the test performance. These factors affected mainly the character of reactant flow, level of background colour, sharpness, and intensity of the test line. Thirdly, various intervals of incubation time (0, 5, and 30 min) of methiocarb analyte with primary Ab and labelled secondary Ab were tested. Using methiocarb concentrations in standard samples of 0, 2, and 10 ng mL⁻¹, the test line intensities were not significantly influenced by incubation time.

Optimized conditions for ICA test were chosen by visual evaluation of strips as a compromise among a good colour perception of lines, good test sensitivity, minimum immunoreagent consumption and rapid test performance. They are collected in Table 1.

3.4. Sensitivity of ICA

The sensitivity of the ICA strip was determined by testing the methiocarb standard samples in the concentration range from zero to 1000 ng mL⁻¹ (Fig. 2). The visual limit of detection of the assay was defined here as the minimum methiocarb concentration producing the colour density of the test line significantly weaker than that at zero concentration (it means absolute agreement between result assessments of six observers for five repetitions of the same test). As shown in Fig. 2, the methiocarb concentration of 0.5 ng mL⁻¹ caused a slight but visually distinguishable differ-

Table 1

Optimized parameters of immunochromatographic assay.

Parameter	Chosen as optimal
Type of nitrocellulose membrane	AE 98 (Whatman) ^a
Amount of methiocarb-OVA conjugate per strip	100 ng
Amount of primary antibody in assay	6.25 ng
Dilution of stock suspension of SwAM-carbon conjugate prior addition into assay	10-times
Composition of running buffer	0.2 M borate buffer, pH 8.8 (containing 2% BSA, 0.1% Tween 20, 1% polyethylene glycol, and 0.02% NaN ₃)
Incubation time of reaction mixture	0 min

^a Pore-size 5 µm, capillary rise in water 160–210 s per 4 cm.

ence in the test line intensity compared to the negative control. Thus, 0.5 ng mL⁻¹ of methiocarb was considered to be the visual detection limit for the ICA test. At concentrations of methiocarb >5 ng mL⁻¹, the test line was invisible.

The ability of the developed ICA strip to detect lower methiocarb concentrations than the value of an acute aquatic life benchmark for invertebrates illustrated the potential of this technology for environmental analyses. The value of visual LOD observed in our work is comparable with several published ICA tests for other low-molecular-weight contaminants, which used a colloidal gold label (Kaur et al., 2007; Shi et al., 2008; Shim et al., 2006). Furthermore, the developed ICA test is 5–100 times more sensitive than those described for pesticide detection by many other authors (Gui et al., 2008; Wang et al., 2005; Weetall and Rogers, 2002; Zhou et al., 2004; Zhu et al., 2008). However, Li et al. (2009) presented the LOD value of ICA with gold label for indomethacin detection in water as low as 0.1 ng mL⁻¹.

Finally, to obtain qualitative results and verify the visual LOD, colour intensities of the test lines were evaluated using scanning densitometry. The mean signal values were fitted to a sigmoid equation and displayed as the standard curve (Fig. 3). To express the assay sensitivity, the LOD of 0.14 ± 0.03 ng mL⁻¹ was estimated as the analyte concentration providing a 10% decrease of the blank signal. Subsequently, the linear working range of 0.31–3.38 ng mL⁻¹ was determined as the concentrations causing 20–80% inhibition of the maximal assay signal, and the 50% inhibition (IC₅₀) value of 1.01 ± 0.13 ng mL⁻¹ related to the midpoint of the curve was calculated.

3.5. Specificity of ICA

To determine the selectivity of the developed ICA test for methiocarb, a study of cross-reactivity was carried out under the

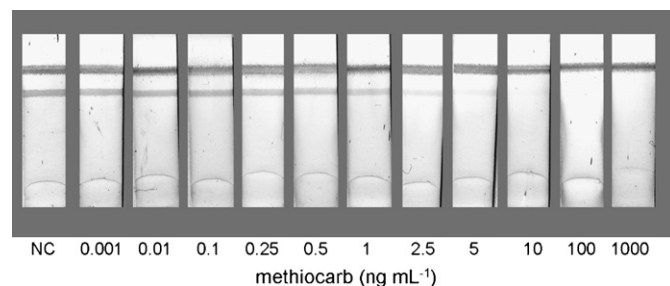
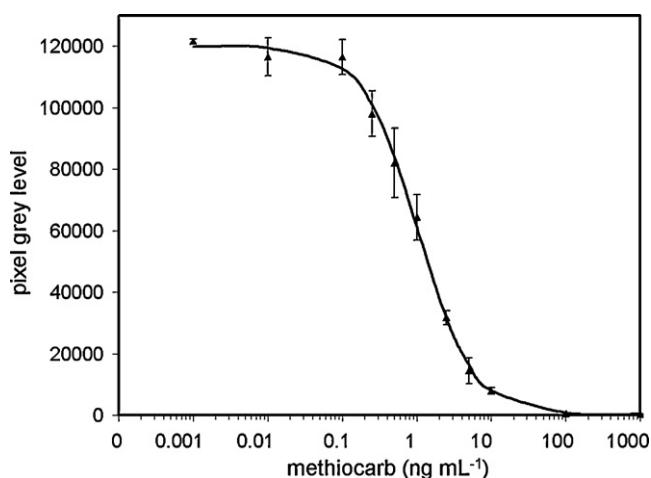


Fig. 2. Concentration range of methiocarb standard assayed by the immunochromatographic strip tests. NC, negative control. Compared to the negative control the concentration of 0.5 ng mL⁻¹ caused a considerable weak test line still visually distinguishable.

Table 2Characteristics of methiocarb standard curves for immunochromatographic assay in different water matrixes^a.

Water matrix	Linear working range ^b (ng mL ⁻¹)	Limit of detection $\pm$ SD ^c (ng mL ⁻¹)	IC ₅₀ $\pm$ SD ^c (ng mL ⁻¹)
Deionised water	0.31–3.38	0.14 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.13
Surface water	0.28–4.35	0.14 $\pm$ 0.04	1.15 $\pm$ 0.11

^a Values were extracted from the four-parameter equations used to fit the standard curves.^b Expressed as the concentration range causing 20–80% inhibition of the maximal assay signal.^c Standard deviation.**Fig. 3.** Standard curve of methiocarb in optimized immunochromatographic assay coupled with densitometry. (—) Four-parameter logistic fit. The error bars correspond to the standard deviations of the data points ($n=4$).

optimized conditions. Cross-reactants tested were the following carbamate pesticides: carbaryl, carbofuran, aldicarb, bendiocarb, ethiofencarb, fenoxycarb, and methomyl. Standard solutions of each compound in concentrations of 10 and 100 ng mL⁻¹ were applied into reactant mixture of ICA test instead of methiocarb. No significant inhibition of the test line intensity was found. These results indicated that the cross-reactions of mentioned pesticides were <1%. Similarly, Abad et al. (1998) and Mickova et al. (2005) described only negligible cross-reactions of some structurally related compounds in ELISA for methiocarb using the same monoclonal anti-methiocarb antibody and methiocarb-OVA conjugate as used in this work.

3.6. Matrix effects

Water samples can usually be used directly for immunochemical analysis without prior cleanup. However, immunochemical

interaction is not completely free from interferences caused by unidentified compounds of the sample matrix. Therefore, it is advisable to determine the importance of these matrix effects before the application of immunoassay to real samples. To investigate the potential effect of sample matrix on strip test, we compared standard curves performed with methiocarb in deionised water and surface water, respectively. The obtained curves were nearly identical as can be seen from their analytical features shown in Table 2. Accordingly, the developed ICA test seemed to be directly applicable to the surface water screening without any sample treatment, as matrix effects were minimal.

3.7. Comparison of ICA with ELISA in analysis of water samples

Methiocarb-free samples of surface water were used for spiking study. Samples were spiked at methiocarb levels of 0.5, 2.5 and 10 ng mL⁻¹ and assayed by ICA and validated ELISA (Table 3).

In the visually assessed ICA, negative results (–) were obtained for non-spiked samples. Weakly positive results (±) were obtained for samples spiked at concentrations of 0.5 and 2.5 ng mL⁻¹, while samples spiked at level of 10 ng mL⁻¹ were assessed as positive (+). All ELISA results were very close to the spiked levels. These experiments demonstrated the high correlation between visually assessed ICA and ELISA.

Using the quantitative ICA, the accuracy and repeatability of the assay were evaluated through recovery study. In the first quantitative analysis, samples with a high spiked concentration were recognized as requiring dilution with deionised water for repeated analysis (they fell out of the working range of the standard curves in ICA or ELISA). In ICA, the recovery of the spiked concentrations was satisfactory with all water samples, as all data fell into the range of 90–106%. In ELISA, recoveries ranged from 91 to 117%. Moreover, method reproducibility was also very similar for both analytical systems, with relative standard deviation (RSD) ranging from 8.2 to 16.5% for the ICA and from 5.3 to 16.9% for the ELISA. The results showed the high correlation of the quantitatively evaluated ICA with ELISA.

Table 3Comparison of ICA and ELISA in analysis of water samples spiked by methiocarb ($n=5$).

Type of water	Spiked concentration (ng mL ⁻¹)	ICA results				ELISA results		
		Visual detection ^a	Mean ^b (ng mL ⁻¹)	Recovery ^b (%)	RSD ^{b,c} (%)	Mean (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD ^c (%)
Surface water I	0	– – – – –	<LOD ^d	–	–	<LOD ^d	–	–
	0.5	± ± ± ± ±	0.51	102.0	11.8	0.54	108.0	12.9
	2.5	± ± ± ± ±	2.58	103.2	12.0	2.62	104.8	8.4
	10.0	+ + + + +	10.30	106.0	15.1	11.70	117.0	16.9
Surface water II	0	– – – – –	<LOD ^d	–	–	<LOD ^d	–	–
	0.5	± ± ± ± ±	0.49	98.0	8.2	0.55	110.0	14.6
	2.5	± ± ± ± ±	2.25	90.0	10.2	2.28	91.2	5.3
	10.0	+ + + + +	10.28	102.8	16.5	11.24	112.4	8.5

^a Visual assessment of the test line; (–) negative result (concentration <0.5 ng mL⁻¹); (+) positive result (concentration >5 ng mL⁻¹); (±) weakly positive result (concentration in the range of 0.5–5.0 ng mL⁻¹).^b Quantitative assessment of ICA using densitometry.^c RSD, relative standard deviation.^d LOD, limit of detection.

3.8. Stability of ICA test

The stability of ICA tests was studied using methiocarb standard solution of 2.0 ng mL^{-1} and blank solution. Strips were stored at laboratory temperature under desiccated conditions. The running buffer, diluted stock suspension of SwAM-carbon conjugate, and anti-methiocarb antibody solution were stored at 4°C . Three assays were performed once a week during the period of 2 months. Based on the visual assessment of ICA strips, no significant differences in the test line intensity were recognized. Quantitative values of the assay stability were expressed as percentage of the test line intensity at the day zero. All these values were in the range of 88–122% without any notable trend in time. It could be assumed that ICA tests were stable for at least 2 months.

4. Conclusions

We have successfully demonstrated an approach to carbon particle-based ICA for rapid and sensitive monitoring of methiocarb in surface water. The methiocarb immunostrip test was developed, which used colloidal carbon nanoparticles as a tracer to provide visual evidence of the presence of methiocarb at environmentally relevant levels within 10 min. This semi-quantitative assay is easy to perform, allowing for non-specialized personnel on-site application without requirement for intensive labour and any device for sample analysis. This characteristic makes it useful for incorporation into environmental monitoring programmes. Moreover, by the use of a scanner for quantitative strip evaluation, the ICA allowed the analysis of surface water with acceptable accuracy. It showed a potential to be a rapid and inexpensive quantitative method for methiocarb assay in laboratory. Research is currently focused on the on-site application of the ICA test and on the use of ICA for detection of methiocarb in fruit juices and baby-food.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Grant Agency (project No. 525/07/0618), and by Ministry of Education of Czech Republic (project No. MSM 6046137305).

Authors are thankful to Dr. Aart Van Amerongen from Wageningen University and Research Centre for providing carbon particles.

References

Abad, A., Moreno, M.J., Montoya, A., 1998. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2417–2426.
 Abad, A., Moreno, M.J., Pelegrí, R., Martínez, M.I., Sáez, A., Gamón, M., Montoya, A., 1999. *J. Chromatogr. A* 833, 3–12.
 Anand, C., Pasha, A., Swetha, M.D., Gowda, P., Rani, B.E.A., Karanth, N.G.K., 2007. *Food Agric. Immunol.* 18, 39–51.
 Anonymous, 2005. EWG Investigation—U.S. Tap Water Quality Database, National Contaminant Report—Methiocarb. <http://www.ewg.org/tapwater/contaminants/contaminant.php?contamcode=2024>.

Anonymous, 2007. U.S. Environmental Protection Agency: OPP Aquatic Life Benchmarks. <http://www.epa.gov/oppfead1/ecorisk.ders/aquatic.life.benchmark.htm>.
 Blasco, C., Font, G., Manes, J., Pico, Y., 2005. *J. AOAC Int.* 88, 847–853.
 Borkovcova, I., Janouskova, E., Rehurkova, I., Ruprich, J., 2004. *Cent. Eur. J. Publ. Health* 12, 220–223.
 Fytianos, K., Pitarakis, K., Bobola, E., 2006. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86, 131–145.
 García de Llasera, M.P., Bernal-Gonzales, M., 2001. *Water Res.* 35, 1933–1940.
 Gui, W.J., Wang, S.T., Guo, Y.R., Zhu, G.N., 2008. *Anal. Biochem.* 377, 202–208.
 Huertas-Pérez, J.F., García-Campaña, A.M., 2008. *Anal. Chim. Acta* 630, 194–204.
 Jiang, X., Li, D., Xu, X., Ying, Y., Li, Y., Ye, Z., Wang, J., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1577–1587.
 Kaur, J., Singh, K.V., Boro, R., Thampi, K.R., Raju, M., Varshney, G.C., Suri, C.R., 2007. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5028–5036.
 Krámer, P.M., Martens, D., Forster, S., Ipolyi, I., Brunori, C., Morabito, R., 2007. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1435–1448.
 Kim, S.J., Gobi, K.V., Iwasaki, H., Tanaka, H., Miura, N., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 23, 701–707.
 Li, D., Wei, S., Yang, H., Li, Y., Deng, A., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2277–2280.
 Long, F., Shi, H.C., He, M., Zhu, A.N., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1361–1366.
 Marchesini, G.R., Koopal, K., Meulenbergh, E., Haasnoot, W., Irth, H., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1908–1915.
 Mauriz, E., Calle, A., Manclús, J.J., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lechuga, L.M., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1410–1418.
 Mickova, B., Kowalczyk, T., Rauch, P., Moreno, M.J., Abad, A., Montoya, A., Ferri, E., Fini, F., Girotti, S., 2005. *Anal. Chim. Acta* 528, 243–248.
 Mickova, B., Zrostlikova, J., Hajslova, J., Rauch, P., Moreno, M.J., Abad, A., Montoya, A., 2003. *Anal. Chim. Acta* 495, 123–132.
 Munn, M.D., Gilliom, R.J., Moran, P.W., Nowell, L.H., 2006. Pesticide toxicity index for freshwater aquatic organisms, 2nd ed. U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2006, 5148, 81 pp.
 O'Keeffe, M., Crabbe, P., Salden, M., Wichers, J., Van Peteghem, C., Kohen, F., Pieraccini, G., Moneti, G., 2003. *J. Immunol. Methods* 278, 117–126.
 Péry, A.R.R., Mons, R., Ducrot, V., Garric, J., 2004. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 358–364.
 Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., Van Amerongen, A., 2009. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 569–582.
 Primus, T.M., Kohler, D.J., Avery, M., Bolich, P., Way, M.O., Johnston, J.J., 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5706–5709.
 Rodrigues, A.M., Ferreira, V., Cardoso, V.V., Ferreira, E., Benoliel, M.J., 2007. *J. Chromatogr. A* 1150, 267–278.
 Saraji, M., Esteki, N., 2008. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1091–1100.
 Schäfer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M., 2007. *Sci. Total Environ.* 382, 272–285.
 Schulze, H., Scherbaum, E., Anastassiades, M., Vorlová, S., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2002. *Biosens. Bioelectron.* 17, 1095–1105.
 Shi, C., Zhao, S., Zhang, K., Hong, G., Zhu, Z., 2008. *J. Environ. Sci.* 20, 1392–1397.
 Shim, W.B., Yang, Z.Y., Kim, J.Y., Choi, J.G., Je, J.H., Kang, S.J., Kolosova, A.Y., Eremin, S.A., Chung, D.H., 2006. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9728–9734.
 Van Amerongen, A., Wichers, J.H., Berendsen, L.B.J.M., Timmermans, A.J.M., Keizer, G.D., Van Doorn, A.W.J., Bantjes, A., Van Gelder, W.M.J., 1993. *J. Biotechnol.* 30, 185–195.
 Vecchia, A.V., Martin, J.D., Gilliom, R.J., 2008. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 44, 1308–1324.
 Wang, S., Zhang, C., Wang, J., Zhang, Y., 2005. *Anal. Chim. Acta* 546, 161–166.
 Weetall, H.H., Rogers, K.R., 2002. *Anal. Lett.* 35, 1341–1348.
 Wilson, C., Strimple, P., Wilson, S., Albano, J., 2005. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 509–517.
 Zacco, E., Galve, R., Marco, M.P., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1707–1715.
 Zhou, P., Lu, Y., Zhu, J., Hong, J., Li, B., Zhou, J., Gong, D., Montoya, A., 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4355–4359.
 Zhou, Y., Pan, F.G., Li, Y.S., Zhang, Y.Y., Zhang, J.H., Lu, S.Y., Ren, H.L., Liu, Z.S., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2744–2747.
 Zhu, J., Chen, W., Lu, Y., Cheng, G., 2008. *Environ. Pollut.* 156, 136–142.

Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices

Barbora Holubová-Mičková · Martina Blažková ·
Ladislav Fukal · Pavel Rauch

Received: 1 April 2010 / Revised: 19 May 2010 / Accepted: 20 May 2010 / Published online: 6 June 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract A simple immunochromatographic assay for sensitive detection of insecticide carbaryl in fruit juices was developed. The test is based on inhibition format on a nitro-cellulose membrane strip. The strip was separately coated with rabbit anti-swine antibody (control line) and carbaryl hapten-OVA conjugate (test line). Colour intensity on the test line was possible to recognize visually from that of negative sample within 10 min, with the detection limit of 5 ng mL^{-1} . All characteristics of the visually evaluated strips were also measured quantitatively, and then the detection limit was 1.5 ng mL^{-1} . Cross-reactions with other carbamate pesticides were not found ($<1\%$). No matrix effects were observed when fruit juices (orange, apple, pear, banana) were diluted tenfold times before analyses. The results from immunochromatographical assay were in a good agreement with those obtained by enzyme-linked immunosorbent assay as reference method. All these facts indicate the potential of the immunochromatographic strip for the quality control of fruit juices.

Keywords Carbaryl · Immunochromatographic assay · Colloidal carbon-based immunoassay · Fruit juice

Introduction

The extensive use of pesticides formulations in agriculture, together with the increasingly rigorous regulations of the presence of contaminants in the environment, crop protection, and

food products, has brought about the need to develop sensitive and accurate methods for the detection and determination of pesticide residues [1].

Carbaryl (1-naphthyl *N*-methylcarbamate) is one of the most frequently detected pesticide residues in food analyses worldwide. The presence of traces of carbaryl in fruits and vegetables poses a potential hazard for consumers [2]. European Union legislation has established maximum residue level for food (Commission Regulations (EC) No. 149/2008) [3]. In the case of carbaryl, the maximum residue limit (MRL) is 0.05 mg kg^{-1} .

Numerous analytical procedures have been developed for the determination of carbaryl and its metabolites in various matrices, including water, soil, fruits, vegetables, and other crops. The preferred analytical technique for this pesticide is high-performance liquid chromatography, using ultraviolet [4], diode array [5], fluorescence [6], chemiluminescence [7], or mass spectrometric detection [8]. These chromatographic techniques are highly sensitive and reliable. However, they involve multiple steps in the sample preparation and analysis, they require specialized instrumentation, and they are expensive and time-consuming.

With an increasing importance of the immunochemical methods for pesticide screening and quantification, several formats of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were developed for monitoring carbaryl in water [9], fruits, or vegetables [10, 11].

Nowadays, the instrumental techniques combined with an immunochemical approach for the carbaryl detection were described: disc-based immunoassay microarrays [12], a piezoelectric immunosensor [13], plasmon resonance flow-through immunosensor [14], portable optical immunosensor [15], and capillary electrophoresis-base immunoassay with laser-induced fluorescence [16]. The last technique has extremely low detection limit for carbaryl (0.05 ng mL^{-1}).

B. Holubová-Mičková · M. Blažková · L. Fukal · P. Rauch (✉)
Department of Biochemistry and Microbiology,
Institute of Chemical Technology, Prague,
Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
e-mail: pavel.rauch@vscht.cz

The described methods for carbaryl detection also require skilled personnel, and their application is usually restricted to the well-equipped laboratories. Recently, various immunochromatographic techniques have given rise to some very popular commercially available tools mainly in the diagnostic [17–20] and have proved to be cheap, robust and user-friendly and thus could be incorporated into the food inspection, surveillance, and monitoring programmes of regulatory agencies [21, 22]. Such immunochromatographic techniques were developed also for the carbaryl detection in agricultural products and biological samples [23–25]. In these techniques, the authors based their experiments on the polyclonal antibodies and as a marker they used colloidal gold nanoparticles.

Our previous studies described validation of ELISA for control of carbaryl residues in some food samples [26, 27]. Here, we reported a development of the sensitive immunochromatographic strip test for the carbaryl detection using monoclonal antibodies and colloidal carbon nanoparticles as a label. The optimized test has been compared with ELISA results in the analysis of spiked fruit juice samples.

Materials and methods

Reagents and materials

Standards of carbaryl (99%, HPLC/DAD), carbofuran (99.5%, HPLC/DAD), methiocarb (98.5%, HPLC/DAD) were from Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany. Aldicarb (99.9%, HPLC, Fluka), bendiocarb (99.5%, HPLC, Riedel-de Haën), ethiofencarb (99.0%, HPLC, Riedel-de Haën), fenoxycarb (99.6%, HPLC, Fluka), and methomyl (99.9%, HPLC, Fluka) were supplied by Sigma–Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Individual stock standard solutions containing 1 mg mL^{-1} of each compound were prepared by dissolving accurately weighted amounts in ethanol and stored in darkness at 4°C . Working standard solutions were freshly prepared by serial dilution in the running buffer (0.2 M borate buffer, pH 8.8, containing 2% BSA, 0.2% Triton).

The mouse anti-carbaryl monoclonal antibody as well as the carbaryl hapten-ovalbumin conjugate (carbaryl-OVA) was purchased from Centro de Apoyo a la Innovación, la Investigación y la Transferencia de Tecnología (CTT), Universidad Politécnica de Valencia, Spain. Producer indicated these immunoreagents as MAb/LIB-CNH45 and OVA-2NAH, respectively [27]. Rabbit anti-swine antibody (RASw) as well as the swine anti-mouse antibody (SwAM) was obtained from Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, the Netherlands (product codes RASw/IgG(H+L)/7S and SwAM/IgG(H+L)/7S). Both antibodies were supplied as purified IgG fraction of polyclonal antiserum.

Carbon nanoparticles (Spezial Schwartz 4, Degussa AG, Germany) were kindly provided from Agrotechnology & Food Sciences Group (Wageningen University and Research Centre, the Netherlands) as a dry powder (particles of amorphous shape with average size of 120 nm).

Bovine serum albumin (BSA), Tween 20, polyethylene glycol (PEG, MW 3350), and *o*-phenylenediamine (OPD) were purchased from Sigma–Aldrich Inc. (St. Louis, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-labelled swine anti-mouse IgG (SwAM, HRP/SwIgG = 1.81, concentration 8.9 mg mL^{-1}) was obtained from Seva Pharma, Czech Republic.

Other common chemicals were of the highest purity available and purchased from Sigma–Aldrich.

Deionized water for standards and buffer solutions was prepared on apparatus RO-TFM-5SV (Fresh Water Systems, Inc., Greenville, USA).

Various types of nitrocellulose membranes were supplied by Whatman GmbH, Dassel, Germany (PRIMA 80, PRIMA 125, AE 98 FAST, AE 98, Protran BA 79, Protran BA 83, Protran BA 85), by Millipore Ltd., Praha, Czech Republic (Immunopore FP, Immunopore RP, HiFlow Plus HF 135, HiFlow Plus HFB180, HiFlow Plus 090), by Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, France (Unisart 140), and tested in strip assay. Vinyl backing ARcare® 7823 was from Adhesives Research Inc. (USA), and the absorbent pad CFSP was from Millipore Corp. (USA). Ninety-six well ELISA polystyrene microtitre plates Costar (catalogue no. 9018) were obtained from Corning Inc. (USA).

Fruit juices samples

Samples of fruit juices were from a retail market. Carbaryl-free fruit juices, as verified by ELISA and by LC/MS analysis [26], were used without any sample treatment.

Spiked juice samples containing carbaryl were prepared as follows: carbaryl-free samples were spiked with a known amount of carbaryl derived from stock solution (1 mg mL^{-1} in ethanol) and used immediately for the matrix effect experiments and recovery studies. The concentration of ethanol in the analysed sample was very low and had no negative effect on nitrocellulose membrane.

Labelling of swine anti-mouse antibody with carbon nanoparticles

Carbon nanoparticles bind proteins non-covalently without changing their bioactivity [28]. The swine anti-mouse antibody (SwAM) was labelled with colloidal carbon nanoparticles, as described elsewhere [29]. The procedure was slightly modified as follows: a colloidal carbon suspension (carbon nanoparticles 2 mg mL^{-1} of 5 mM borate buffer,

pH 8.8) was sonicated for 10 min on ice using a Sonic 1 (Polsonic, Poland). Subsequently, with a simultaneous gentle stirring, the SwAM was added to give a final protein concentration of $350 \mu\text{g mL}^{-1}$. Then, this mixture was stirred gently at 4°C overnight. In the end, the suspension was washed three times in a 5 mM borate buffer, pH 8.8 (containing 1% BSA and 0.02% NaN_3) using centrifugation ($10,000g$, 15 min, 10°C). Final sediment was resuspended to the initial volume. Prepared stock suspension of the SwAM-carbon conjugate was stored at 4°C in the dark until used.

Preparation of immunochromatographic test strips

The carbaryl-ovalbumin conjugate (carbaryl-OVA) and rabbit anti-swine antibody (RASw) were used as immobilized capture reagents. The strips were constructed as follows: First, nitrocellulose membrane sheet was cut to the desired size ($20 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$) and pasted to a vinyl backing. Then, using the Linomat V (Camag AG, Switzerland), carbaryl-OVA and RASw solutions (5 mM borate buffer, pH 8.8) were separately dispensed ($1 \mu\text{L}$ per 5 mm) as the test and control lines (20 cm long) on this plastic-backed membrane. Subsequently, the membrane sheet was dried at 37°C for 2 h and cut into test strips ($25 \times 5 \text{ mm}$) using a programmable strip cutter (Economic Cutter ZQ2000, Shanghai Kinbio Tech Co., Ltd., Shanghai, China). An absorbent pad was cut in sections of $10 \times 20 \text{ mm}$ and pasted to the far end of the strip (Fig. 1). Strips prepared in such way were stored in sealed bags under dry conditions at laboratory temperature until used.

Procedure of immunochromatographic strip

In a well of an ELISA microplate, $30 \mu\text{L}$ of the running buffer (0.2 M borate buffer, pH 8.8 (containing 2% BSA, 0.2% Triton) was mixed with $10 \mu\text{L}$ of SwAM-carbon conjugate (stock suspension diluted with the running buffer), $10 \mu\text{L}$ of anti-carbaryl antibody (diluted in the running buffer), and $50 \mu\text{L}$ of carbaryl standard solutions or fruit

juice samples (tenfold diluted in running buffer). Subsequently, the membrane strip was dipped into this reactant mixture vertically (Fig. 1). After 10 min, test result was observed.

Detection and quantification using immunochromatographic strip

The colour intensity of test line could be assessed visually by naked eyes. For quantification of the colour intensity, greyscale densitometry was used after the strip was fully air-dried. Greyscale digital scanned images of the strips were recorded using the Epson Perfection V700 Photo Scanner (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan), and the intensity of the test lines quantified using the TotalLab TL100 software (Nonlinear USA Inc., NC, USA). Average values were calculated from five parallel runs for each carbaryl concentration using three measurements for each strip. Standard curves were obtained by plotting the mean intensity value against the logarithm of carbaryl concentration. Experimental points were fitted to a four-parameter logistic equation using the Microsoft Excel software (Microsoft Corp., USA).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA, validated by LCMS analysis, was performed as we described previously [27].

Results and discussion

Description of the immunochromatographic strip

The scheme of the immunochromatographic strip is shown in Fig. 1. The rabbit anti-swine antibody is immobilized onto control line and conjugate carbaryl-ovalbumin on the test line. The indirect format was used in the detection procedure. Each analysed sample contains, besides carbaryl standard, or fruit juice diluted by buffer, the primary mouse anti-carbaryl antibody and the secondary swine anti-mouse antibody labelled by carbon nanoparticles. Both antibodies form detection complex. In the assay, the detection complex in the reaction mixture migrated from the well through the strip into the absorbent pad. In the absence of carbaryl in the sample, the solution of the detection complex and the excess of labelled Ab moved upward across the strip. In the test line, detection complex was captured by immobilized carbaryl-OVA conjugate to form a visible black colour line. However, in the presence of carbaryl in the sample, free carbaryl molecules bound to primary Ab, thereby inhibiting the interaction of the detection complex with the immobilized carbaryl hapten. Thus, the colour intensity of the test

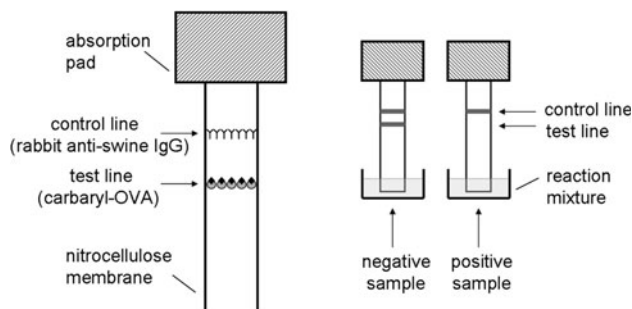


Fig. 1 Schematic diagram of the immunochromatographic strip test. Details are described in the text

line inversely correlated with carbaryl concentration in the sample.

The control line acted as a control to assure that the labelled secondary Ab migrated throughout the system. Here, it was captured by immobilized rabbit anti-swine antibody to form a visible line. If intensive colour was not present in the line, the assay was considered as invalid.

The stability of immunochromatographic strip tests was studied using carbaryl standard solution of 5 ng mL^{-1} and blank solution. Strips were stored at laboratory temperature under desiccated conditions. The running buffer, diluted stock suspension of SwAM-carbon conjugate, and anti-carbaryl antibody solution were stored at 4°C . Three assays were performed once a week during the period of 2 months. Stability values were expressed as percentage of the test line intensity at the day zero. All these values were in the range of 82–121% without any notable trend in time. It could be assumed that immunochromatographic strip test were stable for at least 2 months.

Selection of immunoreagent concentrations

Most of components necessary for the immunochromatographic strip construction as well as the experimental conditions have a key influence on both the performance and final sensitivity.

First, in this experimental study, the concentrations of reagents were preliminary optimized to satisfy the following assay criteria: good sensitivity, minimum immunoreagent consumption, and appearance of the test line with good colour intensity and sharpness (for negative sample). Therefore, checkerboard titration experiments were carried out. Several amounts of carbaryl-OVA conjugate immobilized on the membrane (10–500 ng per strip) against different amounts of primary Ab (1–100 ng per strip) were investigated in assays of standard solutions containing carbaryl at concentrations of 0, 5, 10, and 50 ng mL^{-1} , respectively. The same experiments were performed for different concentrations of carbon-labelled secondary Ab.

Subsequently, some other factors affecting strip test performance were also evaluated as follows: the type of membrane, the type of running buffer, and the incubation time of reactant mixture before the strip is dipped inside. Thirteen various types of nitrocellulose membrane were tested. The type of membrane influenced flow time and sharpness of detection lines. Faster-flowing membranes reached end-point more quickly but required higher reagent concentrations and provided lower sensitivity. Also, the composition of the running buffer markedly influenced flow rate, line intensity, and test sensitivity. Phosphate buffer and borate buffer of various pH values and ion concentrations were tested. Moreover, additives such as BSA (0.1–5%), gelatine (0.1–1%), polyethylene glycol (0.01–2%), sucrose (0.5–5%),

Table 1 Selected parameters of carbaryl immunochromatographic strip test

Parameter	Chosen as optimal
Type of nitrocellulose membrane	AE 98, Whatman ^a
Amount of carbaryl-OVA conjugate per strip	100 ng
Amount of primary antibody in assay	12.5 ng
Dilution of stock suspension of SwAM-carbon conjugate prior addition into assay	10-times
Composition of running buffer	0.2 M borate buffer, pH 8.8 (containing 2% BSA, 0.2% Triton)
Incubation time of reaction mixture	0 min

^a Pore size $5 \mu\text{m}$, capillary rise in water 160–210 s per 4 cm

and their combinations, with and without surfactants Tween 20 (0.01–0.5%) and Triton (0.01–0.5%), were tested to further improve the test performance. These factors affected mainly the character of reactant flow, level of background colour, sharpness, and intensity of the test line.

Optimized conditions for immunochromatographic strip test were chosen by visual evaluation of strips as a compromise among a good colour perception of lines, good test sensitivity, minimum immunoreagent consumption, and rapid test performance. They are collected in Table 1.

Sensitivity of immunochromatographic strip test

The sensitivity of the immunochromatographic strip test was determined by checking both the carbaryl standard solutions and spiked fruit juice samples in the concentration range from zero to 100 ng mL^{-1} (Fig. 2). The visual limit of detection of the assay was defined here as the minimum carbaryl concentration producing the colour density of the test line significantly weaker than that at zero concentration (it means absolute agreement between result assessments of four observers for five repetitions of the same test). As shown in Fig. 2, the carbaryl concentration of 5 ng mL^{-1} caused a slight, but visually distinguishable, difference in the test line intensity compared to the negative control. Thus, 5 ng mL^{-1} of carbaryl was considered to be the visual detection limit for the immunochromatographic strip test. The test line was invisible at concentrations of carbaryl $>10 \text{ ng mL}^{-1}$.

Finally, to obtain semiquantitative results and verify the visual limit of detection, greyscale densities of the test lines were recorded using the Epson Perfection V700 Photo Scanner (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan). The mean signal values were fitted to a sigmoid equation and displayed as the standard curve (Fig. 3). To express the assay sensitivity (Table 2), the limit of detection for

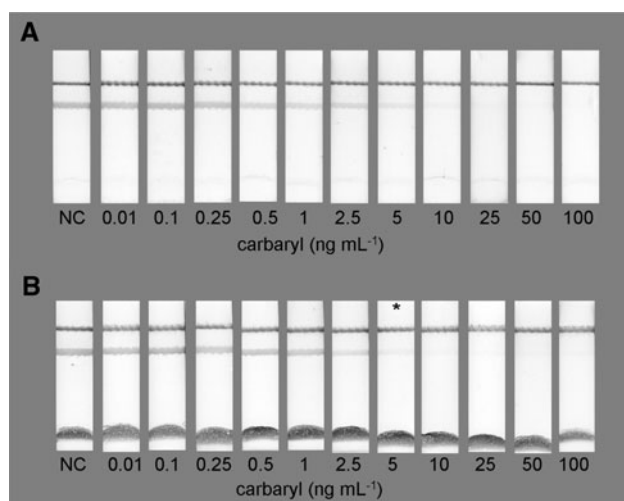


Fig. 2 The concentration range of carbaryl standard (a) and carbaryl in 10% orange juice (b) assayed by immunochromatographic strip test. NC, negative control. The concentration 5 ng mL⁻¹ caused considerably weak test line still visually distinguishable from the negative control

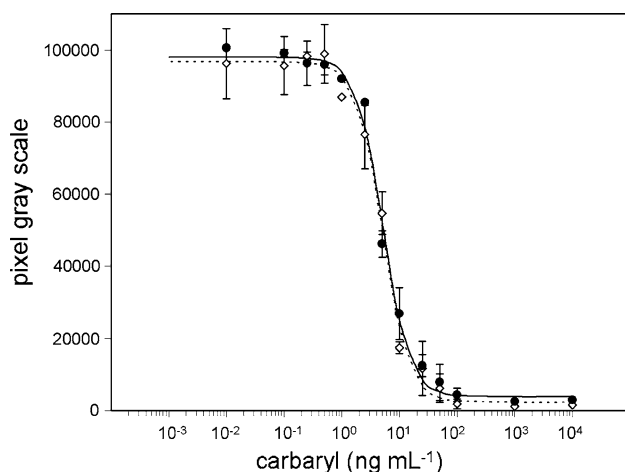


Fig. 3 Standard curves of carbaryl in buffer (open diamond) and in 10% orange juice (closed circle). The optimized immunochromatographic strip tests were measured by the Epson Perfection V700 Photo Scanner and evaluated by four-parameter logistic fit. The error bars correspond to the standard deviations of the data points ($n = 5$)

carbaryl in buffer (1.58 ± 0.22 ng mL⁻¹) was estimated as the analyte concentration providing a 10% decrease in the blank signal. Subsequently, the linear working range of 2.5–11.6 ng mL⁻¹ was determined as the concentrations causing 20–80% inhibition of the maximum assay signal, and the 50% inhibition (IC_{50}) value of 5.12 ± 0.40 ng mL⁻¹ related to the inflection point of the curve was calculated.

The ability of the developed immunochromatographic strip to detect lower carbaryl concentrations than the levels established by the European legislation as maximum

Table 2 The characteristics of carbaryl standard curves for immunochromatographic strip in buffer and orange juice obtained using the Epson Perfection V700 Photo Scanner

Sample	Linear working range ^a (ng mL ⁻¹)	Limit of detection $\pm$ SD ^b (ng mL ⁻¹)	$IC_{50} \pm SD^b$ (ng mL ⁻¹)
Buffer	2.5–11.6	1.58 ± 0.22	5.12 ± 0.40
10% Orange juice	2.5–12.2	1.63 ± 0.37	5.16 ± 0.96

Values were extracted from the four-parameter equations used to fit the standard curves

^a Expressed as the concentration range causing 20–80% inhibition of the maximal assay signal

^b Standard deviation

residue limit (MRL) 0.05 mg kg⁻¹ [3] illustrated the potential of this technology for the analysis of fruit juices. The value of visual detection limit observed in our work is comparable or even lower than those described for carbaryl immunochromatographic detection by the other authors who used polyclonal antibodies and colloidal gold as a label [23–25]. Our results are also comparable with the sophisticated instrument immunoassays [13–15].

Specificity of immunochromatographic strip test

To determine the selectivity of the developed immunochromatographic strip test for carbaryl, a study of cross-reactivity was carried out under the optimized conditions. Figure 4 shows that even two-order higher concentration of cross-reacting pesticide (e.g. carbofuran) has no influence on the result of the assay. Standard solution of carbofuran in concentration 10 μ g mL⁻¹ was applied into reactant mixture of immunochromatographic strip test together with carbaryl (strip 2) and instead of carbaryl (strip 3). The similar results (data not shown) were obtained with the following pesticides: methiocarb, aldicarb, bendiocarb, ethiofencarb, fenoxycarb, methomyl. No inhibition of the test line intensity

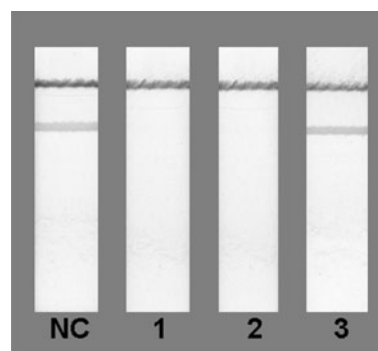


Fig. 4 Cross-reactivity of carbofuran in the carbaryl assay. NC negative control, 1 carbaryl 0.1 μ g mL⁻¹, 2 carbaryl 0.1 μ g mL⁻¹ and carbofuran 10 μ g mL⁻¹, 3 carbofuran 10 μ g mL⁻¹

was found even at instrumental assessment of strips. These results indicated that the cross-reactions of mentioned pesticides were <1%. Similarly, other authors [9] described only negligible cross-reactions of some structurally related compounds in ELISA for carbaryl, using the same monoclonal anti-carbaryl antibody and carbaryl-OVA conjugate as used in this work.

Matrix effects

Immunochemical methods for the detection of pesticides have many advantages. On the other hand, these methods are susceptible to the matrix interference of food samples [24]. Therefore, it is advisable to determine the importance of possible matrix effects before the application of immunochromatographic strip test to real samples. The matrix effect, in case of fruit juices, can be overcome by their simple dilution with buffer [27]. To investigate the potential effect of sample matrix on strip test, we compared standard curves performed with carbaryl in buffer and juices, respectively. No matrix effect of orange juice was observed at tenfold dilution in borate buffer, pH 8.8. This result is demonstrated on Fig. 3. The obtained curves were nearly

the same as can be seen from their analytical values shown in Table 2. Accordingly, the developed immunochromatographic strip test seemed to be directly applicable to the fruit juices screening after tenfold dilution by buffer as matrix effects were negligible. The same results were obtained with the other tested fruit juices: pear, apple, and banana (data not shown).

Comparison of immunochromatographic strip test with ELISA in recovery study

The accuracy and repeatability of the optimized immunochromatographic strip test were evaluated through recovery studies with samples of fruit juices spiked at carbaryl levels from 50 to 500 ng mL⁻¹. The spiked samples were tenfold diluted before analysis. The immunochromatographic strip test results (Table 3) found by naked eye and using quantification by photo scanner were compared with those found by ELISA validated by LCMS analysis [26]. By visual detection, all carbaryl-spiked samples were assessed as positive.

Using the quantitative immunochromatographic strip test, the recovery of the spiked concentrations in the fruit juices was satisfactory, as all data fell into the range of

Table 3 Overview of the results obtained by immunochromatographic strips (ICS) and enzyme immunoassay (ELISA) of juice samples spiked by different carbaryl concentration ($n = 5$)

Type of sample	Carbaryl concentration ^a (ng mL ⁻¹)	ICS results				ELISA results		
		Visual detection ^b	Found ^c (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)	Found ^c (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)
Banana juice	0	— — — — —	<LOD	—	—	<LOD	—	—
	5	± ± ± ± ±	4.2	82.0	18.2	4.1	82.1	15.9
	10	± ± ± ± ±	8.1	81.0	16.7	8.8	88.0	18.4
	50	+ + + + +	39.0	78.0	12.0	41.3	82.6	12.9
Pear juice	0	— — — — —	<LOD	—	—	<LOD	—	—
	5	± ± ± ± ±	4.2	84.0	16.9	4.3	86.0	14.8
	10	± ± ± ± ±	9.2	92.0	15.6	9.5	95.1	16.4
	50	+ + + + +	40.5	81.0	12.1	42.3	84.6	11.9
Apple juice	0	— — — — —	<LOD	—	—	<LOD	—	—
	5	± ± ± ± ±	4.4	88.0	16.6	4.5	90.0	14.9
	10	± ± ± ± ±	8.9	89.0	12.1	9.0	90.0	13.7
	50	+ + + + +	46.1	92.2	10.9	44.3	88.6	10.2
Orange juice	0	— — — — —	<LOD	—	—	<LOD	—	—
	5	± ± ± ± ±	4.1	82.0	15.2	4.5	90.0	14.3
	10	± ± ± ± ±	8.6	86.0	12.0	9.1	92.1	13.9
	50	+ + + + +	42.5	90.0	9.6	45.0	90.0	9.6

^a To avoid matrix effect, all analysed samples were tenfold diluted before analysis

^b Visual assessment of the test line; (—) negative result (concentration <2.5 ng mL⁻¹); (+) positive result (concentration >10 ng mL⁻¹); (±) weakly positive result (concentration in the working range 2.5–12.2 ng mL⁻¹)

^c Quantitative assessment of ICS using densitometry

RSD Relative standard deviation

LOD Limit of detection

78.1–92.2%. In ELISA, the recoveries ranged from 82.1 to 95.1%. Moreover, the method reproducibility was also very similar for both analytical systems, with relative standard deviation (RSD) ranging from 9.6 to 18.2% for the immunochromatographic strip test and from 9.6 to 18.4% for the ELISA.

Conclusions

We have successfully demonstrated an approach to carbon particle-based immunochromatographic strip test for the rapid and sensitive monitoring of carbaryl in fruit juices. The carbaryl test, which used colloidal carbon nanoparticles as a tracer to provide visual evidence of the presence of this insecticide in fruit juices within 10 min, was developed. This assay is simple, easy to perform, allowing for non-specialized personnel on-site application without requirement for intensive labour and any device for sample analysis. These characteristics make the immunochromatographic strip test useful for incorporation into food analysis. Moreover, by the use of a scanner for quantitative strip evaluation, the immunochromatographic strip test allowed the analysis of fruit juices with acceptable accuracy. It showed a potential to be a rapid and inexpensive method for carbaryl assay in laboratory.

Acknowledgments The authors are grateful to financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (project No. 525/07/P273) and to Ministry of Education of the Czech Republic (project No. MSM 6046137305).

Conflict of interest statement The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- González-Martínez MA, Morais S, Puchades R, Maquieira A, Abad A, Montoya A (1997) *Anal Chem* 69:2812–2818
- Abad A, Moreno MJ, Pelegri R, Martínez MI, Sáez A, Gamón M, Montoya A (2001) *J Agric Food Chem* 49:1707–1712
- Commission Regulation (EC) No 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto
- Santalad A, Srijaranai S, Burakham R, Glennon JD, Deming RL (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:1307–1317
- Topuz S, Ozhan G, Alpertunga B (2005) *Food Control* 16:87–92
- Fu LY, Liu XJ, Hu J, Zhao XN, Wang HL (2009) *Anal Chim Acta* 632:289–295
- Huertas-Perez JF, Garcia-Campana AM (2008) *Anal Chim Acta* 630:194–204
- Zrostlikova J, Hajslova J, Kovalczuk T, Stepan R, Poustka J (2003) *J AOAC Int* 86:612–622
- Abad A, Montoya A (1997) *J Agric Food Chem* 45:1495–1501
- Wang S, Yu C, Wang J (2005) *Food Addit Contam* 22:735–742
- Zhang C, Ma GP, Fang GZ, Zhang Y, Wang S (2008) *J Agric Food Chem* 56:8832–8837
- Kido H, Maquieira A, Hammock BD (2000) *Anal Chim Acta* 411:1–11
- March C, Manclus JJ, Jimenez Y, Arnau A, Montoya A (2009) *Talanta* 78:827–833
- Mauriz E, Calle A, Abad A, Montoya A, Hildebrandt A, Barcelo D, Lechuga LM (2006) *Biosens Bioelectron* 21:2129–2136
- Mauriz E, Calle A, Montoya A, Lechuga LM (2006) *Talanta* 69:359–364
- Zhang C, Ma GP, Fang GZ, Zhang Y, Wang S (2008) *J Agric Food Chem* 56:8832–8837
- Kolosova AY, Sibanda L, Dumoulin F, Lewis J, Duveiller E, Van Peteghem C, De Saeger S (2008) *Anal Chim Acta* 616:235–244
- Blažková M, Koets M, Rauch P, Van Amerongen A (2009) *Eur Food Res Technol* 229:867–874
- Blažková M, Karamonová L, Greifová M, Fukal L, Hoza I, Rauch P, Wyatt G (2006) *Eur Food Res Technol* 223:821–827
- Rusanova TY, Beloglazova NV, Goryacheva IY, Lobeau M, Van Peteghem C, De Saeger S (2009) *Anal Chim Acta* 653:97–102
- Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Van Amerongen A (2009) *Anal Bioanal Chem* 393:569–582
- Blažková M, Mičková-Holubová B, Rauch P, Fukal L (2009) *Biosens Bioelectron* 25:753–758
- Wang S, Zhang C, Wang J, Zhang Y (2005) *Anal Chim Acta* 546:161–166
- Wang S, Zhang C, Zhang Y (2005) *Anal Chim Acta* 535:219–225
- Zhang C, Zhang Y, Wang SJ (2006) *Agric Food Chem* 54:2502–2507
- Mickova B, Zrostlikova J, Hajslova J, Rauch P, Moreno MJ, Abad A, Montoya A (2003) *Anal Chim Acta* 495:123–132
- Mickova B, Kovalczuk T, Rauch P, Moreno MJ, Abad A, Montoya A, Ferri E, Fini F, Girotti S (2005) *Anal Chim Acta* 528:243
- Van Amerongen A, Wichers JH, Berendsen LBJM, Timmermans AJM, Keizer GD, Van Doorn AWJ, Bantjes A, Van Gelder WMJ (1993) *J Biotechnol* 30:185–195
- O'Keefe M, Crabbe P, Salden M, Wichers JH, Van Peteghem C, Kohen F, Pieraccini G, Moneti G (2003) *J Immunol Methods* 278:117–126

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

RYCHLÁ DETEKCE THIABENDAZOLU V LATERÁLNÍM TOKU NA MEMBRÁNĚ S NANOČÁSTICEMI ZLATA

SANDRA GÖSELOVÁ, BARBORA HOLUBOVÁ, MARTINA BLÁŽKOVÁ a LADISLAV FUKAL

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Ladislav.Fukal@vscht.cz*

Došlo 15.5.13, přijato 18.6.13.

Klíčová slova: thiabendazol, laterální tok, LFIA, nanočástice zlata, imunochromatografie

Úvod

Z původní role doplňujícího nástroje biochemického výzkumu se imunochemické metody v průběhu několika minulých desetiletí etablovaly jako jedna z alternativ chemické analytiky v řadě oborů^{1–4}. Jejich největší rozšíření je vidět v klinické diagnostické praxi. V současnosti narůstá napříč obory poptávka po tzv. rychlých testech – semikvantitativním formátu, který by byl jednodušší než klasické uspořádání enzymové imunoanalýzy (ELISA) ve zkumavkách či mikrotitračních destičkách, tzn. byl snadněji proveditelný, rychlejší, aplikovatelný v místě odběru vzorku (event. nevyžadoval použití přístroje ani uživatele odborníka specialistu). Pro rychlou detekci velkých molekul (bílkovin) nebo buněk v jednom nebo několika málo vzorcích bez použití fotometru je nejpohodlnější sendvičové provedení ELISA v podobě ponořovacích tyčinek (na aktivní zónu s imobilizovaným imunoreaktantem se postupně aplikují další reaktanty ponořováním tyčinky do roztoků příslušného složení, přebytek nezachycených substancí se odstraňuje opláchnutím) nebo kartiček s aktivními zónami z porézního materiálu (všechny složky aplikovaných roztoků protékají skrz tenkou porézní pevnou fázi s imobilizovaným imunoreaktantem, zachytí se pouze imunokompatibilní substance). Po aplikaci imunorektantů a testovaného vzorku je přidán substrát pro enzymovou reakci a po příslušné inkubaci je vytvořený odstín zbarvení aktivní zóny vizuálně porovnáván se standardní stupnicí.

Jako vhodnější formát se ukázala imunochromatografická technika podélného toku reagentů proudem porézní membrány (angl. Lateral Flow Immunoassay; zkr. LFIA), která umožňuje konstruovat také kompetitivní formát pro

detekci malých molekul typu haptenu. Kombinace vhodného značení jednoho z partnerů interakce a toku označené látky společně s analytem přes zónu se zakotveným druhým reaktantem umožňuje imunoafinitní zachycení analytu a jeho jednoduchou a rychlou detekci. Z důvodu urychlení detekce se nepoužívá jako značka enzym, ale jiný marker (nejčastěji nanočástice koloidních kovů^{5,6}), který nevyžaduje k produkci signálu dodatečné, časově náročné chemické reakce. Vertikální uspořádání v podobě namáčečích proužků obvykle neobsahuje všechna činidla předem zasušená na membráně^{7,8}, jako je tomu v horizontální LFIA, kde je membrána uložena v kazetě, která ji chrání před poškozením a zajišťuje její stabilní polohu při vlastní detekci⁹. Pro některé analyty se LFIA testy komerčně vyrábějí. Nejznámější se stala jejich aplikace v rámci tzv. těhotenského testu (detekce choriogonadotropinu). Vedle rozsáhlých diagnostických aplikací v klinické medicíně se LFIA testy začínají uplatňovat i při monitorování potravinových surovin a produktů, kde mají potenciál ke snížení nákladů na provedení analýzy i k omezení výdajů na skladování neproověřeného materiálu či minimalizaci prodlev ve výrobě nebo prodeji hotových výrobků. Rychlé a dostatečně přesné testy by umožnily zvýšit rozsah kontroly kvality a zdravotní nezávadnosti.

V této práci popisujeme sestavení a optimalizaci LFIA testu pro thiabendazol (zkr. TBZ; 2-(thiazol-4-yl)benzimidazol) – široce používaný fungicid, jehož rezidua v potravinách jsou sledována kontrolními laboratořemi a v ČR patří četností pozitivních nálezů v kontrolovaném ovoci opakovaně na přední místa mezi sledovanými pesticidy¹⁰. Tradičně se TBZ stanovuje v extraktech vzorků sofistikovanými postupy (GC/MS, LC/MS) po sérii purifikačních kroků^{11,12}. V literatuře jsou popsány i tři rychlé imunochemické postupy^{13–15}. Žádný z nich však nepředstavuje nejednodušší jednokrokovou detekci pouhou aplikací tekutého vzorku (surového extraktu) do analytického systému, tak jako LFIA. Jednoduchý LFIA test by mohl umožňovat rychlé terénní použití a být tak úspěšným komplementárním nástrojem ke stávajícím velmi nákladným instrumentálním postupům.

Experimentální část

Materiál

Thiabendazol (TBZ) – 98,5%, HPLC/DAD, 5-hydroxy-thiabendazol (99,5%, HPLC/DAD), stejně jako albendazol, benzimidazol, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, oxibendazol, 2-aminobenzimidazol a 1-naftol (97,0–99,5 %, HPLC/DAD) byly koupeny od firmy Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, SRN). Myši anti-thiabendazolové monoklonální protilátky (McAb), stejně jako konjugát thiabendazolového haptenu s ovalbuminem

(TBZ-OVA) dodala Universidad Politécnica de Valencia, Španělsko. Označuje je LIB-TN3C13 a OVA-TN3C ve shodě s publikací, kde je podrobně charakterizuje¹³. IgG-frakci z prasečího antiséra proti myším IgG (SwAM), i z králíčího proti prasečím (RASw) dodala firma Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Nizozemí. Koloidní částice zlata (40 nm, OD = 1) od firmy BBIInternational (Cardiff, UK), hovězí sérový albumin (BSA), Tween 20, Triton X100 a polyethylenglykol 20000 od Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Ostatní chemikálie čistoty p.a. byly od Lachema, a.s., Brno, nebo Penta, a.s., Praha. Nitrocelulosová membrána AE 98 a celulosová podložka pro vzorek CF1 byly od Whatman GmbH, SRN; podložka pro konjugát (ze skleněných vláken) GFCP 103000 a celulosová absorpční podložka CF SP 223000 od Millipore Corporation, USA. Plastovou výztuž membrány, ARcare® 8192, dodala firma Adhesives Research, Limerick, Irsko.

Metody

Příprava konjugátu protilátek s částicemi zlata

K 4 ml suspenze zlatých nanočástic (absorbance = 1) byl přidán 0,1M K₂CO₄, aby hodnota pH byla 8,8. K této suspenzi bylo za míchání přikapáno 100 µl protilátky (roztok v 5mM borátovém pufru, pH 8,8) o celkovém množství 0,8–20 µg (McAb) nebo 50 µg (SwAM). Po 2 h mírného míchání přidáno 200 µl 5% BSA a suspenze míchána 30 min. Následovalo odstředění (13 000 rpm, 5 °C, 15 min), supernatant byl odstraněn, pelety resuspendovány v 8 ml 5mM borátového pufru (s 0,1% BSA) a suspenze opět 15 min odstředěna. Toto bylo opakováno ještě dvakrát, finální resuspendace ve 2 ml 10mM borátového pufru (s 1% BSA, 2% sacharosou, 0,02% NaN₃). Takto připravený konjugát (absorbance = 1,5) byl uchováván v tmavé lahvi při 4 °C.

Příprava podložky pro konjugát a podložky pro vzorek

Podložka pro konjugát byla namočená do 10mM PBS pufru pH 7,4 (1% BSA, 0,25% Tween 20, 1% sacharosa, 0,02% NaN₃) a usušena při 37 °C. (Podložka pro vzorek byla upravena stejným způsobem, ale bez přidavku sacharosy). Dále byl nanášen konjugát Au-protilátka (anti-TBZ McAb nebo SwAM) ředěný 1:2 s 10mM PBS pufram pH 7,4 (1% BSA, 1% sacharosa, 0,02% NaN₃) v množství 30 µl cm⁻¹, a ev. volná McAb (3 ng na 1 test). Podložka usušena při 37 °C.

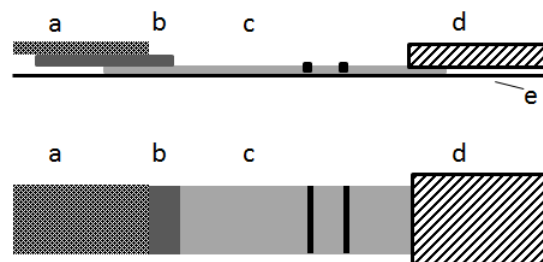
Příprava nitrocelulosové membrány a kompletace detekčního proužku

Nitrocelulosová membrána (2,5 × 20 cm) byla vyztužena polyesterovou podložkou (ARcare® 8192). Liniovým dávkovačem Linomat V (Camag AG, Švýcarsko) byly na membránu nanášeny reagentie (1 µl cm⁻¹) do dvou detekčních linek: roztok OVA-TN3C o koncentraci 50 µg ml⁻¹ do vzdálenosti 15 mm od spodního okraje, jako tzv. testovací linie (TL); roztok RASw (ev. SwAM) o koncentraci 200 µg ml⁻¹ jako tzv. kontrolní linie (KL) o 3 mm výše. Po

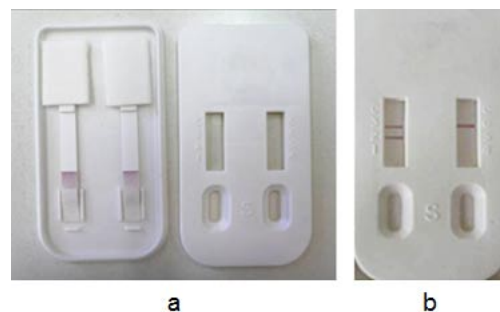
usušení membrány 2 h při 37 °C byla na spodní okraj membrány přilepena podložka pro konjugát se zasušeným konjugátem Au-Ab a dále připravená podložka pro vzorek. Takto připravená membrána byla nastříhávána na jednotlivé proužky o šířce 5 mm pomocí Economic Cutter ZQ2000 (Shanghai Kinbio Tech Co., Ltd., Čína). Vzájemné uspořádání membrán v LFIA testu ukazuje obr. 1. Po vložení detekčního proužku do předlisovaného lože spodního dílu kazety byla na jeho horní konec nalepena absorpční podložka a kazeta byla uzavřena horním dílem (viz obr. 2). Kazeta nesoucí stacionární fázi (multimembránový proužek) je opatřena portem na nanášení vzorku a vyhodnocovacím okénkem s testovací a kontrolní zónou.

Provedení detekce LFIA testem

100 µl (puřem ředěný) tekutý vzorek či jeho extrakt, ev. roztok standardu TBZ) je aplikováno na port. Po vsáknutí do podložky pro vzorek se v laterálním toku pohybuje směrem k absorpční podložce, přičemž z podložky pro konjugát uvolní zde zasušené složky testu. Po 10 min lze vyhodnotit výsledek testu. Pro semikvantitativní posouzení obsahu TBZ se intenzita zbarvení TL a KL vyhodnocuje vizuálně. Vzorky, při jejichž analýze bylo dosaženo stejné



Obr. 1. Schéma uspořádání membrán v LFIA testu (nárys a půdorys); a – podložka pro vzorek, b – podložka pro konjugát, c – membrána s testovací a kontrolní linkou v detekční zóně, d – absorpční podložka, e – plastová výztuž membrány



Obr. 2. Ukázka membránového testu v kazetě; a – uspořádání membrán v kazetě, b – výsledek testu standardního roztoku bez analytu a s vysokou koncentrací analytu

intenzity TL jako v případě negativní kontroly, byly považovány za negativní (–) s obsahem TBZ nižším než detekční limit (LOD). V případě, že intenzita barvy TL byla slabší než u negativní kontroly, byl výsledek hodnocen jako slabě pozitivní ($\pm$). V případě, že se v testovací zóně neobjevilo zbarvení, byl vzorek vyhodnocen jako silně pozitivní (+). Pro kvantitativní vyhodnocení byly skenem zaznamenány digitální obrazy jednotlivých LFIA-proužků a na nich byla intenzita zbarvení kvantifikována programem TotalLab TL100. Naměřené hodnoty pro roztoky standardu byly vyneseny proti logaritmu koncentrace a standardní křivka sigmoidního charakteru byla proložena pomocí čtyřparametrové logistické funkce¹⁶. LOD potom odpovídá průměrné hodnotě signálu při nulové koncentraci standardu minus 3 S_d .

Ověřovací stanovení TBZ v modelových vzorcích potravin bylo provedeno metodou ELISA dříve popsaným postupem¹³ v mikrotitračních destičkách. Standardní křivka metody měla následující charakteristiku: LOD 0,05 ng ml⁻¹, I_{50} 0,4 ng ml⁻¹, lineární oblast 0,2–9,7 ng ml⁻¹.

Výsledky a diskuse

LFIA test je multimembránový detekční nástroj (schéma viz obr. 1 a 2a). Princip detekce analytu spočívá ve dvou současně probíhajících jevech: (i) kapilární migrace reaktantů horizontálně proužkem membrány následovaná imunoafinitním zachytem v detekční zóně; (ii) inhibice imunochemické interakce mezi TBZ předem zakotveným v testovací lince a migrující primární protilátkou prostřednictvím volného TBZ ze vzorku. Po aplikaci analyzovaného vzorku na podložku pro vzorek započne migrace všech složek roztoku až do absorpční podložky na opačném konci testu. Při průchodu podložkou pro konjugát (částice zlata – protilátka) je tento roztokem uvolněn z podložky a dále unášen společně s komponentami vzorku. Při absenci analytu ve vzorku migruje značená protilátka přes detekční zónu, kde je zachycena imobilizovaným ekvivalentem analytu (TBZ-OVA) v testovací lince za vzniku výrazné červené linie (zbarvení nanočástic Au). V přítomnosti analytu ve vzorku jeho volné molekuly v migračním toku interagují se značenou protilátkou a inhibují její interakci

s TBZ-OVA (viz obr. 2b). Intenzita zbarvení testovací linky je tak nepřímě úměrná koncentraci analytu (v určitém rozmezí koncentrací). Vedle toho vznik zbarvení kontrolní linky není ovlivňován přítomností analytu. Slouží jako pozitivní kontrola k ujištění, že značená protilátka migruje membránou očekávaným způsobem.

Konjugace protilátek (Ab) s nanočásticemi zlata (AuNP)

Pro získání homogenního konjugátu AuNP s Ab a následně ostrých linek na membráně testu jsou nezbytné sférické monodispersní částice uniformní velikosti a tvaru. To jejich dodavatel v našem případě deklaruje. Negativní náboje obklopující povrch částic potlačují jejich samovolnou agregaci. S rostoucí velikostí jsou ale AuNP citlivější na přítomnost elektrolytů v prostředí a náchylnější k agregaci. Imunoglobuliny, stejně jako ostatní makromolekuly, se spontánně adsorbují na povrch AuNP prostřednictvím elektrostatických a hydrofóbních interakcí¹⁷, a tím je vlastně stabilizují proti agregaci¹⁸. Nejintenzivnější sorpce je dosaženo při hodnotách pH blízko jejich pI. Jelikož IgG představují izoelektricky heterogenní proteiny (pI = 5,5–8,7), nemůže být aplikován na jejich konjugaci s AuNP jednotný postup, ale pro konkrétní Ab a AuNP (vliv náboje, tvaru povrchu) je nutné jej optimalizovat především z hlediska pH, doby inkubace a množství přidaného proteinu^{19,20}. Příliš vysoká koncentrace vede k vícevrstvé sorpci a eventuálnímu uvolňování IgG z konjugátu během skladování^{20,21}. Citlivost imunometod je do značné míry dána afinitou Ab. U kompetitivních imunoanalýz lze velice zlepšit citlivost minimalizací množství Ab v reakci; u LFIA tedy množstvím Ab na jednu částici zlata a ev. následně množstvím konjugátu AuNP-Ab. Většina autorů^{22–26} pro LFIA používá ke konjugaci experimentálně zjištěné minimální množství Ab zajišťující stabilizaci sólu zlata vůči koagulaci při zvýšené koncentraci NaCl¹⁹. Protože jsme s konjugátem připraveným tímto způsobem nedosáhli následně při LFIA požadované citlivosti, snížili jsme množství McAb přidávané do konjugace (viz tab. I). Z velikosti molekuly IgG plyne, že i při aplikaci 0,2 μ g na 1 ml koloidu zlata připadá na 1 částici 9 molekul IgG. To je 5–30krát méně, než uvádějí

Tabulka I

Detekční limity testů dosažené s konjugáty AuNP-McAb lišícími se přidavkem množství anti-thiabendazolové McAb do sólu zlata při přípravě konjugátu

Detekční limit	Množství McAb na 1 ml AuNP		
	5 μ g	1 μ g	0,2 μ g
„Cut-off“ (ng ml ⁻¹) ^a	200	200	50
LOD pro kvantitativní hodnocení (ng ml ⁻¹) ^b	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,05

^a Nejnižší koncentrace thiabendazolu, při které se ve vizuálně hodnoceném testu neobjevila testovací linka, ^b detekční limit odečtený ze standardní křivky, AuNP – nanočástice zlata, McAb – monoklonální protilátka

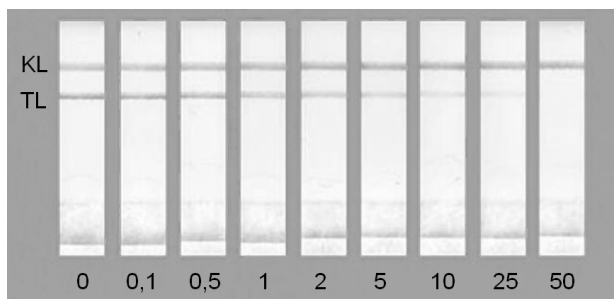
zmiňované práce^{22–26}. Pokud je průměrný průmět molekuly IgG do plochy 65 nm² (cit.^{27–29}), potom je teoreticky potřeba na jednovrstvé pokrytí povrchu částice maximálně 78 molekul IgG. Je otázka, zda takové množství není pro daný účel kontraproduktivní: (i) spotřebuje se větší množství cenného reaktantu; (ii) nedosáhne se tím lepší citlivosti; (iii) při nízkých koncentracích Ab se tyto sorbují na povrch AuNP s výrazně vyšší účinností ve srovnání s vyššími koncentracemi (až 98 % po 15 min inkubace)^{20,30}; (iv) koloidní stabilita sólu zlata je každopádně i v případě použití menšího množství Ab pro konjugaci zajištěna následným přidáním přebytku inertního BSA. Z tab. I je zřejmé, že s konjugátem připraveným s nejnižším množstvím Ab bylo dosaženo nejlepší citlivosti LFIA. Intenzita zbarvení kontrolní linky ale byla slabá, vizuálně špatně patrná, což nevyhovuje požadavkům na terénní test.

Proto bylo experimentálně prověřeno následující řešení. AuNP byly konjugovány s vyšším množstvím tzv. sekundární protilátky (SwAM) a k získanému konjugátu přidáváno do LFIA malé množství anti-TBZ McAb.

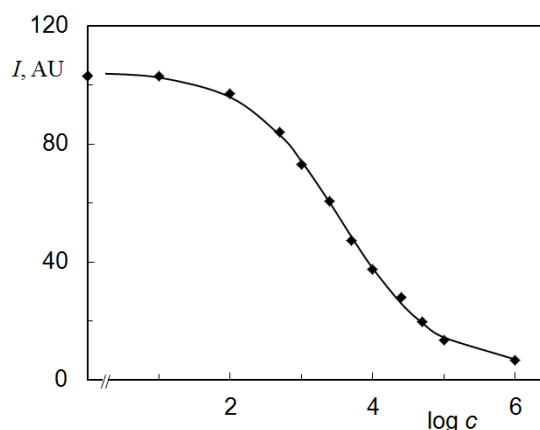
Konstrukce a charakterizace LFIA testu

Při použití konjugátu AuNP se sekundární Ab (SwAM) byla na kontrolní linku membrány testu imobilizována terciární Ab (RASw, protilátka proti sekundární Ab). Po optimalizaci množství všech reaktantů v testu byl v tomto uspořádání zjištěn vizuální LOD 2 ng ml⁻¹ (obr. 3). Také při kvantitativním vyhodnocení testu LFIA bylo dosaženo parametrů (standardní křivka viz obr. 4), které vyhovují požadavkům na skriningovou detekci TBZ v terénních podmínkách (LOD = 0,1±0,02 ng ml⁻¹, I₅₀ = 2,2 ng ml⁻¹, lineární část standardní křivky 0,4–20 ng ml⁻¹).

Sestavený a charakterizovaný test byl prověřen při detekci TBZ v uměle kontaminovaných vzorcích potravin – ovocných džusech (pomarančový, banánový, jablečný), ovoci, dětské výživě. Maximální limity reziduí (MLR) thiabendazolu jsou 5 mg kg⁻¹ v uvedeném ovoci (džusech), a 0,01 mg kg⁻¹ v dětské výživě, což jsou koncentrace výrazně nad LOD testu dosaženými pro roztoky standardu



Obr. 3. Testovací proužky po aplikaci ředící řady standardních roztoků thiabendazolu (ng ml⁻¹); TL – testovací linka, KL – kontrolní linka



Obr. 4. Standardní křivka testu pro thiabendazol; I – intenzita zbarvení testovací linky (arbitrární jednotky), c – koncentrace thiabendazolu (pg ml⁻¹), S_d = 3,4–11,7 % (n=5)

TBZ v pufru. Možnost aplikace kapalných vzorků nebo surových extraktů pevných vzorků do analýzy bez jakéhokoliv předchozího čištění je jednou z výhod imunometod. Různé typy matrice vzorku však mohou s různou intenzitou v analýze interferovat. Nejjednodušší způsob odstranění takových interferencí je naředění vzorku (filtrátu z homogenátu). V našem případě odstranění vlivu matrice na výsledky testu představovalo pro všechny typy vzorků stonásobné naředění pufrům a následně nutnost prokázat LFIA testem 100krát nižší koncentrace než uvedené hodnoty MLR. Detekční limity dosažené LFIA testem v naředěných maticích po přepočtu na neředěný vzorek jsou uvedeny v tab. II. Je z nich patrné, že uvedený LFIA test je vhodný pro kontrolu obsahu reziduí TBZ v ovoci a ovocných džusech. Variační koeficienty (inter-assay) pro koncentrace TBZ 5 mg kg⁻¹ byly menší než 16 % s průměrnou výtěžností 91–112 %. V případě dětské výživy jsou ale dosažené hodnoty LOD vyšší než je MLR daný hygienickými předpisy (tab. II). Proto by bylo nutné před použitím LFIA testu pro tento typ vzorků nejprve TBZ v roztoku nakoncentrovat. Např. vzorky jednoduše extrahovat v ethylacetátu, odparek organické fáze rozpustit v menším objemu methanolového roztoku (methanol-voda

Tabulka II
Detekční limity LFIA testů dosažené v maticích ředěných vzorků (přepočteno na neředěný vzorek)

Druh vzorku	Detekční limit (mg kg ⁻¹)	
	vizuální	kvantitativní
Ovocné džusy	0,5	0,05
Ovoce	1,0	0,2
Dětská výživa	0,5	0,05

3:7) a tento surový extrakt analyzovat LFIA (výsledky nejsou uvedeny).

Závěr

Byl sestaven jednokrokový imunochemický membránový test pro rychlou detekci thiabendazolu. Po optimalizaci konjugace protilátek s částicemi zlata a množství jednotlivých reaktantů v testu bylo dosaženo dobrých analytických parametrů při jeho aplikaci na roztok standardu thiabendazolu. Aby i pro terénní aplikaci testu byl naplněn požadavek na jednoduchost a rychlost detekce, byla ověřena možnost analyzovat vzorky potravin na bázi ovoce bez předchozí extrakční a čistící procedury. Sestavený test při analýze modelově kontaminovaných vzorků poskytl výsledky, které ukazují na jeho možné použití k terénní screeningové kontrole vzorků typu ovocných džusů a homogénátů ovoce po jejich pouhém nasečení.

LITERATURA

- Ullman E. F., Schwarzberg M., Rubenstein K. E.: *J. Biol. Chem.* 251, 4172 (1976).
- Blake C., Gould B. J.: *Analyst* 109, 533 (1984).
- Fukal L., Káš J., Paluska E.: *J. Chromatography* 285, 365 (1984).
- Worsfold P., Townshend A., Poole C. (ed.): *Encyclopedia of Analytical Science*, 2. vyd. Elsevier Ltd., Amsterdam 2005.
- Sádecká J., Labuda J., Uričková V.: *Chem. Listy* 106, 739 (2012).
- Ackerson C. J., Jadzinsky P. D., Jensen G. J., Kornberg R. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2635 (2006).
- Javůrková B., Blažková M., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 105, 193 (2011).
- Blažková M., Javůrková B., Fukal L., Rauch P.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 2828 (2011).
- Posthuma-Trumpie G. A., Korf J., Van Amerongen A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 569 (2009).
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce, souhrnné zprávy za r. 2008–2012, <http://www.szpi.gov.cz/lstDoc.aspx?nid=11386&cpi=1>, staženo 15.5.13.
- Stupák M., Kalachová K., Pulkrabová J., Hajšlová J.: *Chem. Listy* 106, S123 (2012).
- Křížová R., Urbanová J., Hajšlová J.: *Chem. Listy* 105, S33 (2011).
- Abad A., Manclús J. J., Moreno M. J., Montoya A.: *J. AOAC Int.* 84, 156 (2001).
- Blažková M., Rauch P., Fukal L.: *Biosens. Bioelectron.* 25, 2122 (2010).
- Estevez M. C., Belenguer J., Gomez-Montes S., Miralles J., Escuela A. M., Montoya A., Lechuga L. M.: *Analyst* 137, 5659 (2012).
- Karpinski K. F.: *Biometrics* 46, 381 (1990).
- Kaur K., Forrest J. A.: *Langmuir* 28, 2736 (2012).
- Zhao W., Brook M. A., Li Y.: *ChemBioChem* 9, 2363 (2008).
- Horisberger M., Rosset J.: *J. Histochem. Cytochem.* 25, 295 (1977).
- Geoghegan W. D.: *J. Histochem. Cytochem.* 36, 401 (1988).
- Volden S., Trinh L. T. T., Kjoniksen A. L., Yasuda M., Nystrom B., Glomm W.: *J. Phys. Chem.* 115, 11390 (2011).
- Thobhani S., Attree S., Boyd R., Kumaraswami N., Noble J., Szymanski M., Porter R. A.: *J. Immunol. Methods* 356, 60 (2010).
- Tippkoetter N., Stuckmann H., Kroll S., Winkelmann G., Noack U., Scheper T., Ulber R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 863 (2009).
- Guo Y. R., Liu S. Y., Gui W. J., Zhu G. N.: *Anal. Biochem.* 389, 32 (2009).
- Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Eremin S. A., Sveshnikov P. G., Dzantiev B. B.: *Anal. Chim. Acta* 701, 209 (2011).
- Hua X., Yang J., Wang L., Fang Q., Zhang G., Liu F.: *PLoS ONE* 7(12), e53099 (2012).
- Pease L. F., Elliott J. T., Tsai D. H., Zachariah M. R., Tarlov M. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 101, 1214 (2008).
- Lee K. B., Park S. J., Mirkin C. A., Smith J. C., Mrksich M.: *Science* 295, 1702 (2002).
- Tan Y. H., Liu M., Nolting B., Go J. G., Gervay-Hague J., Liu G. Y.: *ACS Nano* 2, 2374 (2008).
- Urusov A. E., Kostenko S. N., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B.: *J. Anal. Chem.* 66, 770 (2011).

S. Göselová, B. Holubová, M. Blažková, and L. Fukal (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Colloidal Gold-Based Lateral Flow Assay for The One-Step Rapid Detection of Thiabendazole**

A rapid strip test for semiquantitative or quantitative screening of thiabendazole in some fruit foods (fruits, fruit juices, baby foods) was developed, which is based on lateral flow immunoassay (LFIA). Test parameters such as membranes and buffers types, the amount and type of antibodies for labeling with gold nanoparticles, and dilution of gold-labeled antibodies and samples were optimized. The strip contains all the necessary reagents dried on membranes. The test can be accomplished within 10 min. The visual limit of detection was 2 ng ml^{-1} . For quantitative assessment a standard curve of LFIA was produced with detection limit of $0.1 \pm 0.02 \text{ ng ml}^{-1}$, the IC_{50} value of 2.2 ng ml^{-1} , and the linear working range of $0.4\text{--}20 \text{ ng ml}^{-1}$. In the test, spiked samples were analyzed. Samples of fruit juices or fruit homogenate filtrates were diluted with buffer and analysed directly without any purification. The coefficients of inter-assay variation were below 16 %, with recoveries ranging from 91 to 112 %. The proposed LFIA test enables a sensitive, rapid, and facile on-site screening of thiabendazole.

RYCHLÝ IMUNOANALYTICKÝ TEST PRO DETEKCI THIABENDAZOLU (2011)

DETAIL VÝSLEDKU	
Identifikační kód	RIV/60461373:22330/11:43892791
Název v původním jazyce	Rychlý imunoanalytický test pro detekci thiabendazolu
Název v českém jazyce	Rychlý imunoanalytický test pro detekci thiabendazolu
Druh	G - Technicky realizované výsledky (prototyp, funkční vzorek)
Poddruh	G/A - Prototyp
Jazyk	cze - čeština
Obor - skupina	E - Biovědy
Obor	EI - Biotechnologie a bionika
Rok uplatnění	2011
Kód důvěrnosti údajů	S - Není předmětem státního či obchodního tajemství a data lze v souladu s právními předpisy poskytnout do veřejně přístupných informačních systémů včetně mezinárodních
Počet výskytů výsledku	1
Počet tvůrců celkem	7
Počet domácích tvůrců	4
Výčet všech uvedených jednotlivých tvůrců	Barbora Haňková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 9689613) Martina Blažková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 6725759) Pavel Rauch (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 8065462) Ladislav Fukal (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 4819640) Alena Forejtová (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Kateřina Řeháková (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Heda Černožorská (státní příslušnost: CZ - Česká republika)
Popis výsledku v původním jazyce	Prototyp membránového testu pro detekci thiabendazolu pomocí kompetitivní imunoanalýzy za použití koloidního zlata. Test detekuje zvýšené množství thiabendazolu ve vzorcích ovocných džusů. Pomocí testu lze určit výsledek během 10 minut.
Klíčová slova oddělená středníkem	nanoparticles; immunochromatography; immunoassay; rapid detection; thiabendazole

ÚDAJE O VÝSLEDKU V ZÁVISLOSTI NA DRUHU VÝSLEDKU

Interní identifikační kód produktu přidělený tvůrcem	Rapid-VIDITEST thiabendazol
Číselná identifikace	-
Technické parametry	Základem testu je membrána s nanosenými imunoreagenciemi uzavřená v plastové kazetě. Systém je uspořádán jako tzv. nepřímý formát. Na membráně je v testovací lince imobilizován konjugát thiabendazolu s ovalbuminem. V kontrolní lince potom králíčí protilátka proti prasečím imunoglobulinům. V první části membrány je v podložce zasušeno konjugát prasečích anti-myších protilátek s barevnými nanočásticemi zlata a také monoklonální (myší) anti-thiabendazolová protilátka. Při aplikaci testu v analýze se přidá do okna kazety alikvot tekutého vzorku (extrakt), který při následném toku membránou rozpustí a unáší v podložce zasušené reagentie. V toku látek dochází k vzájemným interakcím a interakcím s testovací a kontrolní linií membrány. Uzavřena smlouva s VIDIA spol. s r.o., IČ 16556267, 1.9.2009
Ekonomické parametry	Zvýšení zisku pomocí rozšíření nabídky produktů.
Kategorie aplikovaného výsledku podle nákladů na jeho vytvoření	A - nižší nebo rovné 5 mil. Kč
IČ vlastníka výsledku	60461373
Název vlastníka	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha 6 + VIDIA spol. s r.o., Nad Safinou II č. 365, Vestec, 252 42 Jesenice u Prahy, IČ 16556267
Stát vlastníka	CZ - Česká republika
Druh možností využití	P - Nabytí licence je nutné v některých případech
Požadavek na licenční poplatek	Z - Při nabytí licence je poplatek vyžadován v některých případech
Adresa www stránky s výsledkem	-

INFORMACE O VŠECH VÝSKYTECH VÝSLEDKU V RÁMCI DETAILU VÝSLEDKUDodáno **MPO** v roce **2012**[RIV/60461373:22330/11:43892791](#) v [dodávce dat RIV12-MPO-22330 /01:1](#) předkladatelem **Vysoká škola chemicko-technologická v Praze / Fakulta potravinářské a biochemické technologie****ODKAZY NA VÝZKUMNÉ AKTIVITY, PŘI JEJICHŽ ŘEŠENÍ VÝSLEDEK VZNIKL**Projekt podporovaný **MPO** v programu **FR**[FR-TII/313 - Nové technologie pro diagnostiku vybraných polutantů v životním prostředí \(2009 - 2012\)](#)

Copyright © 2016 - 2017, Úřad vlády České republiky
Tisk 30.03.2017 22:20:06, IP: 83.208.244.108

Aktuální verze programu

RYCHLÝ IMUNOANALYTICKÝ TEST PRO DETEKCI KARBOFURANU (2011)

DETAIL VÝSLEDKU

Identifikační kód	RIV/60461373:22330/11:43892694
Název v původním jazyce	Rychlý imunoanalytický test pro detekci karbofuranu
Název v českém jazyce	Rychlý imunoanalytický test pro detekci karbofuranu
Druh	G - Technicky realizované výsledky (prototyp, funkční vzorek)
Poddruh	G/A - Prototyp
Jazyk	cze - čeština
Obor - skupina	E - Biovědy
Obor	EI - Biotechnologie a bionika
Rok uplatnění	2011
Kód důvěrnosti údajů	S - Není předmětem státního či obchodního tajemství a data lze v souladu s právními předpisy poskytnout do veřejně přístupných informačních systémů včetně mezinárodních
Počet výskytů výsledku	1
Počet tvůrců celkem	7
Počet domácích tvůrců	4
Výčet všech uvedených jednotlivých tvůrců	Martina Blažková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 6725759) Barbora Haňková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 9689613) Pavel Rauch (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 8065462) Ladislav Fukal (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 4819640) Juraj Lábaj (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Alena Forejťová (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Heda Černožorská (státní příslušnost: CZ - Česká republika)
Popis výsledku v původním jazyce	Prototyp membránového testu pro detekci karbofuranu pomocí kompetitivní imunoanalýzy za použití koloidního zlata. Test detekuje zvýšené množství karbofuranu ve vodních vzorcích z životního prostředí. Pomocí testu lze určit výsledek během 10 minut.
Klíčová slova oddělená středníkem	nanoparticles; immunoassay; rapid detection; carbofuran

ÚDAJE O VÝSLEDKU V ZÁVISLOSTI NA DRUHU VÝSLEDKU

Interní identifikační kód produktu přidělený tvůrcem	Rapid-VIDITEST karbofuran
Číselná identifikace	-
Technické parametry	Základem testu je membrána s nanosenými imunoreagenciemi uzavřená v plastové kazetě. Systém je uspořádán jako tzv. nepřímý formát. Na membráně je v testovací lince imobilizován konjugát karbofuranu s ovalbuminem. V kontrolní lince potom králíčí protilátka proti prasečím imunoglobulinům. V první části membrány je v podložce zasušen konjugát prasečích anti-myších protilátek s barevnými nanočásticemi zlata a také monoklonální (myší) anti-karbofuranová protilátka. Při aplikaci testu v analýze se přidá do okna kazety alikvot tekutého vzorku (extrakt), který při následném toku membránou rozpustí a unáší v podložce zasušené reagencie. V toku látek dochází k vzájemným interakcím a interakcím s testovací a kontrolní linií membrány. Vlastní provedení analýzy trvá 10 minut. Vyhodnocuje se finální přítomnost-nepřítomnost barevné linie v místě testovací a kontrolní linky. Detekční limit testu 0,5 ng/ml (pufr, voda). Uzavřena smlouva s VIDIA spol. s r.o., IČ 16556267, 1.9.2009
Ekonomické parametry	Zvýšení zisku pomocí rozšíření nabídky produktů
Kategorie aplikovaného výsledku podle nákladů na jeho vytvoření	A - nižší nebo rovné 5 mil. Kč
IČ vlastníka výsledku	60461373
Název vlastníka	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie + VIDIA spol. s r.o., Nad Safinou II č. 365, Vestec, 252 42 Jesenice u Prahy, IČ 16556267
Stát vlastníka	CZ - Česká republika
Druh možností využití	P - Nabytí licence je nutné v některých případech
Požadavek na licenční poplatek	Z - Při nabytí licence je poplatek vyžadován v některých případech
Adresa www stránky s výsledkem	-

INFORMACE O VŠECH VÝSKYTECH VÝSLEDKU V RÁMCI DETAILU VÝSLEDKUDodáno **MPO** v roce **2012**[RIV/60461373:22330/11:43892694 v dodávce dat RIV12-MPO-22330 /01:1](#) předkladatelem **Vysoká škola chemicko-technologická v Praze / Fakulta potravinářské a biochemické technologie****ODKAZY NA VÝZKUMNÉ AKTIVITY, PŘI JEJICHŽ ŘEŠENÍ VÝSLEDEK VZNIKL**Projekt podporovaný **MPO** v programu **FR**[FR-TII/313 - Nové technologie pro diagnostiku vybraných polutantů v životním prostředí \(2009 - 2012\)](#)

Copyright © 2016 - 2017, Úřad vlády České republiky
Tisk 30.03.2017 22:19:46, IP: 83.208.244.108

Aktuální verze programu

RYCHLÝ IMUNOANALYTICKÝ TEST PRO DETEKCI ATRAZINU (2011)

DETAIL VÝSLEDKU

Identifikační kód	RIV/60461373:22330/11:43892794
Název v původním jazyce	Rychlý imunoanalytický test pro detekci atrazinu
Název v českém jazyce	Rychlý imunoanalytický test pro detekci atrazinu
Druh	G - Technicky realizované výsledky (prototyp, funkční vzorek)
Poddruh	G/A - Prototyp
Jazyk	cze - čeština
Obor - skupina	E - Biovědy
Obor	EI - Biotechnologie a bionika
Rok uplatnění	2011
Kód důvěrnosti údajů	S - Není předmětem státního či obchodního tajemství a data lze v souladu s právními předpisy poskytnout do veřejně přístupných informačních systémů včetně mezinárodních
Počet výskytů výsledku	1
Počet tvůrců celkem	7
Počet domácích tvůrců	4
Výčet všech uvedených jednotlivých tvůrců	Barbora Haňková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 9689613) Martina Blažková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 6725759) Pavel Rauch (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 8065462) Ladislav Fukal (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 4819640) Kateřina Řeháková (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Alena Forejťová (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Heda Černožorská (státní příslušnost: CZ - Česká republika)
Popis výsledku v původním jazyce	Prototyp membránového testu pro detekci atrazinu pomocí kompetitivní imunoanalýzy za použití koloidního zlata. Test detekuje zvýšené množství atrazinu ve vodních vzorcích z životního prostředí. Pomocí testu lze určit výsledek během 10 minut.
Klíčová slova oddělená středníkem	nanoparticles; immunochromatography; immunoassay; rapid detection; atrazine

ÚDAJE O VÝSLEDKU V ZÁVISLOSTI NA DRUHU VÝSLEDKU

Interní identifikační kód produktu přidělený tvůrcem	Rapid-VIDITEST atrazin
Číselná identifikace	-
Technické parametry	Základem testu je membrána s nanosenými imunoreagenciemi uzavřená v plastové kazetě. Systém je uspořádán jako tzv. přímý formát. Na membráně je v testovací lince imobilizován konjugát atrazinu s hovězím sérovým albuminem. V kontrolní lince potom kozí anti-králičí protilátka. Na králičí polyklonální anti-atrazinovou protilátku jsou navázány barevné nanočástice zlata a tento konjugát je zasušen na podložce v první části membrány. Při aplikaci testu v analýze se přidá do okna kazety alikvot tekutého vzorku(extrakt), který při následném toku membránou rozpustí a unáší v podložce zasušené reagentie. V toku látek dochází k vzájemným interakcím a interakcím s testovací a kontrolní linií membrány. Uzavřena smlouva s VIDIA spol. s r.o., IČ 16556267, 1.9.2009
Ekonomické parametry	Zvýšení zisku pomocí rozšíření nabídky produktů
Kategorie aplikovaného výsledku podle nákladů na jeho vytvoření	A - nižší nebo rovné 5 mil. Kč
IČ vlastníka výsledku	60461373
Název vlastníka	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha 6 + VIDIA spol. s r.o., Nad Safinou II č. 365, Vestec, 252 42 Jesenice u Prahy, IČ 16556267
Stát vlastníka	CZ - Česká republika
Druh možností využití	P - Nabytí licence je nutné v některých případech
Požadavek na licenční poplatek	Z - Při nabytí licence je poplatek vyžadován v některých případech
Adresa www stránky s výsledkem	-

INFORMACE O VŠECH VÝSKYTECH VÝSLEDKU V RÁMCI DETAILU VÝSLEDKU

Dodáno **MPO** v roce **2012**[RIV/60461373:22330/11:43892794](#) v dodávce dat RIV12-MPO-22330 /01:1 předkladatelem **Vysoká škola chemicko-technologická v Praze / Fakulta potravinářské a biochemické technologie**

ODKAZY NA VÝZKUMNÉ AKTIVITY, PŘI JEJICHŽ ŘEŠENÍ VÝSLEDEK VZNIKL

Projekt podporovaný **MPO** v programu **FR**[FR-TII/313 - Nové technologie pro diagnostiku vybraných polutantů v životním prostředí \(2009 - 2012\)](#)

Copyright © 2016 - 2017, Úřad vlády České republiky
Tisk 30.03.2017 22:19:27, IP: 83.208.244.108

Aktuální verze programu

REJSTŘÍK INFORMACÍ O VÝSLEDČÍCH

Jednoduché vyhledávání

Rozšířené vyhledávání

Modul RIV je v testovacím provozu

LFIA SOUPRAVA PRO STANOVENÍ ATRAZINU VE VODNÍCH VZORCÍCH (2012)

DETAIL VÝSLEDKU

Identifikační kód	RIV/16556267:_____/12:#0000143
Název v původním jazyce	LFIA souprava pro stanovení atrazinu ve vodních vzorcích
Název v českém jazyce	LFIA souprava pro stanovení atrazinu ve vodních vzorcích
Druh	G - Technicky realizované výsledky (prototyp, funkční vzorek)
Poddruh	G/B - Funkční vzorek
Jazyk	cze - čeština
Obor - skupina	D - Vědy o zemi
Obor	DJ - Znečištění a kontrola vody
Rok uplatnění	2012
Kód důvěrnosti údajů	C - Předmět obchodního tajemství podle par.17-20 obch.zákoníku, název, anotace, příp. zhodnocení výsledků řešení dodané do IS VaV jsou upraveny tak, aby byly zveřejnitelné
Počet výskytů výsledku	2
Počet tvůrců celkem	7
Počet domácích tvůrců	4
Výčet všech uvedených jednotlivých tvůrců	Alena Forejtová (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 9576665) Michaela Poláková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 1020781) Heda Černohorská (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 2750147) Katerina Řeháková (státní příslušnost: CZ - Česká republika, domácí tvůrce: A, vedidk: 8292612) Pavel Rauch (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Ladislav Fukal (státní příslušnost: CZ - Česká republika) Martina Blažková (státní příslušnost: CZ - Česká republika)
Popis výsledku v původním jazyce	Test se skládá z několika komponent. Obsahuje nitrocelulosoou membránu s nanesenými imunoreagenciemi, podložku pro konjugát, celulosovou podložku pro vzorek, absorpční celulosovou podložku a vše je uzavřeno v plastovém obalu.
Klíčová slova oddělená středníkem	atrazin

ÚDAJE O VÝSLEDKU V ZÁVISLOSTI NA DRUHU VÝSLEDKU

Interní identifikační kód produktu přidělený tvůrcem	LFIA-VIDITEST Atrazin
Číselná identifikace	-
Technické parametry	Detekční limit soupravy je 0,1 ng/ml. souprava byla předána do výroby ve společnosti VIDIA, podle interního předpisu VP021; osoba odpovědná: Ing. Michaela Poláková, VIDIA spol. s r.o., tel: 261090262, polakova@vidia.cz
Ekonomické parametry	export, nové trhy
Kategorie aplikovaného výsledku podle nákladů na jeho vytvoření	A - nižší nebo rovné 5 mil. Kč
IČ vlastníka výsledku	16556267
Název vlastníka	VIDIA spol. s r.o.
Stát vlastníka	CZ - Česká republika
Druh možnosti využití	N - Nabytí licence není nutné (výsledek není licencován)
Požadavek na licenční poplatek	-
Adresa www stránky s výsledkem	-

INFORMACE O VŠECH VÝSKYTECH VÝSLEDKU V RÁMCI DETAILU VÝSLEDKU

Dodáno MPO v roce 2013	RIV/16556267:_____/12:#0000143 v dodávce dat RIV13-MPO-16556267/01:1 předkladatelem VIDIA spol. s r.o.
Dodáno MPO v roce 2014	RIV/60461373:22330/12:43896728 v dodávce dat RIV14-MPO-22330 /01:1 předkladatelem Vysoká škola chemicko-technologická v Praze / Fakulta potravinářské a biochemické technologie

ODKAZY NA VÝZKUMNÉ AKTIVITY, PŘI JEJICHŽ ŘEŠENÍ VÝSLEDEK VZNIKL

Projekt podporovaný MPO v programu FR

[FR-TI1/313 - Nové technologie pro diagnostiku vybraných polutantů v životním prostředí \(2009 - 2012\)](#)

Copyright © 2016 - 2017, Úřad vlády České republiky
Tisk 30.03.2017 22:07:10, IP: 83.208.244.108

Aktuální verze programu