UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:
37 366
(13) Druh dokumentu: **U1**
(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6888	(2018.01)
C12Q 1/06	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41212**
(22) Přihlášeno: **14.11.2022**
(47) Zapsáno: **17.10.2023**

(73) Majitel:
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, České Budějovice 2, CZ

(72) Původce:
Sanjay Kumar, České Budějovice, České Budějovice 2, CZ
Mgr. Hana Mašková, Litvínovice, CZ
doc. RNDr. Vítězslav Straňák, Ph.D., České Budějovice, České Budějovice 2, CZ
RNDr. Ján Štěrba, Ph.D., Dubné, CZ
RNDr. Ryan Oliver Marino Rego, Ph.D., Dubné, CZ

(74) Zástupce:
artpatent, advokátní kancelář s.r.o., Dukelských hrdinů 976/12, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:
Detektor pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů

CZ 37366 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Detektor pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů

Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti detekce patogenů bakteriálního nebo virového původu, konkrétně detektoru pro detekci těchto patogenů.

Dosavadní stav techniky

V posledních letech je detekce patogenů intenzivně zkoumána z hlediska snahy o nalezení rychlejších, levnějších a jednoduše proveditelných testů. Pro účinnou léčbu je obvykle potřeba rychlé a včasné diagnózy, kdy detekce patogenů již v ranném stádiu onemocnění osob či zvířat hraje zásadní roli. Je totiž obvyklou praxí, že po iniciační fázi onemocnění dochází k propuknutí infekce, které se může rozvinout v dlouhodobě přetrvávající a/nebo opakující se infekci s fázemi akutního onemocnění. Současná diagnostika je založena především na molekulárně biologických nebo sérologických technikách, které často disponují relativně pomalou odezvou. Tato skutečnost je obzvláště důležitá u nemocí přenášených klíšťaty, např. u boreliózy.

Detekce polymerázovou řetězovou reakcí neboli PCR umožňuje detekci patogenů z infikovaných přenašečů jako jsou klíšťata odebraná z pacienta, nebo z krve pacienta. Složky krve však mohou PCR reakci inhibovat a negativní výsledky je proto potřebné verifikovat, čímž dochází ke zpoždění včasné detekce; současně je výskyt patogenu v krvi v měřitelné oblasti detekovatelný pouze v omezeném časovém úseku tzv. bakteriémie, resp. virémie. Přímá detekce patogenů v infikovaných přenašečích sama o sobě sice může posloužit pro včasnou antibiotickou léčbu, ale již není schopna rozlišit potenciál spirochét infikovat pacienta, zejména pak ve velmi raných stadiích infekce. Z tohoto důvodu nebývá důvodem pro okamžité zahájení antibiotické léčby a slouží spíše jako indikátor pro další a pozdější vyšetření, které mnohdy probíhá již v době masivně rozvinuté infekce. Další nevýhodou PCR techniky je potřeba ověření výsledků, protože složky krve mohou inhibovat PCR reakci a tím zapříčit negativní výsledek, stejně jako relativně dlouhý a komplikovaný proces detekce, a nezbytnost ekonomicky náročné techniky se zahrnutím nákladů na spotřební materiál.

Další využívanou technikou je ELISA (z angl. „*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*“). Jedná se o imuno-enzymatickou metodu založenou na interakci antigenu diagnostikovaného patogenu a specifické protilátky čímž vzniká imunokomplex antigen-protilátka. V této technice se uplatňuje navázání specifické protilátky na povrch jamky v mikrotitrační destičce, na kterou se následně imobilizuje antigen patogenu. Na něj se posléze naváže enzymově označená protilátka přidaná v dalším kroku analýzy. Tato protilátka je též specifická pro konkrétní antigen. V dalším kroku je do reakční směsi přidán substrát, který je za pomoci enzymově označené protilátky, přeměněn na barevný produkt. Výsledné zabarvení konečného produktu se stanovuje spektrofotometricky a je přímo úměrné koncentraci antigenu ve vzorku. Nevýhodou této techniky je potřeba množství vybavení, relativně vysoká koncentrace patogenu a zdlouhavý proces detekce.

Další možnou technikou je izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou neboli LAMP (z angl. „*loop mediated isothermal amplification*“). Tato technika slouží k detekci patogenní DNA nebo RNA a lze ji tedy použít k určení přítomnosti patogenů jako jsou viry a bakterie v živočišných tkáních nebo i rostlinných pletivech. Jedná se o metodu relativně levnou a prováděnou v jedné mikrozkumavce. Primárně tato technika pracuje s DNA, ale může být kombinována i s reverzní transkripcí, a tak mohou být detekovány i RNA patogeny. Nevýhodou této techniky je však vysoká koncentrace nukleové kyseliny potřebná k detekci patogenů jako i potřeba kitu k provedení detekce.

Tato nevýhoda byla částečně odstraněna v dokumentu US 2007/196233, který popisuje biosensor tvořený pevným substrátem, na kterém je navázán polymer mající primární nebo sekundární

aminoskupinu na kterou může být imobilizována fyziologicky aktivní látka. Mezi těmito vrstvami je umístěná kovová vrstva neboli film z materiálu na bázi stříbra, zlata, mědi, platiny a/nebo hliníku. Detekce probíhá pomocí SPR neboli povrchovou plazmonovou rezonancí. Nevýhodou popsaného řešení je, že funkčnost nanočástic uložených v povrchu je výrazně snížena vytvořením filmu, takže takto připravené biosensory vykazují menší aktivitu či rozlišení jako senzory nebo antibakteriální povlaky.

Dosud známý je LSPR aktivní povrch tvořen nanokompozitem detekční vícevrstvé struktury uspořádané na substrátu, který je možno použít jako aktivní vrstvu LSPR detektoru. Detekční vícevrstvá struktura je tvořena matricí z plazma polymerní vrstvy z nylonu 6.6 s inkorporovanými nanočásticemi stříbra, které jsou rozmístěné izolovaně se vzájemnými odstupy, s plošným pokrytím větším než 50 % na povrchu plazma polymerní vrstvy. Tyto nanočástice stříbra vykazují lokalizovanou povrchovou plazmonovou rezonanci díky jejich interakci se zářením dopadajícím na jejich povrch. Takové řešení je popsáno i v dokumentu Sanjay Kumar et al., Ag nanoparticles immobilized on C:H:N:O plazma polymer films by elevated temperature for LSPR sensing, Plasma Processes and Polymers, 2/2022, vol. 19, no. 2, p. 1–12, nebo v dokumentu Sanjay Kumar et al., Surface anchored Ag nanoparticles prepared by gas aggregation source: Antibacterial effect and the role of surface free energy, Surfaces and Interfaces, 2022-02-19, vol. 30, p. 1–11). Výše uvedené nanokompozitní detekční vícevrstvé struktury vykazují mechanickou a chemickou stabilitu, která byla experimentálně ověřena. Nevýhodou takové LSPR senzitivní struktury je, že nevykazuje vlastnosti pro selektivní a definovanou detekci konkrétních molekul a/nebo patogenů jako jsou viry, bakterie, houby nebo prvoci. Popsaná LSPR nanokompozitní detekční vícevrstvá struktura je pouze schopna modulovat LSPR absorpci, ke které dochází na základě změny fyzikálních vlastností, jako je index lomu či dielektrická konstanta v bezprostředním okolí povrchu, bez schopnosti určit příčinu změny která modulaci vyvolala.

Úkolem technického řešení je proto vytvoření LSPR detektoru pro selektivní a definovanou, rychlou a snadnou detekci bakteriálních nebo virových patogenů skrze jejich specifické povrchové molekuly, přičemž by byl schopný relativně rychlé detekce vybraného patogenu při jeho malé koncentraci, která je typická zejména v prvotní fázi po nakažení osob či zvířat.

Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen pomocí detektoru pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů podle tohoto technického řešení, zahrnujícího substrát a detekční vícevrstvou strukturu uspořádanou na pevném substrátu. Detekční vícevrstvá struktura zahrnuje první plazma polymerní vrstvu tvořenou nylonem 6.6 (C:H:N:O), která slouží k ukotvení nanočástic stříbra, a druhou plazma polymerní vrstvu tvořenou nylonem 6.6 obsahujícím reaktivní -NH_2 skupiny. Detekční vícevrstvá struktura dále zahrnuje nanočástice stříbra uspořádané mezi první plazma polymerní vrstvou a druhou plazma polymerní vrstvou, přičemž tyto nanočástice stříbra jsou rozmístěné izolovaně se vzájemnými odstupy, s plošným pokrytím větším než 50 %, s výhodou 65 % vzájemně přilehlých povrchů první plazma polymerní vrstvy a druhé plazma polymerní vrstvy. Podstata technického řešení spočívá v tom, že detekční vícevrstvá struktura dále zahrnuje alespoň jednu protilátku pro specifické navázání alespoň jednoho patogenu bakteriálního nebo virového původu. Tato protilátka je uspořádaná na volném povrchu druhé plazma polymerní vrstvy C:H:N:O a je navázaná pevnou nepolární vazbou na reaktivní -NH_2 skupiny druhé plazma polymerní vrstvy, přičemž tloušťka druhé plazma polymerní vrstvy je do 15 nm, kdy nedochází k výraznému zeslabení LSPR efektu. Takové uspořádání je výhodné, protože umožňuje rychlou a snadnou detekci patogenů již v malé koncentraci vzhledem k plazmonicky aktivním nanočásticím stříbra, u kterých dochází k lokalizované povrchové plazmonové rezonanci neboli LSPR, a tedy k rezonančnímu zesílení elektrického pole v blízkém okolí nanočástice projevující se modulací absorpčního píku v optickém spektru, který je způsoben změnou optických a elektrických vlastností v bezprostředním okolí nanočástice z plazmonického materiálu. Změny optických a elektrických vlastností jsou způsobeny navázáním patogenů na povrch skrze vhodně zvolenou protilátku, kde modulace LSPR absorpčního

spektra představuje způsob detekce navázaných patogenů, čím zároveň potvrzuje přítomnost patogenů ve vyšetřovaném analytu. Dále takové řešení nezeslabí LSPR efekt detektoru díky tloušťce druhé plazma polymerní vrstvy do 15 nm a zároveň je vytvořen aktivní povrch nasycený reaktivní -NH_2 skupiny, které slouží pro následné kovalentní navázání protilátek schopných imobilizovat patogeny na povrchu detektoru.

Ve výhodném provedení protilátka na volném povrchu druhé plazma polymerní vrstvy, kde je navázaná pevnou nepolární vazbou na reaktivní -NH_2 skupiny je protilátkou specificky rozeznávající povrchový antigen bakterie *Borrelia burgdorferi.*

V dalším výhodném provedení mají nanočástice stříbra velikostní rozdělení odpovídající přibližně Gaussovu rozdělení se střední hodnotou průměru nanočástice stříbra 30 nm. Taková velikost nanočástic stříbra je výhodná vzhledem k tomu, že splňuje podmínky plazmonicky aktivních nanočástic, kdy jejich rozměr je menší než vlnová délka dopadajícího záření. Dále je tato velikost výhodná v poměru k druhé plazma polymerní vrstvě tak, aby byl posun LSPR píku nanočástic po ukotvení druhé plazma polymerní vrstvy na nanočástice stříbra co nejmenší.

Výhody detektoru pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že umožňuje jednoduchou, rychlou a snadnou detekci patogenů z řady viru a bakterií, a to s dosažením vysoké specificity dosažené výběrem specifické protilátky a vyblokováním volných skupin na povrchu, a vysokou citlivostí umožňující detekci již malé koncentrace patogenů, tj. počáteční stadium infekce u osob či zvířat. Takový způsob detekce umožňuje také rozlišování variant patogenů, jejich rezistentních forem, popřípadě přítomnost vícero patogenů v jednom vzorku, přičemž tato možnost je limitována pouze dostupností specifických protilátek.

Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

obr. 1 zobrazuje schématické uspořádání detektoru, (a) substrát, na kterém je nanesená první plazma polymerní vrstva s deponovanými nanočásticemi stříbra tvořící povrch Ag/C:H:N:O, (b) nanesení druhé plazma polymerní vrstvy na povrch Ag/C:H:N:O zobrazený na (a), (c) struktura detektoru tvořeného Ag/C:H:N:O, s nanesenou 10 nm vrstvou druhé plazma polymerní vrstvy neboli C:H:N:O-Ag/C:H:N:O s imobilizovanými specifickými protilátkami na povrchu druhé plazma polymerní vrstvy, (d) detektor s imobilizovanými patogeny,

obr. 2 zobrazuje grafy modulaci LSPR píku způsobené (a) nanášením deponovaných nanočástic stříbra na povrch první plazma polymerní vrstvy, (b) nanášením druhé vrstvy C:H:N:O, (c) imobilizaci protilátky, (d) navázaní patogenů borelií skrze specifickou protilátku,

obr. 3 zobrazuje graf modulace LSPR píku jako odpověď na detekci lyzátu patogenu a patogenu boreliózy měřené pomocí UV-VIS spektrometru,

obr. 4 zobrazuje graf citlivosti detektoru na základě modulace naměřených LSPR absorpční křivek pro různé počty Borelií burgdorferi v rozsahu 10 až 10 000 na ploše detektoru 0,785 cm^2,

obr. 5 zobrazuje posuv $\Delta \lambda_{LSPR}$ směrem k červené části spektra způsobený navázáním Borelií burgdorferi při jejich různém počtu 10 až 10 000 na ploše 0,785 cm^2.

Příklady uskutečnění technického řešení

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní případy uskutečnění technického řešení jsou představovány pro ilustraci, nikoliv jako omezení technického řešení na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním technického řešení, která jsou zde popsána. Jedná se zejména o výčet patogenů virového nebo bakteriálního původu detekovatelné použitím detektoru podle tohoto technického řešení.

Příklad 1: Stavba detektoru pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů

Detektor 1 pro detekci patogenů je tvořen detekční vícevrstvou strukturou 3 uspořádanou na substrátu 2 v podobě skla. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je substrátem 2 PET podložka, sklolaminát, PVC podložka, nebo podložka z jiného komerčně dostupného polymeru. Detekční vícevrstvá struktura 3 je tvořena první plazma polymerní vrstvou 4 a druhou plazma polymerní vrstvou 4‘, přičemž mezi nimi jsou deponované nanočástice 5 stříbra z plynně agregačního zdroje. Detekční vícevrstvá struktura 3 je dále tvořena protilátkami 6 proti viru *Borrelia burgdorferi*, které jsou uspořádané na volném povrchu druhé plazma polymerní vrstvy 4‘, která přirozeně vytváří otevřené -NH_2 vazby. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je na volném povrchu druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ uspořádaná alespoň jedna jiná protilátka 6 alespoň jednoho patogenu bakteriálního nebo virového původu. Detektor 1 je tvořen nanesením tenké vrstvy první plazma polymerní vrstvy 4 na substrát 2. První plazma polymerní vrstva 4 je tvořena nylonem 6.6. Na tuto první plazma polymerní vrstvu 4 jsou deponovány nanočástice 5 stříbra s velikostním rozdělením odpovídajícím Gaussovu rozdělení se střední hodnotou průměru 20 nm. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění mají nanočástice 5 stříbra s velikostním rozdělením odpovídajícím Gaussovu rozdělení se střední hodnotou průměru do 30 nm. Nanočástice 5 stříbra jsou na povrchu první plazma polymerní vrstvy 4 rozmístěné izolovaně se vzájemnými odstupy, s plošným pokrytím 65 % přilehlých povrchů první plazma polymerní vrstvy 4 a druhé plazma polymerní vrstvy 4‘. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění jsou nanočástice 5 stříbra rozmístěné izolovaně se vzájemnými odstupy, s plošným pokrytím větším než 50 % přilehlých povrchů první plazma polymerní vrstvy 4 a druhé plazma polymerní vrstvy 4‘. Na nanočásticích 5 stříbra je nanesena vrstva druhé plazma polymerní vrstvy 4‘, které tloušťka je 10 nm. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je tloušťka druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ do 15 nm. Tato druhá plazma polymerní vrstva 4‘ je tvořena nylonem 6.6 obsahujícím reaktivní -NH_2 skupiny. První plazma polymerní vrstva 4 a druhá plazma polymerní vrstva 4‘ jsou připravené magnetronovým naprašováním z terče z nylonu 6.6 v reaktivní atmosféře Ar/N_2 = 75/25 pro vytvoření C:H:N:O povrchu obsahujícího reaktivní -NH_2 skupiny.

Na reaktivní -NH_2 skupiny druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ se pevnou nepolární vazbou vážou protilátky 6. Po navázaní protilátek 6 se povrch druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ s protilátkami 6 promyje tris-pufrem TBS-T a takto připravená detekční vícevrstvá struktura 3 se vloží do blokovacího roztoku tvořeného 0,15 M glycinu v TBS-T pro odmytí nenavázaných protilátek 6 a blokaci volných reaktivních -NH_2 skupin na volném povrchu druhé plazma polymerní vrstvy 4‘.

Příklad 2: Nanesení protilátek na detekční vícevrstvou strukturu

Nanesení protilátek 6 a druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ na detekční vícevrstvou strukturu 3, tvořenou první plazma polymerní vrstvou 4 a nanočásticemi 5 stříbra neboli Ag/C:H:N:O je zásadní pro imobilizaci neboli záchyt patogenů Lymské boreliózy a jiných patogenů na detekční vícevrstvé struktuře 3. Patogeny imobilizované na detekční vícevrstvé struktuře 3, mění optické a elektrické vlastnosti prostředí v blízkém okolí detekční vícevrstvé struktury 3, což má za následek modulaci LSPR absorpčního píku. Modulací se obecně rozumí změna tvaru LSPR křivky, kdy pro detekční účely je využíván zejména její spektrální posuv. Nanesení protilátek 6 a druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ na detekční vícevrstvou strukturu 3 byla provedena ve dvou krocích, které jsou znázorněny na obr. 1. Substrátem 2 byla skleněná podložka, aby mohlo být provedeno transmisní měření

absorpce dopadajícího záření pomocí UV-VIS spektrometrie s využitím standardního UV-VIS spektrometru.

První krok představuje nanesení druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ na povrch Ag/C:H:N:O jak je znázorněno na obr. 1b). Pro nanášení druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ je využito magnetronového naprašovaní terče z nylonu 6.6 v RF výboji při výkonu 40 W, při RF frekvencí 13,56 MHz. Nylon 6.6 je naprašován v reaktivní směsi Ar/N_2 = 75/25. Tyto podmínky výrazně neovlivní geometrii a morfologii deponovaného Ag/C:H:N:O, nezeslabí se LSPR efekt detekční vícevrstvé struktury 3, čehož je dosaženo malou tloušťkou nanesené druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ a vytvoří se tak aktivní povrch detekční vícevrstvé struktury 3 s reaktivními -NH_2 skupinami, které slouží pro následné navázání protilátek schopných imobilizovat spirochéty boreliózy a další patogeny. Obr. 2b) zároveň ukazuje modulaci LSPR absorpční křivky měřenou pomocí UV-VIS spektrometru, kdy došlo k posunu $\Delta\lambda$ absorpčního maxima po nanesení druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ na povrch Ag/C:H:N:O, což způsobilo posun LSPR absorpčního píku. Důležitou skutečností je, že i přes výraznější LSPR posun zůstává povrch i nadále LSPR aktivní, tzn. je schopen další LSPR odezvy v případě změny prostředí v jeho bezprostřední blízkosti.

Ve druhém kroku se na Ag/C:H:N:O, s nanesenou 10 nm vrstvou druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ neboli C:H:N:O-Ag/C:H:N:O imobilizují specifické protilátky 6 skrze otevřené -NH_2 vazby na povrchu druhé plazma polymerní vrstvy 4‘, zobrazeno na obr. 1c). Na povrch promytého C:H:N:O-Ag/C:H:N:O byla imobilizována protilátka 6 typu goat-anti-rabbit HRP po dobu 1 hodiny. Po odmytí zbytku nenavázaných protilátek 6 roztokem TBS-T s obsahem 0,05 % Tween-20 byla provedena blokace volných reaktivních -NH_2 skupin pomocí 0,15 M glycinu v TBS-T pufru. Tímto způsobem byl připraven stabilní detektor 1, schopný navazovat a selektivně imobilizovat skupinu biokomplexů schopných reagovat s protilátkou 6 jako jsou patogeny. Výsledný detektor 1 je zobrazen na obr. 1c), přičemž na obr. 1d) je zobrazen detektor 1 již s imobilizovanými patogeny. Obr. 2c) zobrazuje LSPR absorpční křivku měřenou pomocí UV-VIS spektrometru výsledného detektoru 1. Z obrázku je zřejmé že zvolené protilátky 6 díky svému malému rozměru, přibližně 10 nm, nezpůsobují výraznou modulaci absorpční křivky. Průběh LSPR absorpční křivky je téměř identický s LSPR absorpční křivkou měřenou pro C:H:N:O-Ag/C:H:N:O.

Funkce připraveného detektoru 1 byla ověřena navázáním testovací polyklonální protilátky, zobrazeno na obr. 1d). Tato polyklonální protilátka je vázaná na povrch detektoru 1 obsahujícího protilátku 6 goat-anti rabbit HRP, přičemž polyklonální protilátka způsobila výraznou modulaci a posun LSPR píku. Byla pozorována výraznější změna LSPR signálu oproti vazbě primární protilátky 6 způsobená vazbou většího, dvojnásobného množství detekované protilátky. Naměřený posuv LSPR píku a výrazná modulace LSPR křivky je pro následné využití senzorické struktury zásadní a potvrzuje přítomnost detekované látky. Posun a modulace LSPR křivky slouží jako detekční signál, který může být následně zpracován např. digitální cestou. Měřený posun $\Delta\lambda$ LSPR píku je výrazný, a tudíž snadno detekovatelný standardními technikami měření transmise pomocí UV-VIS. Další podstatnou skutečností je, že detekční vícevrstvá struktura 3 představuje aktivní člen detektoru 1 s velmi širokým spektrem detekce: povrch C:H:N:O-Ag/C:H:N:O disponuje reaktivními -NH_2 skupinami, což umožňuje výběr ze širokého spektra protilátek 6 pro detekci vybraných skupin patogenů virového nebo bakteriálního původu. Lze tak připravit vysoce specifický detektor 1 schopný detekovat konkrétní a požadovaný cílový komplex podle potřeby.

Příklad 3: Způsob detekce patogenů

Způsob detekce tkví v přípravě detektoru 1 s aktivními protilátkami schopnými specificky vázat neboli imobilizovat detekované komplexy patogenů. Tato skutečnost, spolu s velmi jednoduchým způsobem nanášení protilátky 6, jako je ponoření do roztoku s vhodnou protilátkou 6, výrazně zvyšuje univerzálnost navrhovaného detektoru 1 spolu s ekonomickou nenáročností.

V tomto příkladě uskutečnění byl detektor 1 opatřen protilátkami 6 pro detekci borelií kultury *Borrelia afzelii* kmene CB43. Kultura *B. afzelii*, byla inokulována do 8 ml sterilního kompletního

média BSK-H ze zmrazené glycerolové zásoby. Zkumavka s médiem byla kultivována při teplotě 34 °C až do dosažení přibližné koncentrace 5×10^7 ml borelií. Tyto borelie byly použity buď na přípravu proteinového lyzátu nebo byly pro detekci využity živé borelie po jejich vhodném naředění na detekovanou koncentraci. Borelie byly lyzovány pomocí 4 % SDS v TBS po dobu 15 minut s následnou 30minutovou sonikací a lyzát byl použit pro detekci proteinů borelií pomocí LSPR. Kultura borelií CB43 byla centrifugována při 8 000×g po dobu 10 minut, promyta TBS, resuspendována v TBS a $2{,}7\times10^7$ borelií na vzorek bylo použito pro první detekci živých borelií pomocí LSPR UV-VIS spektroskopie detektoru 1 popsaného výše.

Obr. 3 ukazuje LSPR odezvu detektoru 1, zejména pak posuvu LSPR píku $\Delta\lambda$ způsobené změnami na povrchu detekční vícevrstvé struktury 3, jako je navazovaní primární protilátky 6 specifické vůči povrchovému proteinu borelií DbpA, a následně lyzátu borelií a/nebo živých borelií. LSPR absorpční spektrum deponovaného Ag/C:H:N:O je zobrazeno na obr. 3 s maximem absorpčního píku $\lambda_1 = 363{,}62$ nm. V dalším kroku byla nanesena 10 nm vrstva druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ za účelem vytvoření reaktivních -NH_2 skupin a následnou imobilizací primární protilátky 6. Pro detekci lyzátu a živých borelií byla použita primární anti-DbpA protilátka (1:200 v PBS-T; vlastní produkce). Po imobilizaci protilátek byl povrch detekční vícevrstvé struktury 3 ve třech cyklech promytý TBS-T a na 30 minut vložen do blokovacího roztoku tvořeného 0,15 M glycin v TBS-T. Tento postup zajistil blokaci volných funkčních skupin na povrchu detekční vícevrstvé struktury 3 a zajistil specifickou vazbu skrze vybrané a vhodně zvolené protilátky 6, tj. snížil falešnou pozitivitu testu navázáním jiných než detekovaných biokomplexů. Takto funkcionalizovaný povrch je připraven pro detekci borelií a jeho LSPR absorpční křivka je charakterizována píkem $\lambda_2 = 411{,}52$ nm. Posun LSPR spektra a zvýšení relativní absorpce je způsobeno přítomností funkcionalizačních činitelů, tj. vrstvy C:H:N:O a primární protilátky 6. Takto připravený detektor 1 je připraven k detekci vybraných biokomplexů podle zvolené primární protilátky 6 imobilizované na povrchu detekční vícevrstvé struktury 3. Způsobený LSPR posuv $\Delta\lambda = 47{,}9$ nm není zásadní a je způsoben nanesením druhé plazma polymerní vrstvy 4‘ o tloušťce 10 nm na Ag/C:H:N:O.

V dalším kroku byla provedena detekce lyzátu borelií, tj. detekce vazby jednotlivých DbpA proteinů borelií; jejich navázáni na protilátky 6 způsobilo optickou a elektrickou změnu prostředí což vyvolalo posun absorpčního píku na $\lambda_3 = 422{,}87$ nm a zvýšení absorpce. Důležité je, že navázání proteinů z lyzátu způsobilo posuv $\Delta\lambda_{2\text{-}3} = 11{,}35$ nm, což je hodnota velmi snadno detekovatelná běžnými UV-VIS spektrometry. Stejný povrch detekční vícevrstvé struktury 3 byl využit pro detekci živých borelií, které byly imobilizovány k povrchu pomocí primárních protilátek 6, v tomto případě se tedy skrz povrchový protein DbpA vázaly na povrch celé bakteriální buňky. Došlo k výrazné modulaci LSPR spektra s absorpčním maximem $\lambda_4 = 434{,}72$ nm, což představuje LSPR posuv píku $\Delta\lambda_{2\text{-}4} = 23{,}2$ nm. Tato hodnota velkého LSPR posuvu ukazuje na vysokou citlivost detekčního systému. Výraznější posuv LSPR píku způsobený živými boreliemi ve srovnání s detekovaným lyzátem je způsoben výrazně větším rozměrem borelií oproti jednotlivým proteinům. Pro tyto experimenty ověřující detekci bylo použito koncentrace $2{,}7\times10^7$ borelií na vzorek, který byl inokulován na detekční plochu 0,785 cm^2.

Dále byla otestována citlivost detekční vícevrstvé struktury 3 v závislosti na koncentraci přítomných živých borelií v médiu. Detekční testy byly provedeny s desítkovým ředěním počtu borelií v médiu s počtem 10 000 až 10 borelií. V tomto případě byla aktivní plocha detektoru 1 0,785 cm^2. Jednalo se o kruhový skleněný detektor 1 o průměru 10 mm. Tato aktivní plocha byla rovnoměrně inokulována médiem s různým množstvím borelií. Naměřené LSPR absorpční křivky jsou zobrazeny na obr. 4. Křivka s nejnižší absorpcí reprezentuje Ag/C:H:N:O s absorpčním píkem $\lambda_A = 406{,}07$ nm. Pro nejvyšší počet 10 000 borelií byla naměřena LSPR absorpční křivka s maximem $\lambda_{10000} = 420{,}74$ nm, což představuje posun LPSR maxima $\Delta\lambda_{A\text{-}10000} = 14{,}67$ nm. Další posuvy byly se snižující se koncentrací naměřeny: $\Delta\lambda_{A\text{-}1000} = 7{,}33$ nm, $\Delta\lambda_{A\text{-}100} = 3{,}88$ nm, $\Delta\lambda_{A\text{-}50} = 2{,}26$ nm, $\Delta\lambda_{A\text{-}10} = 1{,}02$ nm, jak je zobrazeno na obr. 4. Uvedené hodnoty ukazují, že takto připravený detektor 1 podle příkladu 1 a 2 je dostatečně citlivý, aby prokázal přítomnost borelií korespondujících v desítkách jejich počtu na ploše 0,785 cm^2. Nejnižší měřený počet 10 borelií

indikoval LSPR posun cca 1 nm, který se zvýšil na hodnotu cca 2 nm pro 50 borelií. Obr. 4 dále ukazuje, že obě křivky λ_{10} a λ_{50} jsou obtížně rozpoznatelné a výsledky měření mohou být ovlivněny chybou a citlivostí UV-VIS spektrometru. Nicméně byl pozorován posun LSPR absorpčního píkem, který může indikovat potenciál aktivního detektoru 1 reagovat na počet cca 10 borelií na ploše 0,785 cm^2 s LSPR posunem $\Delta\lambda_{A-10}$ = 1,02 nm. V tomto případě je však potřeba zahrnout chybu stanovení maxima funkce z nulové hodnoty její derivace, měřený šum a přístrojovou funkci spektrometru, jejichž úhrn přibližně koresponduje s $\Delta\lambda_{A-10}$. Proto je potřeba LSPR posuv způsobený koncentrací 10 borelií chápat jako indikativní údaj o přítomnosti borelií na detekční ploše senzoru.

Z Obr. 5 je patrné že hodnoty $\Delta\lambda$ pro koncentrace vyšší než 50 borelií dochází k výraznějšímu posuvu LSPR absorpční křivky směrem k červené části spektra. Hodnota posunu LSPR píku pro 50 borelií byla naměřena $\Delta\lambda_{A-50}$ = 2,26 nm což je hodnota jednoznačně měřitelná a pozorovatelná s využitím běžně dostupných UV-VIS spektrometrů.

Průmyslová využitelnost

Detektor pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů a způsob detekce patogenů pomocí tohoto detektoru podle tohoto technického řešení lze využít zejména pro přípravu senzorů nebo jako samostatný detektor pro detekci různých patogenů, a to i v přítomnosti počtu buněk nebo částic patogenů v řádu několik desítek.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Detektor (1) pro detekci bakteriálních nebo virových patogenů, zahrnující substrát (2) a detekční vícevrstvou strukturu (3) uspořádanou na substrátu (2), přičemž detekční vícevrstvá struktura (3) zahrnuje první plazma polymerní vrstvu (4) tvořenou nylonem 6.6, druhou plazma polymerní vrstvu (4′) tvořenou nylonem 6.6 obsahujícím reaktivní -NH_2 skupiny, a nanočástice (5) stříbra uspořádané mezi první plazma polymerní vrstvou (4) a druhou plazma polymerní vrstvou (4′), rozmístěné izolovaně se vzájemnými odstupy, s plošným pokrytím větším než 50 %, s výhodou 65 % vzájemně přilehlých povrchů první plazma polymerní vrstvy (4) a druhé plazma polymerní vrstvy (4′), **vyznačující se tím**, že detekční vícevrstvá struktura (3) dále zahrnuje alespoň jednu protilátku (6) alespoň jednoho patogenu bakteriálního nebo virového původu, uspořádanou na volném povrchu druhé plazma polymerní vrstvy (4′) a navázanou pevnou nepolární vazbou na reaktivní -NH_2 skupiny druhé plazma polymerní vrstvy (4′), přičemž tloušťka druhé plazma polymerní vrstvy (4′) je do 15 nm.

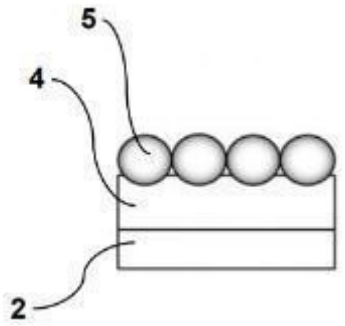
2. Detektor (1) podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že protilátka (6) je protilátka viru *Borrelia burgdorferi*.

3. Detektor (1) podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že nanočástice (5) stříbra mají velikostní rozdělení odpovídající Gaussovu rozdělení se střední hodnotou průměru nanočástice (5) stříbra 30 nm.

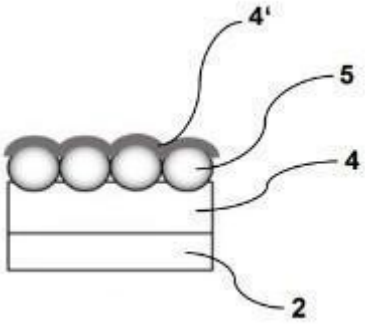
4 výkresy

Seznam vztahových značek:

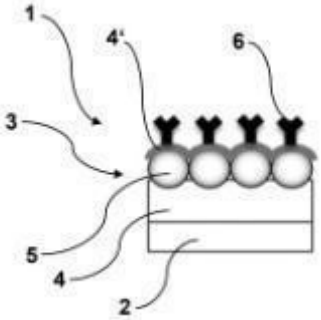
1 detektor
2 substrát
3 detekční vícevrstvá struktura
4 první plazma polymerní vrstva
4′ druhá plazma polymerní vrstva
5 nanočástice
6 protilátka



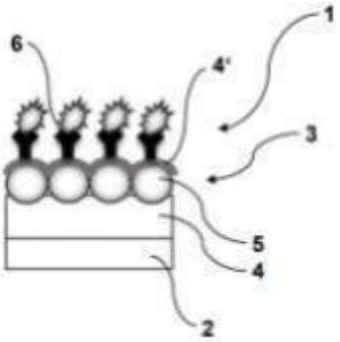
Obr. 1a



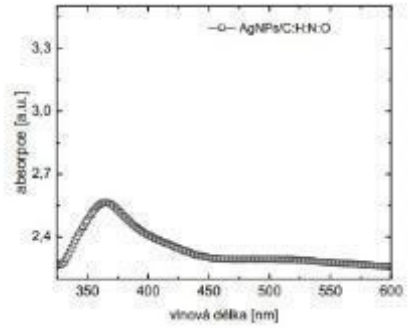
Obr. 1b



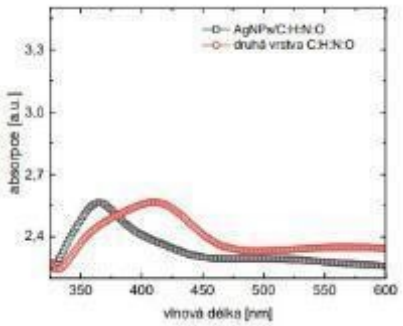
Obr. 1c



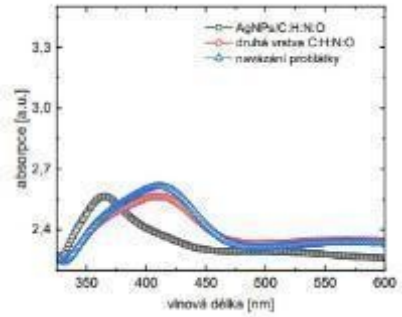
Obr. 1d



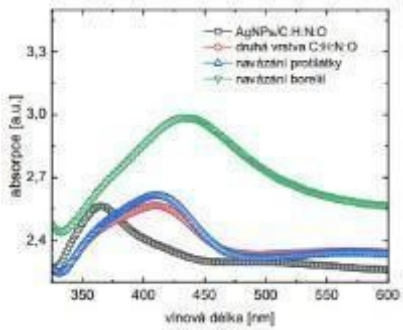
Obr. 2a



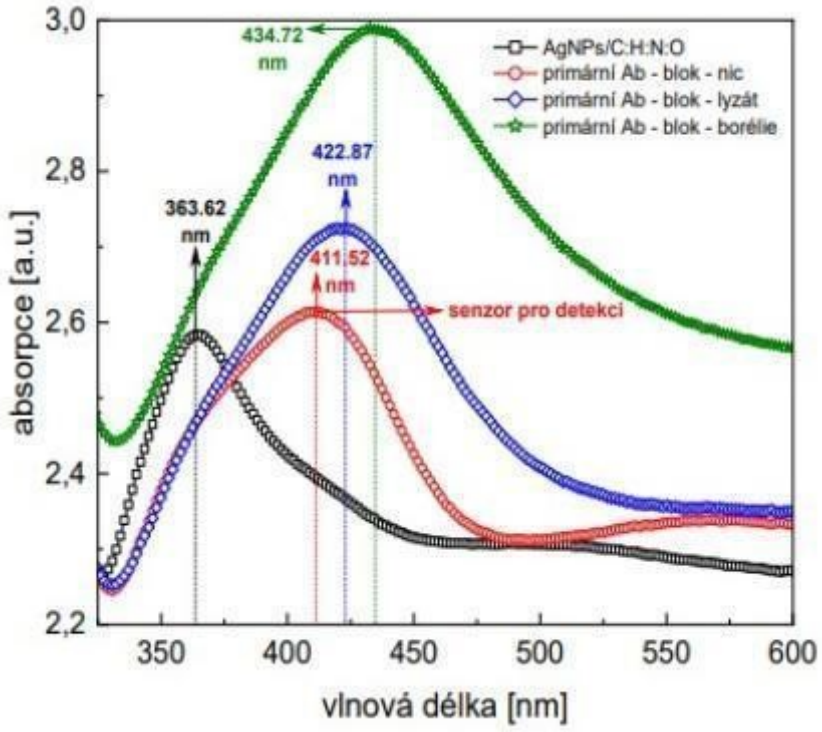
Obr. 2b



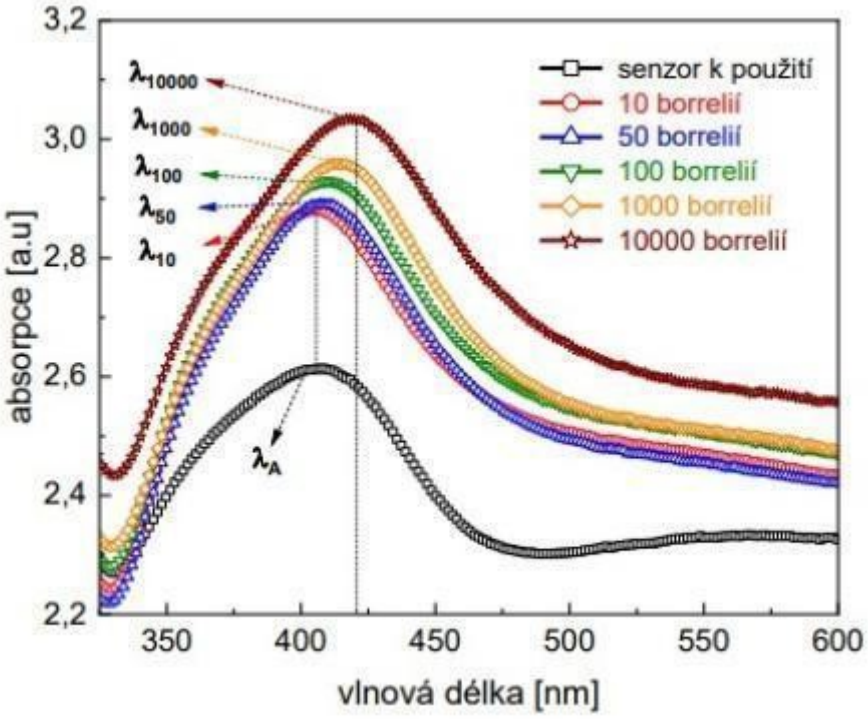
Obr. 2c



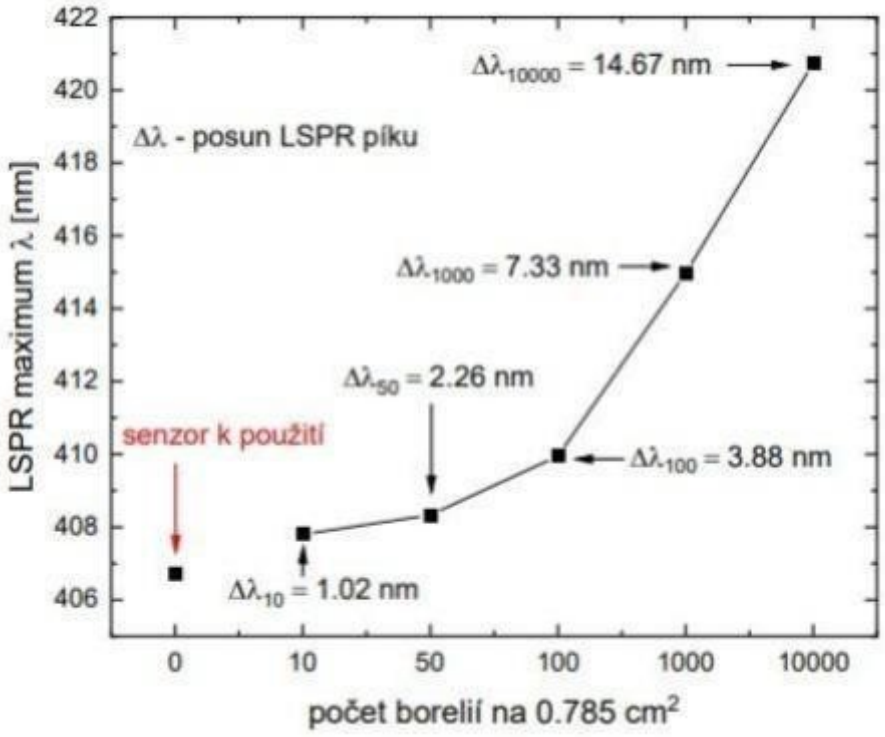
Obr. 2d


AgNPs/C:H:N:O
primární Ab - blok - nic
primární Ab - blok - lyzát
primární Ab - blok - borélie
434.72 nm
422.87 nm
363.62 nm
411.52 nm
senzor pro detekci
absorpce [a.u.]
vlnová délka [nm]

Obr. 3


senzor k použití
10 borrelií
50 borrelií
100 borrelií
1000 borrelií
10000 borrelií
λ10000
λ1000
λ100
λ50
λ10
λA
absorpce [a.u]
vlnová délka [nm]

Obr. 4


LSPR maximum λ [nm]
počet borelií na 0.785 cm²
Δλ - posun LSPR píku
senzor k použití
Δλ-10 = 1.02 nm
Δλ-50 = 2.26 nm
Δλ-100 = 3.88 nm
Δλ-1000 = 7.33 nm
Δλ-10000 = 14.67 nm
422
420
418
416
414
412
410
408
406
0
10
50
100
1000
10000

Obr. 5